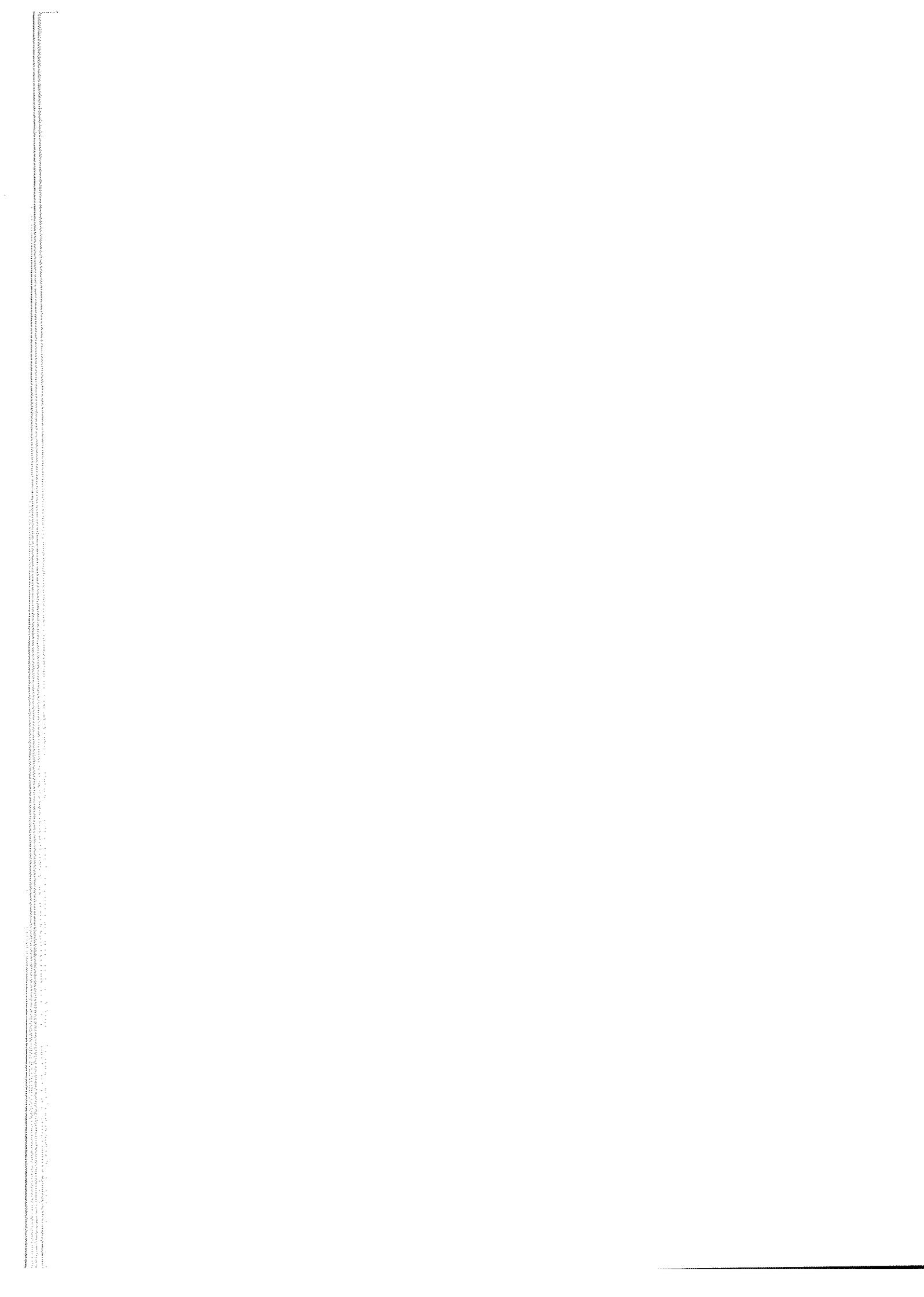


**VIBEKE FRØKJÆR JENSEN OG PER HAVE,  
OVERLEVELSE AF VIRUS I ANIMALSKE PRODUKTER  
VED UDRÅDNING/HYGIEJNISERING  
I GYLLE UNDER ANAEROBE FORHOLD**

**DEL-RAPPORT TIL  
SMITSTOFREDUKTION I BIOMASSE  
RAPPORT VEDRØRENDE  
DET VETERINÆRE FORSØGSPROGRAM  
I  
BIOGASFÆLLESANLÆG**

**BIND II: DEL-RAPPORTER OG BILAG 1995**



Overlevelse af virus i animalske produkter  
ved udrådning / hygiejnisering i gylle  
under anaerobe forhold.

Vibeke Frøkjær Jensen & Per Have

Statens Veterinære Institut for Virusforskning

Juni 1995

Finansieret af Energistyrelsens Udviklingsprogram



## **Forord**

Nærværende rapport er et bidrag til belysning af den patogenreducerende effekt i de danske biogasanlæg og er led i det Veterinære overvågningsprogram for biogasanlæg under Energistyrelsen.

Projektet er derigennem finansieret af Energiministeriet og undersøgelserne er gennemført på Statens veterinære Institut for Virusforskning (SVIV), Landbrugsministeriet.

Undersøgelserne er en viderebygning på tidligere undersøgelser på SVIV omhandlende inaktivering af forskellige vigtige animale virus i gylle under udrådning.

I de tidligere undersøgelser er inaktiveringen af frit suspenderet virus i biomassen blevet undersøgt. Som forudsætning for en vurdering af den hygiejniserende effekt i biogafællesanlæg er det af afgørende betydning at finde ud af, hvordan naturligt forekommende virus forholder sig sammenlignet med virus frit suspenderet i biomassen.

Med nærværende projekt er betydningen af forekomst af virus i vævsrester og lignende i biogasanlæg undersøgt for første gang i Danmark og, så vidt vides, også internationalt.

Eva Smedegaard Madsen og Søren Kamstrup takkes for faglig samt anden assistance og H. J. Bendixen for inspirerende diskussioner undervejs.

Vibeke Frøkjær Jensen og Per Have

Statens veterinære Institut for Virusforskning

## Indholdsfortegnelse

Forord .....	3
Indholdsfortegnelse .....	4
Formål .....	5
Baggrund .....	5
Recykling af organisk affald .....	5
Biogasanlæg .....	5
Affaldstyper af epidemiologisk betydning for virussygdomme .....	6
Virologiske risici ved anv. af forskellige affaldstyper .....	7
Kontrol med den virusinaktiverende effekt i BFA .....	8
Projektbeskrivelse .....	10
Materialer og metoder .....	11
Biomasse .....	11
Medier og diverse materialer .....	11
Virus .....	12
Vævsmateriale .....	12
Infektivitetstitreringer .....	13
Reaktormodel .....	13
Temperaturer og biomasse .....	14
Prøveudtagning .....	14
Resultater .....	15
pH i gylle og udrådnede biomasse .....	15
Vævsnedbrydning .....	15
Titrering .....	15
Reisolering .....	16
Inaktiveringsforløb .....	17
Inaktivering af PPV .....	19
Inaktivering af SPV .....	19
Holdetider for sikring af 4 log <sub>10</sub> reduktion af SPV og PPV .....	20
Diskussion .....	38
Inaktiveringsforløb for virus indlejret i væv .....	38
Inaktiveringsforløb i Eagles MEM .....	39
Vævets betydning for virusinaktiveringen .....	39
Hygiejniseringsstrin .....	41
Holdetiden i relation til inkubationstemperatur og virus .....	42
Ekstrapolation til andre virus .....	44
Kriterier for fastsættelse af holdetid .....	45
Konklusion .....	48
Litteraturliste .....	50

## **Formål**

Formålet med nærværende undersøgelser er at belyse i hvilken grad indlejring af virus i vævsrester virker forhalende på virusinaktivering i såvel termofile som mesofile anlæg samt under hygiejniserende ved høje temperaturer (60-80°C). Dette er bl.a. relevant i forbindelse med inddragelse af husholdningsaffald i biogasanlæg.

## **Baggrund**

### Recykling af organisk affald

Fra flere sider i samfundet produceres stadigt stigende mængder organisk affald. Intensiveringen af landbruget har medført et stigende problem med bortskaffelse af gylle. En række fysiske, kemiske og biologiske behandlingsmetoder er forsøgt med henblik på at reducere lugtgener, forurening og patogener til et acceptabelt niveau. Endvidere produceres stigende mængder spildevandsslam som følge af vandmiljøplanens krav med udbygning af vandrensningens kapaciteten (jvf Krause et al., 1994). Endelig er mængden af sorteret organisk husholdningsaffald stærkt stigende.

For øjeblikket foretages biologisk behandling af ca. 25.000 tons og Miljøstyrelsens handlingsplan 1993-1997 lægger op til en genanvendelse af 20-25 % af den samlede dagrenovation i biologiske affaldsbehandlingsanlæg med efterfølgende anvendelse til jordbrugsformål. Ud fra en prognose på 1,3-1,5 mio. tons husholdningsaffald i år 2000 vil det svare til en produktion af ca. 250.000-400.000 tons organisk husholdningsaffald til biologisk behandling (Krause et al., 1994). De stadigt stigende problemer med bortskaffelse af organisk affald gør det nødvendigt at finde nye økologisk og økonomisk bæredygtige løsninger.

### Biogasanlæg

Siden begyndelsen af 80'erne har der været stigende interesse for at anvende anaerob udrådning i biogasanlæg til behandling af gylle men også andet organisk affald (fra husholdninger og industri) og der er foreløbig bygget 10 store biogasfællesanlæg (BFA), hver med gylleindsamling fra en række besætninger samt en lang række andre kilder.

I de danske BFA anvendes idag ca. 80% husdyrgødning (gylle) samt 10-20% energirigt affald. Gasproduktionen øges betragteligt ved anvendelse af energirigt affald som supplement til gyllen, og det er samtidig en økonomisk og økologisk fordelagtig måde at komme af med affaldet på (frem for den ressourcekrævende behandling på forbrændings- og destruktionsanlæg). Det energirige affald er typisk slam fra industrier, der forarbejder vegetabiliske og animalske råvarer, men en række andre affaldstyper ønskes også anvendt i BFA, væsentligst organisk husholdningsaffald og spildevandsslam.

Der er en stor miljømæssig gevinst ved denne affaldsanvendelse; affaldet udgør herved en energiressource (methan), hvilket gør bortskaffelsen mere miljømæssigt neutral end f.eks. forbrænding eller kemisk desinfektion. Endvidere bringes udslippet af methan, der er en meget

potent drivhusgas, som også i nogen grad udvikles under lagring af gylle og andet organisk affald, under kontrol.

Imidlertid er der den ulempe ved BFA, at patogener fra mange forskellige kilder (landbrug fra forskellige regioner, forskellige virksomheder etc.) vil blive samlet og efterfølgende spredt ud over landbrugsjorden. Det må derfor sikres at behandlingen i BFA virker hygiejniserende i et tilstrækkeligt omfang til at hindre spredning af patogener. Kravet til den hygiejniserende effekt må afhænge af hvilke typer affald der anvendes i anlæggene og af, hvilken anvendelse af biomassen der finder sted efterfølgende.

Inddragelse af hygiejnisk set stærkt risikobehæftet affald som husholdningsaffald og spildevandsslam må imidlertid medføre skærpede krav til hygiejnisering, og disse krav vil ofte synes modstridende med de tekniske og økonomiske interesser. En løsning på disse problemer forudsætter et øget kendskab til smitstofreduktionen i anlæggene og faktorer af betydning herfor, idet dette er et nødvendig grundlag for udarbejdelse af rimelige krav til BFA.

### Affaldstyper af epidemiologisk betydning for virussygdomme

Anvendelsen af affald og gylle er, så vidt vides, ikke af epidemiologisk betydning for overførsel af zoonotiske virus, dels er kun få virus zoonotiske, dels er disse oftest meget følsomme virus. Dette er i modsætning til forholdene for parasitter og bakterier, hvor f.eks. salmonella vil kunne indgå i en recykling mellem dyr, mennesker og jord/afgrøder. Recykling af humane virus kan ske både via spildevandsslam og via husholdningsaffald.

I nærværende arbejde vil der blive fokuseret på de animale virus. For animale virus er der tale om risiko for recykling fra dyr via husdyrgødning (gylle) eller, som noget nyt, vævs- og organrester til jord og endelig via afgrøder tilbage til dyr.

I) Gylle kan indeholde store mængder virus, såvel enteriske virus som virus udskilt med andre sekreter: spyt, næseflåd, urin og vesikelindhold (f.eks. mund- og klovesyge). Der henvises til Bøtner (1990) for en oversigt over relevante virus under danske forhold.

II) Anvendelsen af de affaldstyper, der, udover gylle og anden husdyrgødning, har størst interesse i forbindelse med animale virus, er reguleret efter Miljøministeriets bek. nr.736 af 26/10 1989 og omfatter:

- a) slam og ristestof fra kødvarevirksomheder og slagterier (o.a. industrier der forarbejder animalske råvarer). Må ikke indeholde større vævsrester (affaldskategori B, i flg. MM bek.)
- b) kildesorteret affald, især husholdningsaffald (affaldskategori C, i flg. MM bek.)

Egentligt slagteaffald med kassater, kadavere etc. må ikke anvendes til jordbrugsformål i henhold til Landbrugsministeriets bek. nr.789 af 21/9 1992.

Kødaffald kan potentielt indeholde høje koncentrationer af virus, især hvis dyrene er slagtet i inkubationsfasen, men virus kan også findes i høje koncentrationer i ristestof og mave-tarmindhold. Efter indførelse af det åbne indre marked er direkte import af forskelligt

affald samt slagtedyrl til danske slagterier muliggjort. Hermed kan affald fra danske slagterier også indeholde vev fra udenlandske dyr. Dette kan få alvorlige konsekvenser ved import af eksotiske smitstoffer, men også import af fremmede serotyper af endemisk forekommende virus kan tænkes at give sygdomsproblemer.

Husholdningsaffald kan indeholde animalsk madaffald af udenlandsk oprindelse. Ved anvendelse af disse affaldstyper i BFA vil der være potentiel risiko for at eksotiske virus indlejret i vævsrester optræder i biomassen og efter behandling udbringes på markerne. Dette medfører behov for skæpede krav og kontrol med patogenreduktionen (hygiejniseringsniveauet) i BFA ved anvendelse af risikoaffaldet.

### Virologiske risici ved anvendelse af forskellige affaldstyper

En risikovurdering for anvendelse af affaldet i BFA omfatter en vurdering af en række forhold:

- 1) forekomst af patogener i affaldet
- 2) infektionsdosis
- 3) anvendelsen på landbrugsjord:
  - udbringningsmetode, evt aerosoldannelse
  - udbringningstidspunkt i forhold til såning og høst
  - patogenets persistens i jordbunden og på afgrøden
  - afgrødens anvendelse
- 4) den smitstofreducerende effekt i anlæggene

Ad 1)

Den foreliggende viden om virusforekomst i affaldet er meget begrænset, bl.a. pga. af vanskelighed ved isolation og stærkt varierende forekomst. Dette nødvendiggør at forholdsregler formes ud fra kendskab til forekomst af inficerede dyr på affaldets oprindelsessted, og almen epidemiologisk viden, herunder potentielle smitteveje efter udbringning. Hermed bliver kendskabet til det animalske affalds oprindelse særdeles vigtig.

Ad 2) og 3)

Infektionsdosis for virus er generelt lav. Man må være opmærksom på, at metoden ved udbringning kan have betydning for smitterisikoen. Aerosoldannelse medfører spredning med vinden og infektionsdosis er generelt en faktor 100-1000 lavere ved inhalation end ved peroral smitte (Sellers, 1981).

Ad 3)

Viden om persistens af infektiøst virus i jordbunden er desværre meget begrænset. Humane enterovirus kan angiveligt overleve i måneder (25-170 dg) i jord, afhængig af jordtype, pH, temperatur og fugtighed (Ellis & McCalla, 1978). Andre undersøgelser har vist, at lave temperaturer og et fugtigt miljø giver højest persistens af infektiøst virus (Straub et al., 1993). Dette betyder, at det danske klima skulle give gode muligheder for overførsel af smitte via afgrøder samt potentiel mulighed for spredning til den vilde fauna. Den manglende viden om

risiko for transmission af smitte efter udbringning gør, at der må sættes relativt høje krav til den smitstofreducerende effekt i biogasanlæg.

Ad 4)

Krav til den smitstofreducerende effekt i anlæggene må som nævnt afhænge af patogenindholdet i affaldet, dvs hvilken type affald der anvendes. Forekomst af virus i affaldet vil være stærkt svingende. Endemiske virus forekommer jævnligt i betydelige koncentrationer (Derbyshire et al., 1986; Lydholm & Nissen, 1987), men det vil ikke være påkrævet at opnå fuldstændig inaktivering af disse. Anderledes for eksotiske virus, hvor forekomsten i affaldet, omend sjældent, vil indebære en risiko for spredning af eksotiske virus. Ved anvendelse af affald med risiko for forekomst af eksotisk virus er det derfor nødvendigt at sikre en høj smitstofreduktion.

#### Kontrol med den virusinaktiverende effekt i BFA

Virusinaktivering i anlæggene kan tænkes overvåget under anvendelse af et egnet indikatorvirus eller gennem generelle krav til driften af BFA med kontrol af de parametre, som har betydning for virusinaktiveringen, såsom driftstemperatur og holdetid.

Anvendelse af et indikatorvirus forudsætter konstant forekomst af et virus i tilstrækkelig høje koncentrationer til at reduktionen kan følges i et tidsforløb, der sikrer inaktivering af patogene virus. Der foreligger ikke kendskab til et egnet indikatorvirus. Muligheden for anvendelse af fæcale streptococcer som indikator for virus er under overvejelse (se nedenfor).

Kontrol med virusinaktivering ved krav til driften af BFA forudsætter generel viden om virusinaktiveringen i BFA, dvs. hvilke faktorer, der har betydning for virusinaktiveringen, og hvilken effekt disse faktorer har på de relevante virus. Kontrol med virus ud fra kendskab til inaktiveringsforløbet under veldefinerede driftsforhold forudsætter høj grad af processtabilitet.

Der foreligger på internationalt plan en del undersøgelser af inaktivering af virus frit forekommende i slam og gylle og der er primært tale om virussuspensioner tilsat til biomassen. De undersøgte virus er dels vigtige patogener, humane såvel som animale, samt mulige indikatorvirus (bakteriofager, poliovirus og andre enterovirus, bovint parvovirus m.fl.). Der er imidlertid mange variable faktorer både mht. virus, anlæggenes drift og biomassens sammensætning. Undersøgelserne er derfor vanskeligt sammenlignelige og giver ikke et samlet billede af forholdene omkring virusinaktiveringen under udrådning. Visse tendenser er dog gennemgående:

Temperaturinaktivering betragtes generelt som værende den mest betydende faktor for virusinaktiveringen i biogasanlæg (bl.a. Salo & Cliver, 1976; Deng & Cliver, 1992). Det er vist at miljøet i reaktorerne har en additiv virucid effekt udover den termiske effekt (Have et al, 1994; m.fl.) men kun få andre faktorer i biomassen er undersøgt specifikt for en virusinaktiverende effekt. I en schweizisk undersøgelse (Metzler, 1993) er påvist en væsentlig virucid effekt af lavmolekylære stoffer (penetrerer polycarbonatmembraner) og  $\text{NH}_3$  og  $\text{H}_2\text{S}$  foreslåes som værende de aktive forbindelser. Den relative betydning af de forskellige kemiske parametre er endnu ikke fastlagt; foreløbig er varme/holdetid derfor den eneste kendte kontrollérbare parameter, som kan anvendes til forøgelse af virusinaktiveringen i anlæggene. Ud

over den rent termiske effekt kan der være tale om en indirekte påvirkning via den mikrobielle aktivitet, f.eks ammoniak og proteaser (Ward & Ashley, 1977; Deng & Cliver, 1992).

Evnen til at overleve i forskellige miljøer varierer meget mellem og indenfor de forskellige virusfamilier. Følsomheden overfor varme og andre kemiske/fysiske faktorer varierer meget. Eksempelvis er entero- og cardiovirus, i modsætning til mund- og klovesyge virus syrer resistente, selvom de alle tilhører picornavirusfamilien.

Bøtner (1990) har undersøgt inaktiveringen af en række patogene virus i gylle under anaerobe forhold. Generelt var de kappebærende virus mere følsomme end nøgne virus og de kappebærende virus inaktiveredes hurtigt både under mesofile og termofile forhold (Bøtner, 1990). Salo & Cliver (1976) har endvidere fundet, at følsomheden overfor frit  $\text{NH}_3$  varierer meget og påvist en sammenhæng med typen af arvemasse; reovirus er således langt mere resistent end picornavirus. Den virucide effekt af frit  $\text{NH}_3$  ses især ved pH over 8 og ved nedbrydning af protein med frigørelse af  $\text{NH}_3$  og  $\text{NH}_4^+$ . Vedr. effekten af  $\text{NH}_3$  henvises iøvrigt til diskussionen i den foregående rapport (Have et al. 1994).

FS-metoden (måling af fæcale streptococcer) er foreslået som kontrolparameter for inaktivering af patogene bakterier og parasitter (Bendixen, 1993). Dette er også en indikator for en stabil proces i anlæggene. Det netop afsluttede projekt (samarbejde DTI/SVIV, Have et al. 1994) har vist, at FS-metoden er velegnet som indikator for relativt termostabile virus som enterovirus, når disse forekommer frit i gyllebaseret biomasse.

En række eksperimenter (Lund et al, 1983; Bøtner, 1990; McKain & Hobson, 1987) viser en udtalt protraheret inaktivering af en lille del af virus. Dette er blevet tillagt en beskyttende effekt af associering af virus til partikler (Lund et al, 1983). Som nævnt er tidligere undersøgelser af virusinaktivering under udrådning næsten udelukkende udført med tilsætning af virussuspensioner direkte til biomassen. Naturligt forekommende virus må forventes i langt højere grad at være partikelassocieret eller endog indlejret i cellerester, vævsrester og aggregater af fast materiale.

Formålet med nærværende undersøgelse har derfor været at belyse, i hvilken grad forekomsten af virus i rester af organisk materiale virker forhalende på virusinaktiveringen i forhold til tilsatte virussuspensioner.

## Projektbeskrivelse

Inaktiveringsforløbet er fulgt for vævsindlejret virus i et neutralt medium, i gylle samt i udrådningsbiomasse under anaerobe forhold. I gylle og neutralt medium er inaktivering fulgt ved en række temperaturer mellem 50 og 80°C. Herudover er inaktivering fulgt dels ved en relevant udrådningsstemperatur (50°C) i udrådningsbiomasse, dels ved 70°C simulerende varmehygiejniserings efter udrådning. I forsøget er kun anvendt gylle med pH < 7,6 for at få en lav koncentration af frit ammoniak. Den i forsøget anvendte udrådningsbiomasse havde et pH på 8,0-8,2.

I forsøget er anvendt den af Bøtner udviklede model i lettere modificeret form. Modellen simulerer batch-udrådning af gylle (Bøtner, 1990). Modellen består kort beskrevet af batches af biomasse i 100 ml flasker uden tilgang af luft. Specielt er modellen modificeret ved at der ikke tilsættes frit virus direkte til biomassen men virus indeholdt i væv. Vævsstykker af ensartet størrelse er valgt på baggrund af den pulpning der sker, inden affaldet anvendes i BFA.

Der er anvendt to modelvirus:

Porcint parvovirus, PPV  
Klassisk svinepestvirus, SPV

Der er som nævnt store forskelle mellem virus hvad angår følsomhed for varme og andre kemiske/fysiske faktorer i gylle. En generel tendens er dog at kappebærende virus er mere følsomme (Bøtner, 1990). SPV er kappebærende og PPV er et nøgent virus.

SPV er valgt her fordi transmission via kødaffald er en særdeles vigtig spredningsvej. Det er et relativt følsomt kappebærende virus (Bøtner, 1990) og det vil derfor være af afgørende betydning, hvis der ses en væsentlig bekyttende effekt ved indlejring af dette virus i væv.

PPV udskilles primært i fæces. Det er almindeligt forekommende i Danmark, men udbredelsen og forekomsten i gylle er ikke kendt. Det er valgt som værende et meget resistent virus med mulig anvendelse som indikatorvirus. Parvovirus er ekstremt termostabilt hvorfor inaktivering selv ved høje temperaturer kan følges over et længere forløb; dette muliggør sammenlignende undersøgelser af virusinaktivering ved høje temperaturer.

## Materialer og metoder

### Biomasse

Der er anvendt 1) frisk gylle og 2) udrådnede biomasse.

Ad 1)

Den friske gylle blev opsamlet ad flere gange i besætninger der er leverendører til Sinding BFA. Der blev afhentet gylle jævnlige fra besætningerne, så gyllen var frisk ved levering (2-10 dg gammel). Gyllen blev opbevaret ved 5°C og anvendt indenfor 6 uger efter opsamling. Gyllen blandes umiddelbart før anvendelse i forholdet 50% kvæggylle og 50% svinegylle.

Tørstofprocenten blev bestemt (ved fordampning ved 105°C) til

- Svinegylle: 4,8- 10,5 %
- Kvæggylle: 4,9-7,4 %
- Blandingsgylle: 6-9 %

Ifølge Larsen & Munch (1981) varierer tørstofprocenten i dansk gylle typisk mellem 7-9%. Ved undersøgelser af inaktivering af poliovirus i slam er fundet, at variationer i tørstofindholdet mellem 2-6 % ikke har væsentlig betydning for inaktivering (Ward et al., 1976). I nærværende forsøg er TS-% i blandingsgyllen 6-9%, hvilket må betragtes som repræsentativt. Da virus er indlejret i væv, er de små variationer i TS-% formentlig uden væsentlig betydning.

Ad 2)

Den udrådnede biomasse blev opsamlet på BFA i Sinding. Den anvendte rå biomasse var sammensat af ca. 40-50% svinegylle, 40-50% kvæggylle, 10-20% energirigt affald (afskrab fra mave-tarmslimhinde, blegejord fra olieraffineri samt mavetarmindehold og filteraffald fra slagteri). Tørstofprocenten blev bestemt til 6,8 %. Biomassen opbevares ved 5°C indtil brug.

Alle batches af gylle samt den udrådnede biomasse var på forhånd negative for PPV ved infektivitetstitering.

### Medier og diverse materialer

Eagles minimum essential medium (Glasgow modification) tilsat dihydrostreptomycin (0,1 g/l) og neomycin (0,05 g/l), her betegnet Eagles MEM.

Eagles MEM tilsat dihydrostreptomycin (1 g/l), penicillin (1 mill i.e./l), amphotericin B (10 mg/l), her betegnet Eagles med antibioticum.

Føtalt kalveserum, FCS, anvendes som tilsætning til vækstmedier og fortyndingsmedier.

Mikrotiterplader: NUNC, Microwell Plate, 96F, Danmark.

### Virus:

Det porcine parvovirus (PPV) var en vaccinstamme (stammnr. 893). Den anvendte suspension blev udtaget af vaccineproduktionen. Den var blevet opformeret på monolayer af primære svinenyrerceller. Som vedligeholdelsesmedium blev anvendt Hanks medium modificeret ved anvendelse af 0,75 g bicarbonat pr. liter, aminosyrer tilsat som koncentreret valleprotein-hydrolysat (5 g/l) og med vitaminer og antibiotica som Eagles MEM. Råvirus gennemgik de indledende trin i koncentrering og oprensning af antigen til PPV-vaccineproduktionen på SVIV: Efter fældning, resuspension og filtrering gennem Seiz Suprafilter blev 0.5 l virussuspension udtaget. Suspensionsmediet har pH-værdi 9 og indeholder 0,02 M glycin.  
Virustiter:  $10^{8,0}$  TCID<sub>50</sub>/50 $\mu$ l.

Svinepestvirus, SPV: Der anvendes fuldblod fra svin, inficeret med den højvirulent type Brescia i den viræmiske fase. Blodet anvendes til infektion af svin under isolationsforhold (se nedenfor).  
Virustiter:  $10^{6,0}$  TCID<sub>50</sub>/ml.

### Vævsmateriale:

Der blev anvendt blodkoagler med PPV og miltvæv fra svin med svinepest i den akutte fase. Til forsøg med svinepestvirus blev der endvidere anvendt steril muskulatur som supplement til miltvæv under inkubationen i biomasse (9 g muskulatur til 6 g miltvæv), for at begrænse anvendelsen af forsøgsdyr.

### PPV:

Virussuspensionen blev injiceret i vacutainers (venoject, plain non-silicone), 0,5 ml/glas. Der blev tappet blod fra kvæg til øjeblikkelig opblanding med virus. Koagulationsprocessen skete hurtigt initialt, men for at få mere faste koaguler blev blodet opbevaret ved 5°C i 2.5 timer inden videre præparation. Koaguler som var afvigende mht. farve, konsistens og vægt blev kasseret, resten blev afvejet til prøver af passende størrelse og frosset ved 80°C.

Beregning af udgangstiter af PPV i koagel:

Der anvendtes 0,5 ml virussuspension i ca. 8 ml blod:

$$0,5/8,0 * 10^{8,0} \text{ TCID}_{50}/50\mu\text{l} = 10^{6,8} \text{ TCID}_{50}/50\mu\text{l}$$

### SPV:

Der blev anvendt 6-8 mdr gamle svin, som var seronegative overfor SPV/BVDV. Svinene blev podet ved intramuskulær injektion af virusholdigt blod. Infektionsforløbet fulgtes ved daglig måling af rectaltemperatur og iagttagelse af adfærd. Svinene blev slagtet i den akutte viræmiske fase 4-5 dage p.i. når toppen af feberkurven var nået. Milten blev udtaget sterilt og frosset.

Før inkubation i biomassen blev milten optøet ved stuetemperatur og skåret i stykker af ca 1x1 cm med en tykkelse på 5-7 mm. Hver prøve (à 6 g) var en pool af 5-6 miltstykker fra forskellige områder i milten .

Der blev udtaget prøver fra forskellige steder i miltene til titrering inden anvendelse i videre forsøg. Titrene i forskellige prøver fra den enkelte milt var meget ensartede (indenfor 0,2 log<sub>10</sub> enhed). Titeren varierede fra 10<sup>3,1</sup> - 10<sup>5,5</sup> TCID<sub>50</sub>/50μl mellem de forskellige milte. Der blev kun anvendt milte med en udgangstiter > 10<sup>4,7</sup> TCID<sub>50</sub>/50μl. Der blev ikke anvendt infarceret miltvæv. Milte med mange infarkter blev kasseret. Der sås ingen sammenhæng mellem graden af infarcering og titer.

#### Svinemuskulatur:

Sterilt udtaget lårmuskulatur fra 1-2 mdr gamle svin (seronegative overfor SPV/BVDV) blev skåret i strimler med en diameter på 6-8 mm, og afvejet i portioner à 9 g (anvendt som supplement til miltprøver for at opnå 20% væv i biomassen).

#### Infektivitetstitreringer

For hver temperatur og virus blev 1 sæt prøver fra både rågylle, Eagles MEM og (ved 5°C og 70°C) udrådnet biomasse titreret parallelt. Titreringen blev gentaget én gang (dobbelbestemmelse). Prøverne blev tøet op ved stuetemperatur og tilsat Eagles MEM med 10x antibiotika og 10% FCS, svarende til en 10-folds fortynding af vævsprøven. Prøven blev homogeniseret 5 min i en Stomacher og centrifugeret 20 min ved 4000g. Af supernatanten fremstilledes en 10-fold fortyndingsrække i Eagles med antibiotika og 10% FCS.

1) PPV: Der anvendtes 60-70% tætte monolayers af sekundære svinenyreceller i mikrotiterplader. Hver fortynding fra 10<sup>-1</sup> til 10<sup>-8</sup> tilsattes til 5 brønde, 50 μl/brønd. Efter adsorption i ca. 20 timer ved 37°C og 5% CO<sub>2</sub> i atmosfærisk luft blev vækstmediet skiftet (150 μl/brønd Eagles MEM med 10% FCS). Pladerne inkuberedes yderligere 3 dg ved 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Kulturerne blev acetonefixeret og farvet ved PLA-teknik med et peroxydasekonjugeret monoklonalt antistof (LPPV2, SVIV).

2) SPV: Der anvendtes en celsesuspension med 10% FCS og 400.000 celler/ml af en kontinuert cellelinie, PK-15. Cellerne præinkuberes 3 timer i mikrotiterplader, 50 μl/brønd. Fortyndingerne fremstilles og sættes på pladerne som beskrevet for PPV. Pladerne inkuberes 2 dg ved 37°C med 5% CO<sub>2</sub> i atmosfærisk luft. Kulturerne blev alkoholfixeret og PLA farvet med biotinoleret antiserum fra svin og streptavidin (DAKO).

Titrerings-endepunkter er beregnet efter metoden beskrevet af Reed & Muench (1938)

Vækst af mikroorganismer ved infektivitetstitreringerne var generelt ikke et problem. Kraftig vækst af svampe både på gyllen og på Eagles MEM under langvarig inkubation ved 20°C gjorde det dog nødvendigt at anvende dobbelt koncentration amphotericin B ved titrering af PPV for at hindre svampevækst.

Metode ved inkubation

#### Reaktormodel

Modellen bestod af batches à 60 ml biomasse (rågylle hhv. udrådnet biomasse) tilsat 15 g

vævsmateriale (20% w/v) i 100 ml flasker. Flaskerne blev lukket med U-rør. Biomassen/mediet blev tempereret i vandbadet ved den relevante temperatur (ved 5°C dog i køleskab) inden tilsætning af vævsmaterialet. Under inkubationen blev flaskerne rystet grundigt med mellemrum afhængig af temperaturen, (ca. en gang i døgnet ved de lave temperaturer, hyppigere ved de høje temperaturer). Under forsøgsforløbet sås tydelig gasudvikling ved 20°C og 35°C.

#### Temperaturer og biomasse

Ved 5°, 20°, 35°, 50°, 55°, 60°, 65°, 70° og 80°C, anvendtes hhv. rågylle og Eagles MEM. Forsøgskørsler i Eagles MEM udførtes parallelt med rågylle for den enkelte temperatur. Ved 50° og 70° anvendtes endvidere udrådnet biomasse.

Forsøg med PPV og SPV udførtes adskilt. For SPV bestod de 15 g vævsmateriale af 6 g milt og 9 g sterilt muskelvæv. Inaktiveringsforløbet blev endvidere undersøgt for virus i vævstykker inkuberet i Eagles MEM, (5-6 g væv i 20 ml Eagles).

Ved den enkelte temperatur anvendtes kun vævsstykker fra én milt hhv koageler fra et dyr, så resultaterne er sammenlignelige mellem de forskellige medier.

Nulprøver er vævsprøver (fra samme dyr som i forsøgsrækken), der er udsat for tilsvarende antal indfrysninger som de øvrige prøver.

#### Prøveudtagning

Før inkubation blev taget prøver af biomassen til bestemmelse af tørstof-% og pH-måling. Endvidere tages nul-prøver af vævsmaterialet; disse tøs og fryses lige så mange gange som de øvrige prøver. Der blev inkuberet en flaske til hvert prøveudtag. Der blev udtaget prøver på ca. 6 forskellige tidspunkter efter start.

Efter inkubation blev vævsmaterialet udtaget, skyllet 2 gange i ca. 1 minut i Eagles m. 10 x antib. og 2-3 g overført til hver af 3 stomacherposer. Prøverne blev straks frosset på tøris (-80°C). Der blev målt pH på gyllen. Ved 5°, 20° og 35°C blev endvidere udtaget 3 gylleprøver à 4 ml, tilsat 10% FCS og prøverne blev straks frosset på tøris.

## Resultater

### pH i gylle og udrådnede biomasse

Gyllens pH-værdi var 6,9-7,2, men steg ved opvarmning. I figurerne 1-18 er angivet de initiale pH-værdier i gyllen og biomassen ved den aktuelle inkubationstemperatur. pH stiger mest ved de høje temperaturer, ved 70-80°C til 7,7-7,9.

pH værdien for den udrådnede biomasse var 8,2. Ved forsøgene med SPV faldt pH til ca. 7,8 ved opvarmning og yderligere 0,2 under inkubationen. Ved forsøgene med PPV faldt pH ikke ved opvarmning, men ved 50°C faldt pH til 7,8 under inkubationen. Ved 70°C steg pH til 8,3 og der opstod en ammoniakalsk lugt. Biomassen havde ved inkubation af SPV været opbevaret 6 uger ved 5°C, hvorved der tilsyneladende er sket nogle kemiske ændringer (ved 5°C er der en lav mikrobiel aktivitet).

### Vævsnedbrydning

Under inkubationen sker en proteolytisk opløsning af vævet ved 50°C og lavere temperaturer; nedbrydningen sker hurtigere jo højere temperaturen er. Da der måles på vævsresten har dette sandsynligvis ikke influeret på den målte titer. For miltvæv opløses parenchymet imidlertid hurtigere end bindevævet, og da virus primært er lejret i parenchymet, kan dette have forårsaget titerfald, et titerfald, som ikke er udtryk for en egentlig virusinaktivering.

Ved højere temperaturer (> 55°C) koagulerer vævsproteinerne (vævet blev fast og gummiagtigt) hvilket forhalede nedbrydningsprocessen (koagelet nedbrydes på 14 dg ved 55°C, men på kun 3 dage ved 50°C), men også for de høje temperaturer ses en hurtigere nedbrydning jo højere temperaturen er.

### Titring

Detektionsgrænsen for PPV var  $10^{0,7}$  TCID<sub>50</sub>/50µl svarende til 1 positiv brønd med uforyndet supernatant ( $10^{-1}$  fortynding af koagel). Ved titring af miltprøver sås en toksisk effekt på cellerne i brønde tilsat uforyndet supernatant ( $10^{-1}$  fortynding af milt). Detektionsgrænsen ved titring af SPV var derfor  $10^{1,7}$  TCID<sub>50</sub>/50µl; i nogle tilfælde kunne dog genfindes virus i lavere koncentrationer.

## Reisolering

Virusinaktivering i væv i medium viser den inaktiverende effekt af varme i kombination med eventuelle (inaktiverende eller beskyttende) faktorer i vævet. Virusinaktiverende faktorer i vævet kan eksempelvis være enzymer, antistoffer eller hvide blodlegemer. Endvidere kan virus til en vis grad være fanget i fibrin, celler, proteinkoagel m.v., hvilket vil medføre en falsk lav titer ved titrering.

### PPV:

Den beregnede udgangstiter (forventet) er:  $10^{6,8}$  TCID<sub>50</sub>/50 $\mu$ l. Titeren målt på nulprøver (gennemsnit på flere koageler og titreringer for hver bloddonor) fandtes til  $10^{6,0}$  -  $10^{5,3}$  TCID<sub>50</sub>/50 $\mu$ l. Afvigelserne på det enkelte koagel er indenfor måleusikkerheden.

Titeren målt på nulprøverne er således en del lavere end forventet. Da titeren er lavere i serum skyldes det ikke at virus opkoncentreres og bortkastes med serum. Forklaringen kan være at virus fixeres i eksempelvis fibrin, og ikke frigøres ved homogenisering forud for titrering, eller at virus neutraliseres af specifikke antistoffer eller uspecifikke faktorer i blodet. Der blev fundet neutraliserende antistoffer mod porcint parvovirus men ikke bovint parvovirus.

Den højest opnåelige titer ved opløsning af koagelet (som det ses ved 5°, 20° og 35°C) er teoretisk 0,7 log<sub>10</sub> lavere end virustiteren i nulprøven af koagel. Under inkubationen ved 20°C stiger titeren imidlertid til  $10^{5,5}$  TCID<sub>50</sub>/50 $\mu$ l, hvilket tyder på at en del af viruspartiklerne bindes i koagelet, således at det bliver utilgængeligt ved titrering af koagelprøver, men at virus frigøres ved den proteolytiske nedbrydning af koagelet. Den lave titer i udgangsmaterialet skyldes således en kombination af neutraliserende faktorer i serum (irreversibel) og en reversibel binding i koagelet.

### SPV:

Udgangstiteren kan ikke beregnes da der er tale om naturligt inficeret væv. SPV-replikationen sker i celler i det lymfomyeloide system (Korn & Matthaeus, 1976) og virus vil derfor primært være tilstede i de parenchymatøse celler. Ved homogeniseringen frigøres disse fra bindevævet (stroma) og suspenderes. Inficerede celler vil relativt let disintegreres (ved homogenisering og centrifugering) og reisolerings-procenten ved titrering må derfor forventes at være høj.

## Inaktiveringsforløb

Resultaterne af infektivitetstitreringerne er afbildet grafisk som inaktiveringskurver i følgende figurer.

Figur 1 - 10: PPV ved inkubationstemperaturer i området 5°-80°C i hhv. gylle, udrådnede biomasse og Eagles MEM.

Figur 11-18: SPV ved inkubationstemperaturer i området 5°-70°C i hhv. gylle, udrådnede biomasse og Eagles MEM.

Figur 19: SPV og PPV i gylle og Eagles MEM ved 55°C

Figur 20: PPV i gylle ved inkubationstemperaturer i området 50°-80°C. (én figur med logaritmisk tidsskala)

Figur 21: SPV i gylle ved inkubationstemperaturer i området 50°-80°C. (én figur med logaritmisk tidsskala)

### Supplerende figurer:

Figur 22: På grundlag af inaktiveringskurverne i figur 20 og 21 er udledt tiden for en  $4 \log_{10}$ -enheders reduktion for de to virus ved en række temperaturer. Disse  $4 \log_{10}$ -inaktiveringstider er grafisk afbildet som funktion af temperaturen i figur 22.

Figur 23: På grundlag af en række undersøgelser beskrevet i litteraturen er beregnet decimeringstiden for forskellige enterovirus tilsat som suspensioner til forskellige typer og modeller af biogasreaktorer. Disse inaktiveringstider er afbildet som funktion af (reaktor-)temperaturen. Tilsvarende er decimeringstiden beregnet på grundlag af det samlede inaktiveringsforløb for svinepestvirus og porcint parvovirus ud fra Bøtters resultater (1990).

For både SPV og PPV ses en øget inaktiveringshastighed med stigende temperatur. Generelt ses en faldende inaktiveringshastighed med tiden, dog ikke ved høje temperaturer med meget høj inaktiveringshastighed. Trods dette fås ved lineær regression høje regressionskoefficienter for en stor del af kurverne. Inaktiveringshastigheder beregnet ved lineær regression er angivet i Tabel 1 og 2.

Ved alle temperaturer fremgår at PPV er langt mere resistent end SPV (mellem 50-200 fold); som eksempel ses inaktiveringen af de 2 virus i væv ved 55°C afbildet i figur 19: Kurveforløbene er af samme type men forskudt idet SPV inaktiveres ca. en faktor 100 hurtigere end PPV ved 55°C. Ved sammenligning af inaktiveringshastighederne for PPV og SPV (se tabel 1 og 2), fremgår at i temperaturområdet 50°-65°C inaktiveres SPV 90-350 gange hurtigere end PPV.

Hverken for PPV eller SPV ses signifikant forskel på inaktiveringshastigheden i væv i gylle hhv. udrådnnet biomasse. Dette er gældende både ved 50°C og 70°C, jvf figur 4, 8, 14 og 18.

### Inaktivering af PPV

Væv i gylle:

Ved 5°, 20° og 35°C er inaktiveringshastigheden så lav at koagelet opløses inden reduktionen er målelig. Virustitern i gyllen stiger hurtigt initialt som følge af opløsning af koagel, og stigningen fortsætter efter at der ikke længere kan genfindes koagel i gyllen.

Ved inkubationstemperaturer i området 50°C til 75°C for PPV ses en hurtigere inaktivering initialt (over de første 0,5-1 log<sub>10</sub>-enheder) end senere i inaktiveringsforløbet. Alligevel opnås generelt høje regressionskoefficienter ved lineær regression ved temperaturer >55°C (dog ikke ved 70°C). Dette skyldes at den initiale fase med høj inaktiveringshastighed er kortvarig.

Ved 50°C kan måles en decimering indenfor de første 10-20 timer, men i de efterfølgende 2 dage ses intet titerfald. Koagelet opløses på under 7 dage inden yderligere titerfald kan måles. Inaktiveringshastigheden øges med stigende temperatur i området 50°-80°C, fra 82 timer/4 log<sub>10</sub> ved 55°C til 0.5 time/4 log<sub>10</sub> ved 80°C.

Væv i Eagles MEM:

Ved sammenligning af inaktiveringskurverne for PPV i væv i medium hhv. i gylle ses at der er en tendens til en hurtigere inaktivering initialt i medium ved temperaturer >55°C. Dette er dog kortvarigt og inaktiveringen i medium overgås af inaktiveringen i gylle i resten af forløbet.

### Inaktivering af SPV

Væv i gylle:

Ved temperaturer >75°C sker inaktiveringen af SPV momentant, idet det ikke genfindes i prøver udtaget efter 4 minutters inkubation. Både i Eagles MEM, gylle og udrådet biomasse ses en tendens til faldende inaktiveringshastighed for SPV, men i lavere grad end for PPV. Ved lineær regression fås således høje korrelationskoefficienter (0,93 -0,99) for SPV i væv i gylle (tabel 1).

Ved 5°C (simulerende opbevaring i gylletanke i vinterhalvåret) ses en langsom inaktivering på ca 4 log<sub>10</sub>/70 dage. Ved 20°C (simulerende opbevaring i gylletanke i sommerhalvåret) sker inaktiveringen en del hurtigere, nemlig 4 log<sub>10</sub> på under 6,6 dage.

Væv i Eagles MEM:

Inaktiveringsforløbet i VIM ved 35°-55°C er i højere grad bifasisk end for VIG. Der ses en hurtigere inaktivering initialt, efterfulgt af langsomt inaktiveringsforløb der er mere lineært end i VIG. Der ses ikke signifikant forskel mellem inaktiveringsforløbet i VIM og VIG ved temperaturer >60°C. For SPV er inaktiveringen meget hurtig ved de høje temperaturer, hvilket i kombination med afstanden mellem prøveudtag kan være årsag til at der ikke ses signifikant forskel mellem inaktivering i gylle og i medium.

### Holdetider for sikring af 4 log<sub>10</sub> reduktion af SPV og PPV

I tabel 3 og 4 er angivet 4 log<sub>10</sub> reduktionstider, dels beregnet ved lineær reduktion dels aflæst direkte på inaktiveringskurverne efter konstruktion af et glat kurveforløb. I de tilfælde hvor inaktiveringskurverne er tæt på et lineært forløb er de 2 værdier for 4 log<sub>10</sub> reduktionstiden næsten ens (indenfor standardafvigelsen); afvigelserne er generelt mindst for SPV. For PPV er der signifikant forskel mellem de 2 værdier ved 65°C og ved 70°C.

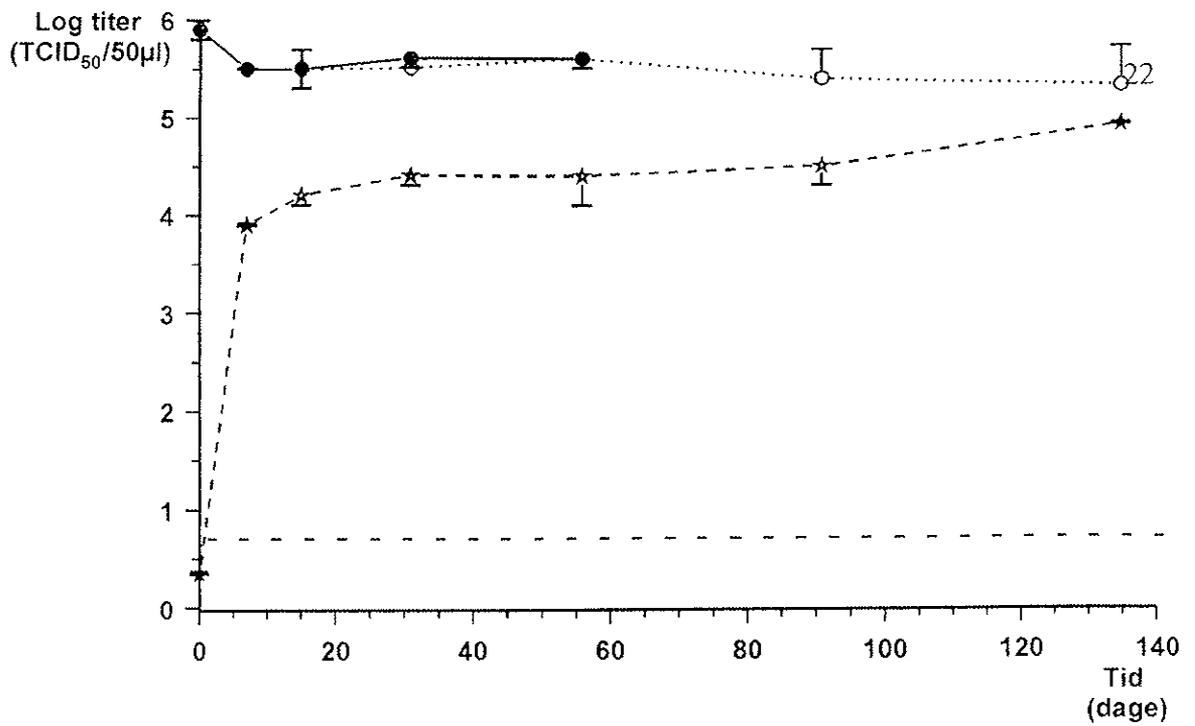
Ved konstruktionen af graferne i figur 22, der viser holdetiden til sikring af en 4 log<sub>10</sub> reduktion som funktion af inkubationstemperaturen, er anvendt 4 log<sub>10</sub> reduktionstiderne aflæst direkte på kurverne fremfor de værdier som er opnået ved lineær regression; dette er grundet den store usikkerhed ved den lineære regression, som skyldes at målehyppigheden er afgørende for hvornår det første negative resultat ved titering ses, og det sidste punkt får stor vægt ved lineær regression (bl.a. fordi der er langt mellem punkterne sidst i inaktiveringsforløbene).

## FIGUR 1-22

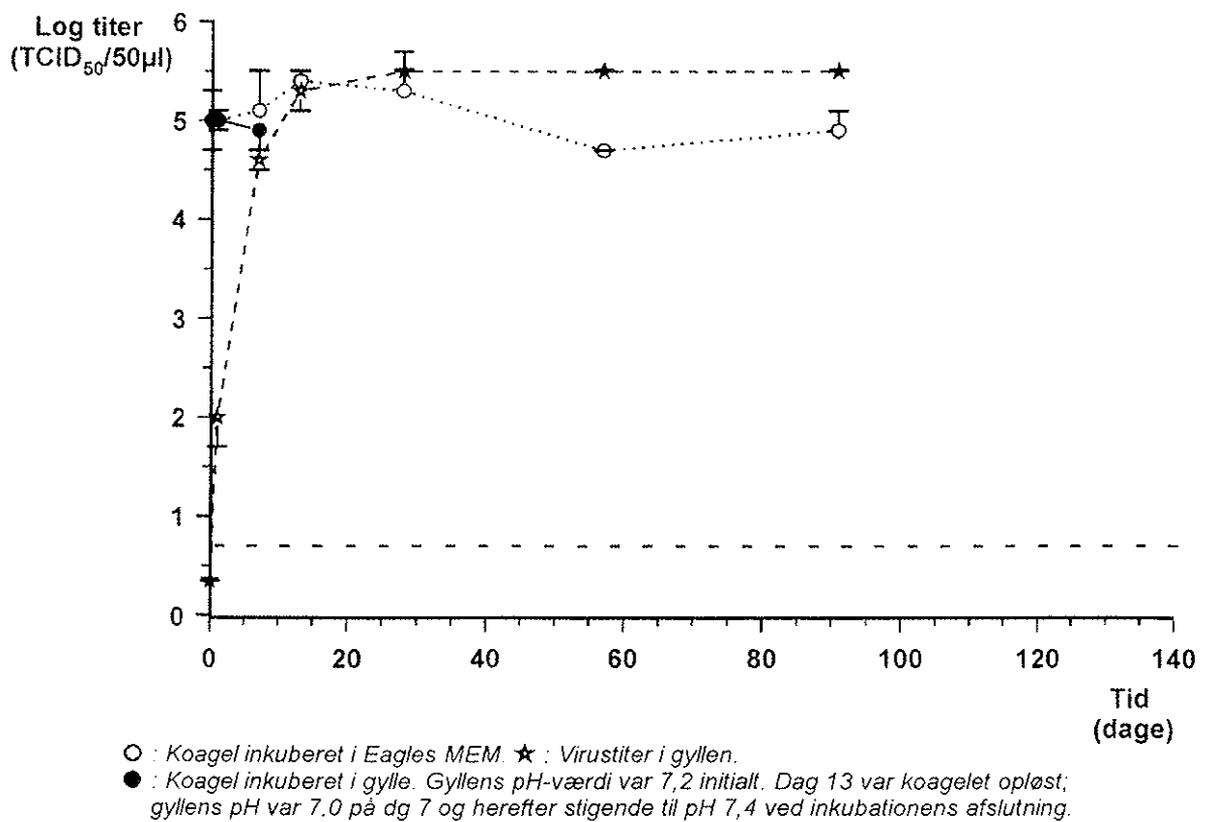
Hvert punkt i figurerne 1-21 angiverer en middelværdi af 2 målinger (svarende til 2 vævsprøver fra samme flaske). Intervallet mellem de to målinger er angivet ved en lodret barre, som for overskuelighedens skyld kun angiver den øvre eller den nedre del af intervallet.

Detektionsgrænsen for PPV er  $10^{0,7}$  TCID<sub>50</sub>/50 $\mu$ l. Titreringer hvor PPV ikke er genfundet er grafisk angivet som  $10^{0,35}$  TCID<sub>50</sub>/50 $\mu$ l. Angivelser mellem  $10^{0,35}$ - $10^{0,7}$  TCID<sub>50</sub>/50 $\mu$ l repræsenterer et gennemsnit af en værdi over detektionsgrænsen og  $10^{0,35}$  TCID<sub>50</sub>/50 $\mu$ l.

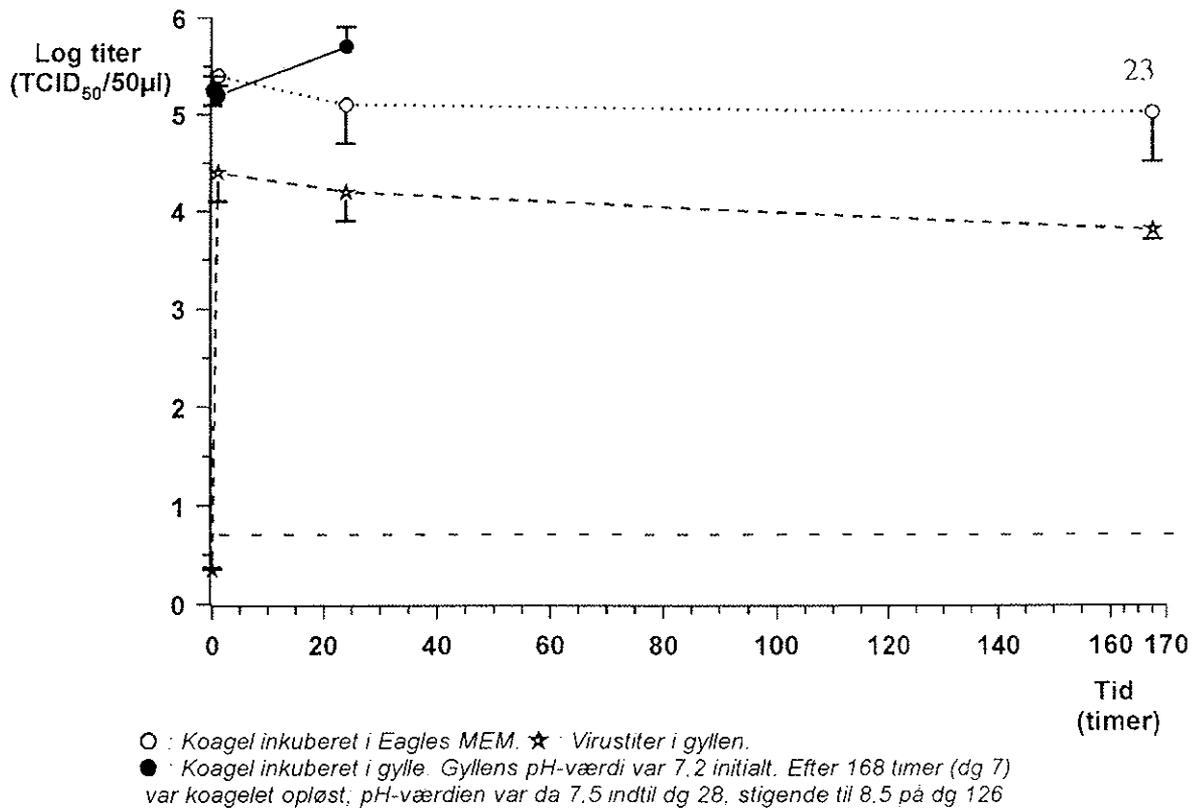
Tilsvarende for SPV hvor detektionsgrænsen er  $10^{1,7}$  TCID<sub>50</sub>/50 $\mu$ l og titreringer hvor virus ikke genfundet er angivet som  $10^{0,85}$  TCID<sub>50</sub>/50 $\mu$ l. I enkelte tilfælde genfindes SPV i milt fra Eagles medium i koncentrationer under den sædvanlige detektionsgrænsen; disse værdier anvendes da ved beregning af gennemsnit for de 2 målinger.



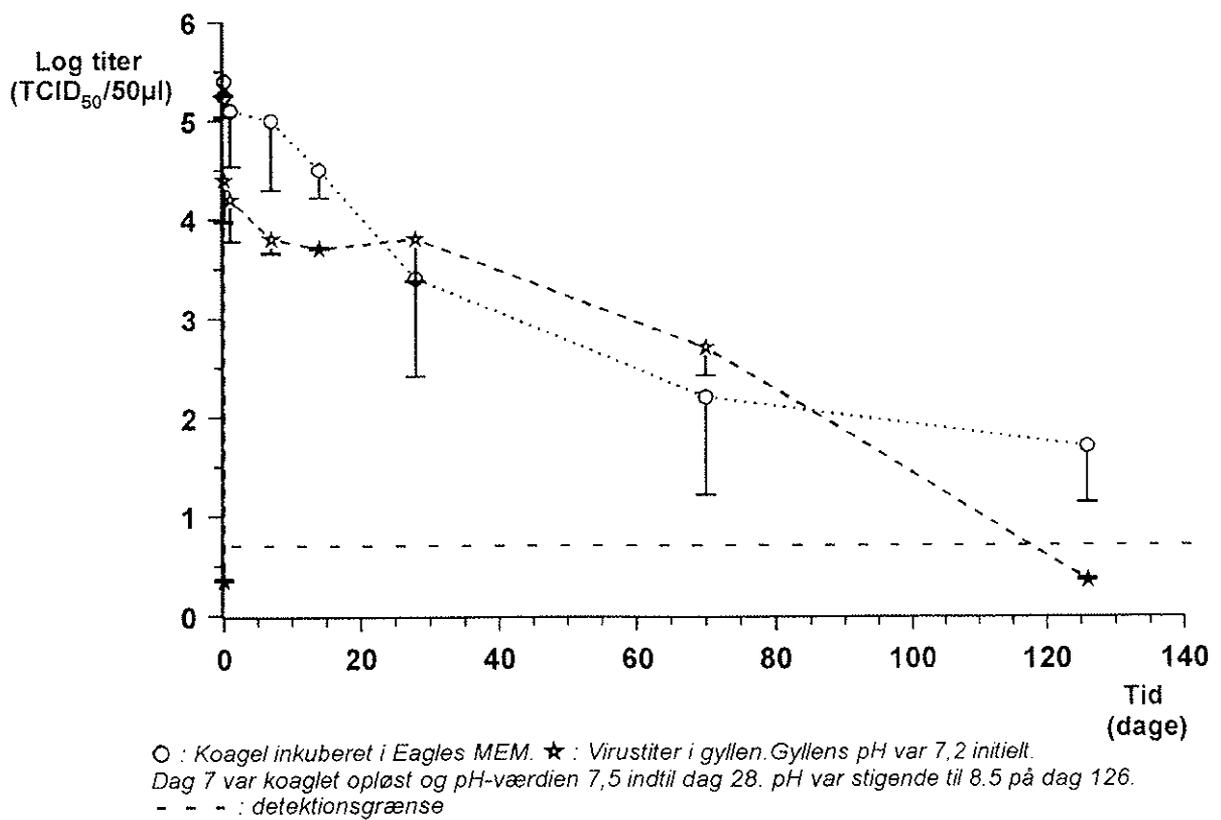
Figur 1 Inaktiveringskurver for porcint parvovirus i blodkoagel ved 5°C



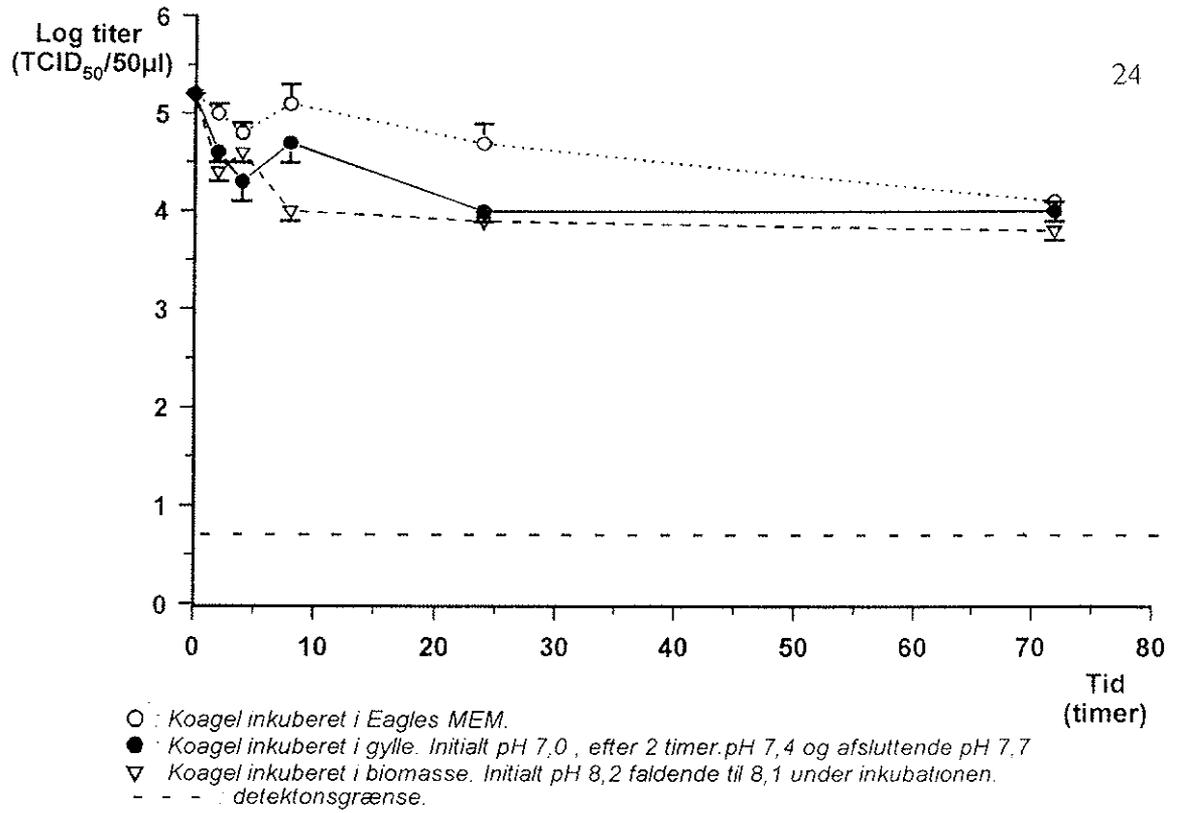
Figur 2 Inaktiveringskurver for porcint parvovirus i blodkoagel ved 20°C



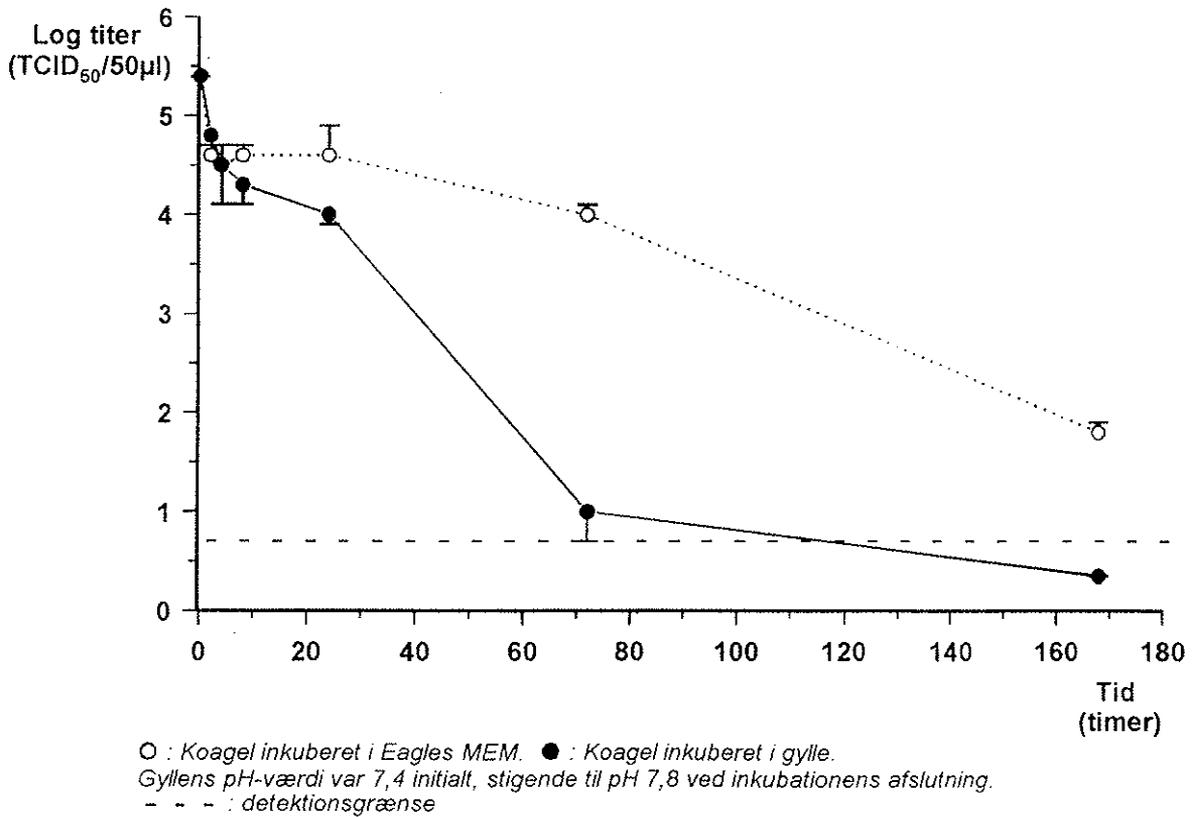
Figur 3a Inaktiveringskurver for porcint parvovirus i blodkoagel ved 35°C



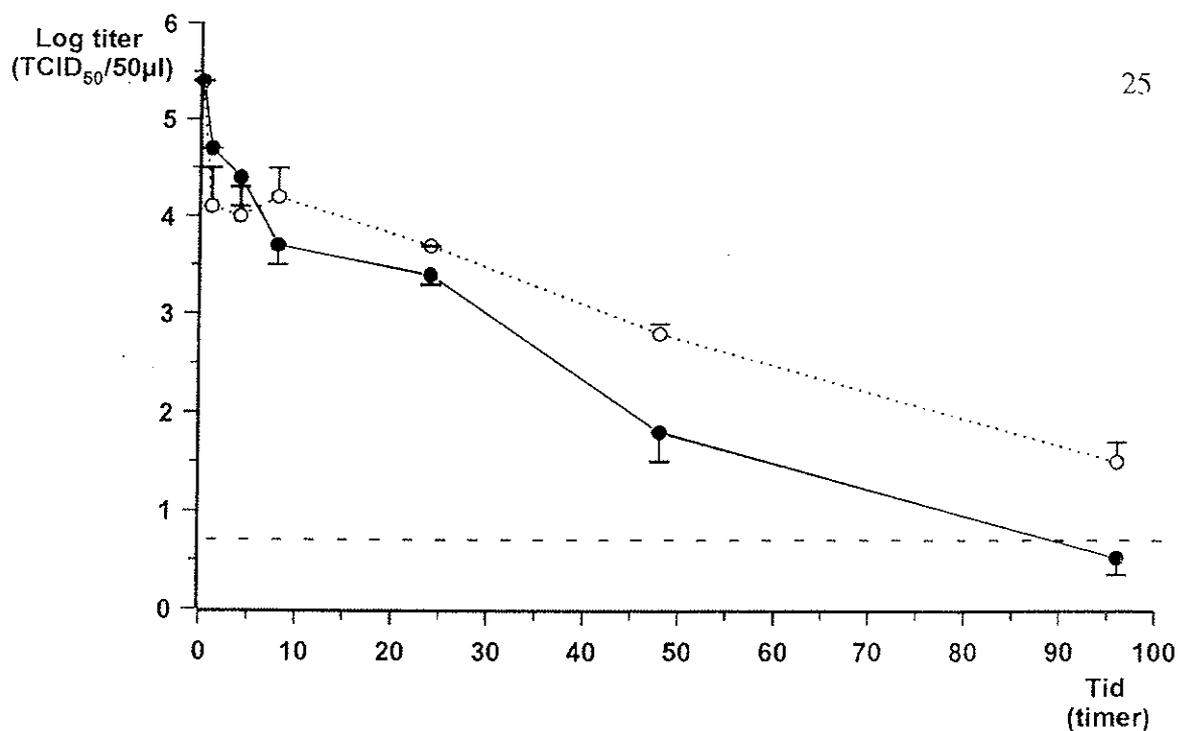
Figur 3b Inaktiveringskurver for porcint parvovirus ved 35°C



Figur 4 Inaktiveringskurver for porcint parvovirus i blodkoagel ved 50°C

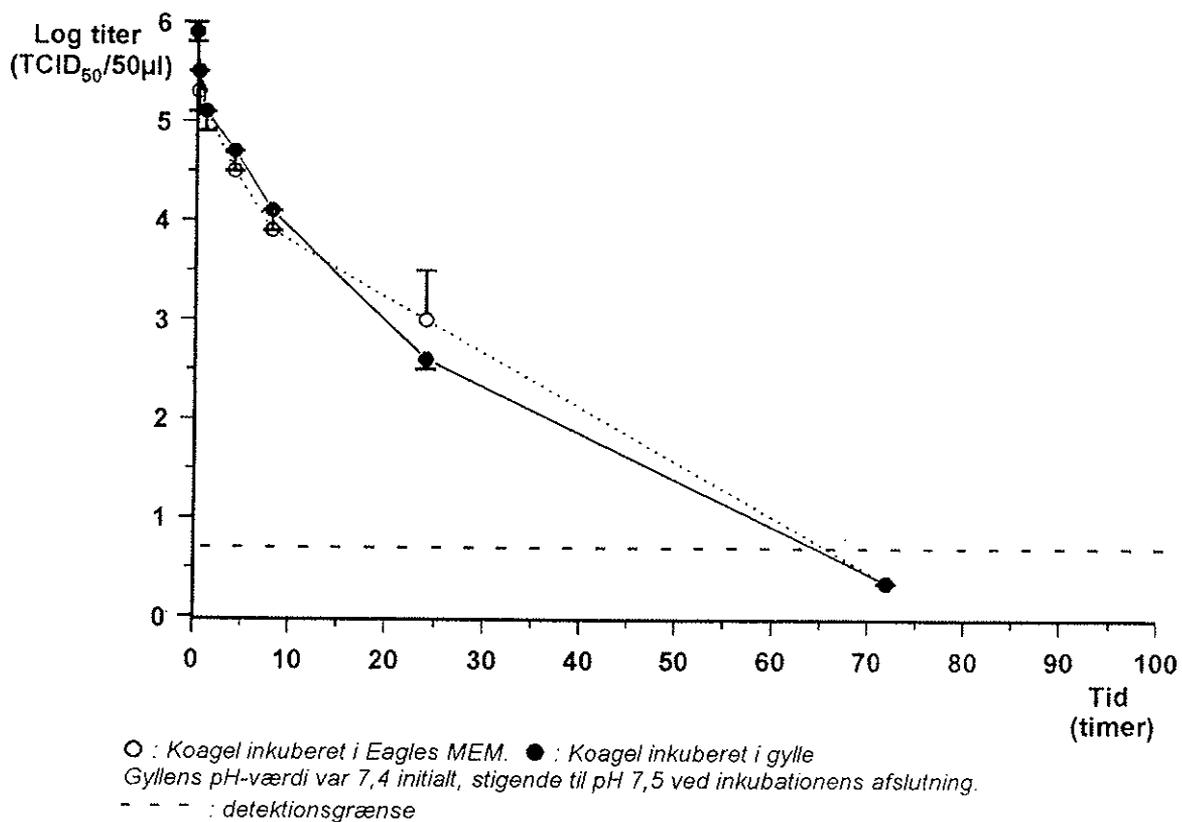


Figur 5 Inaktiveringskurver for porcint parvovirus i blodkoagel ved 55°C



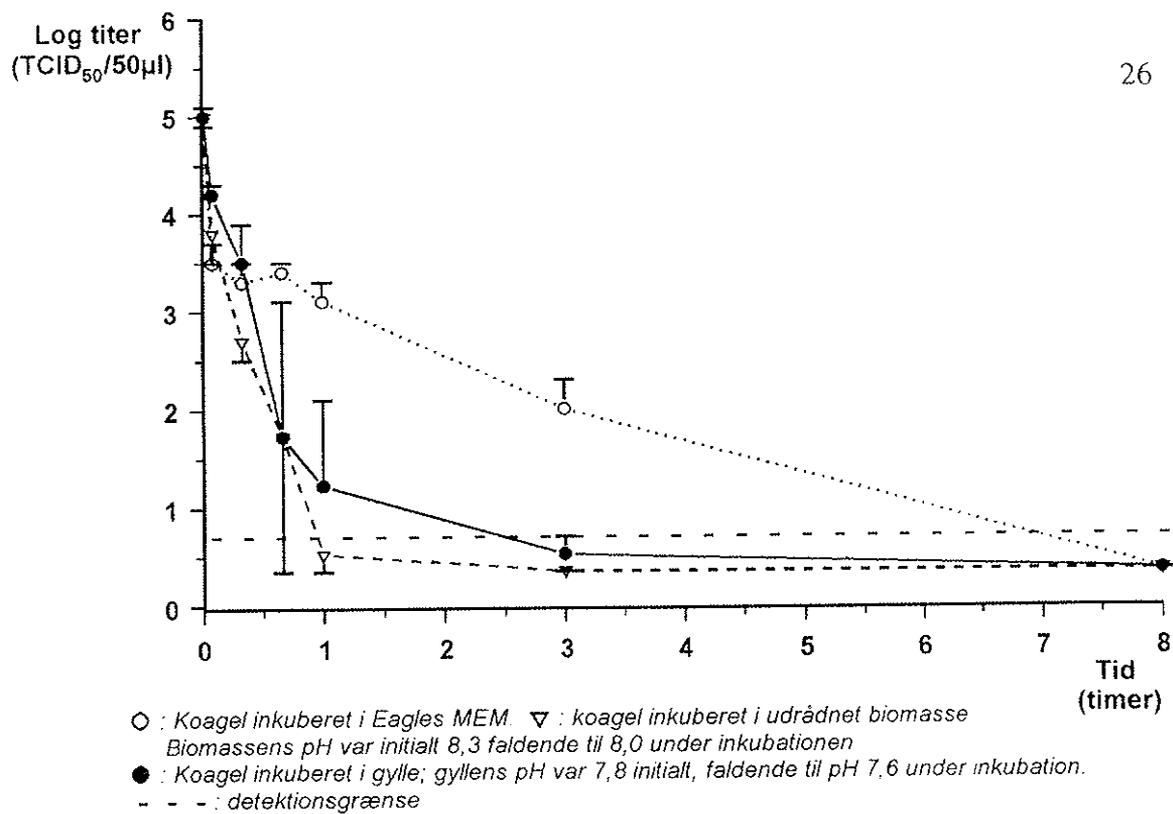
○ : Koagel inkuberet i Eagles MEM. ● : Koagel inkuberet i gylle.  
 Gyllens pH-værdi var 7,5 initialt, stigende til pH 7,8 ved inkubationens afslutning.  
 - - - : detektionsgrænse

Figur 6 Inaktiveringskurver for porcint parvovirus i blodkoagel ved 60°C

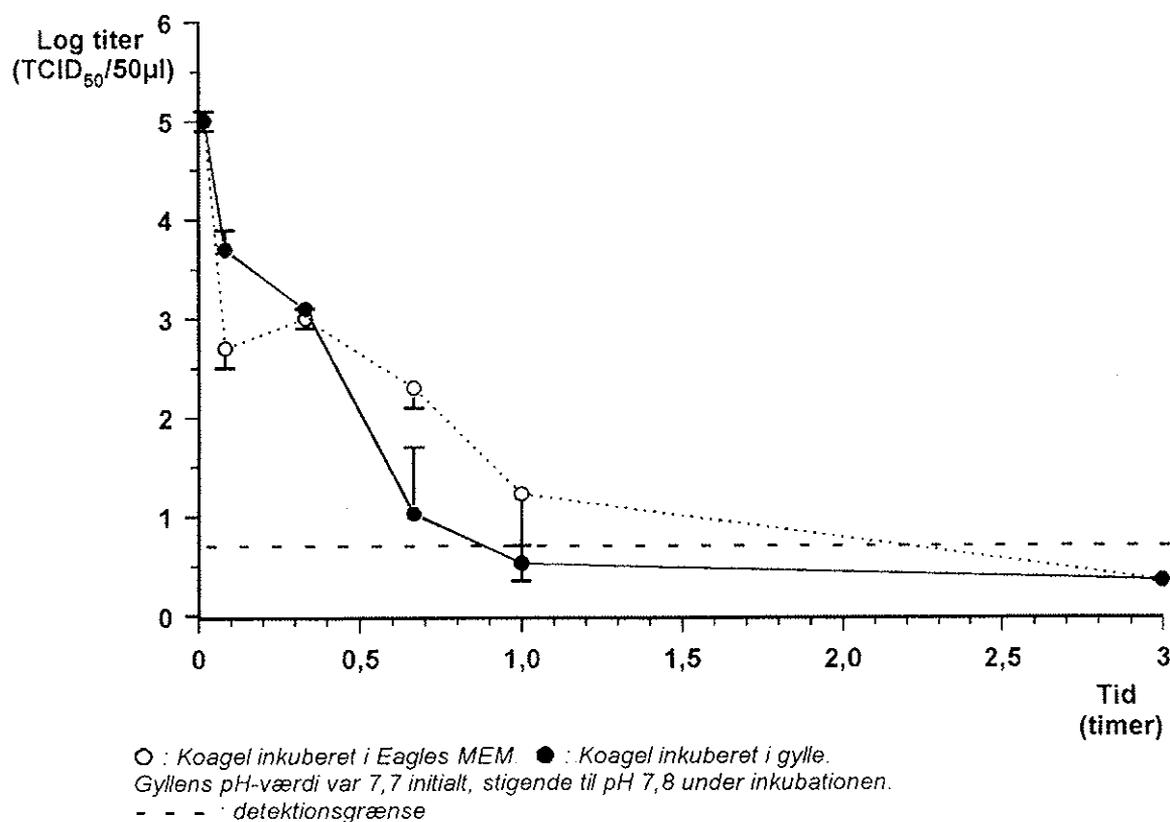


○ : Koagel inkuberet i Eagles MEM. ● : Koagel inkuberet i gylle  
 Gyllens pH-værdi var 7,4 initialt, stigende til pH 7,5 ved inkubationens afslutning.  
 - - - : detektionsgrænse

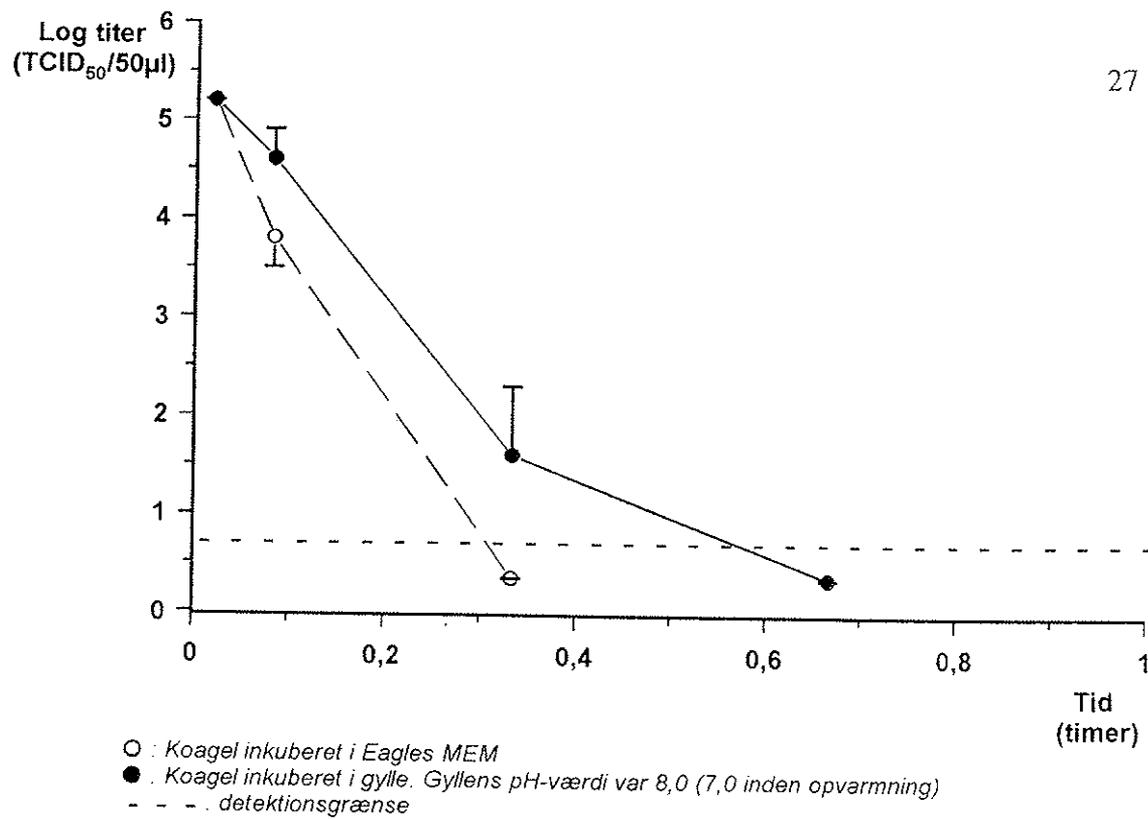
Figur 7 Inaktiveringskurver for porcint parvovirus i blodkoagel ved 65°C



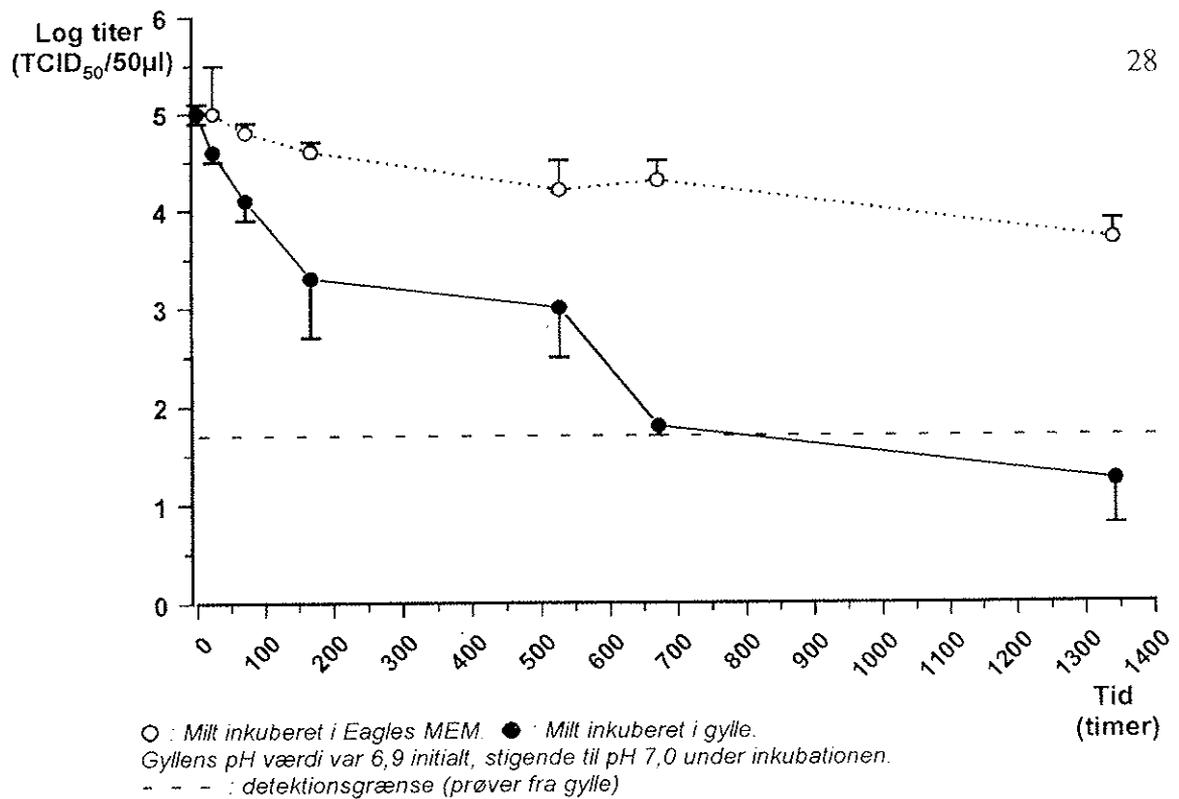
Figur 8 Inaktiveringskurver for porcint parvovirus i blodkoagel ved 70°C



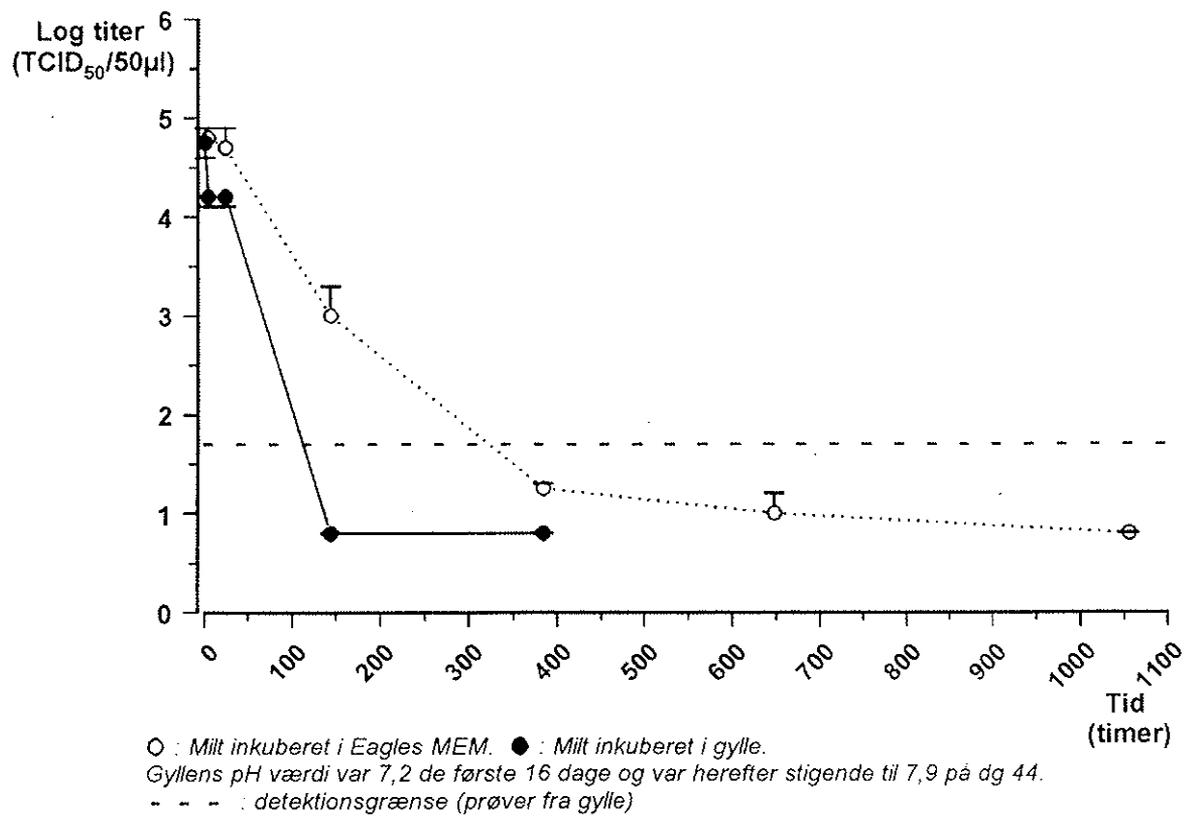
Figur 9 Inaktiveringskurver for porcint parvovirus i blodkoagel ved 75°C



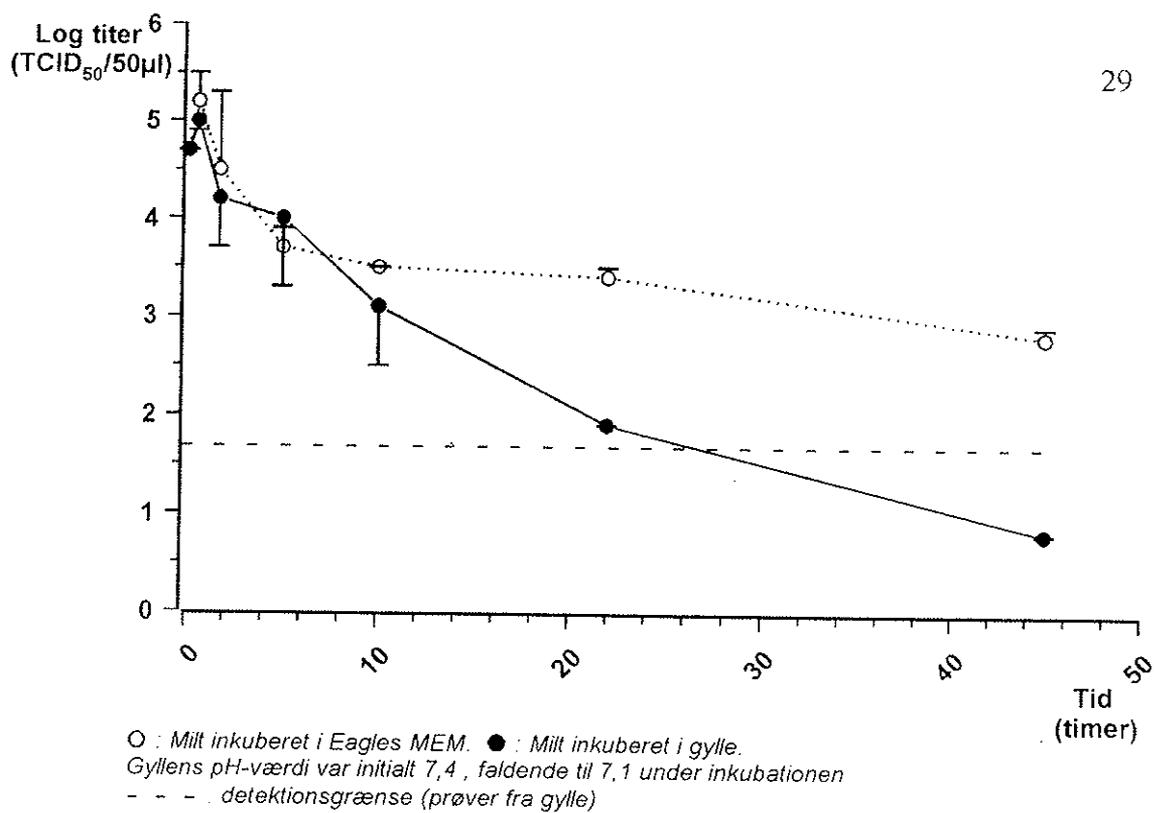
Figur 10 Inaktiveringskurver for porcint parvovirus i blodkoagel ved 80°C



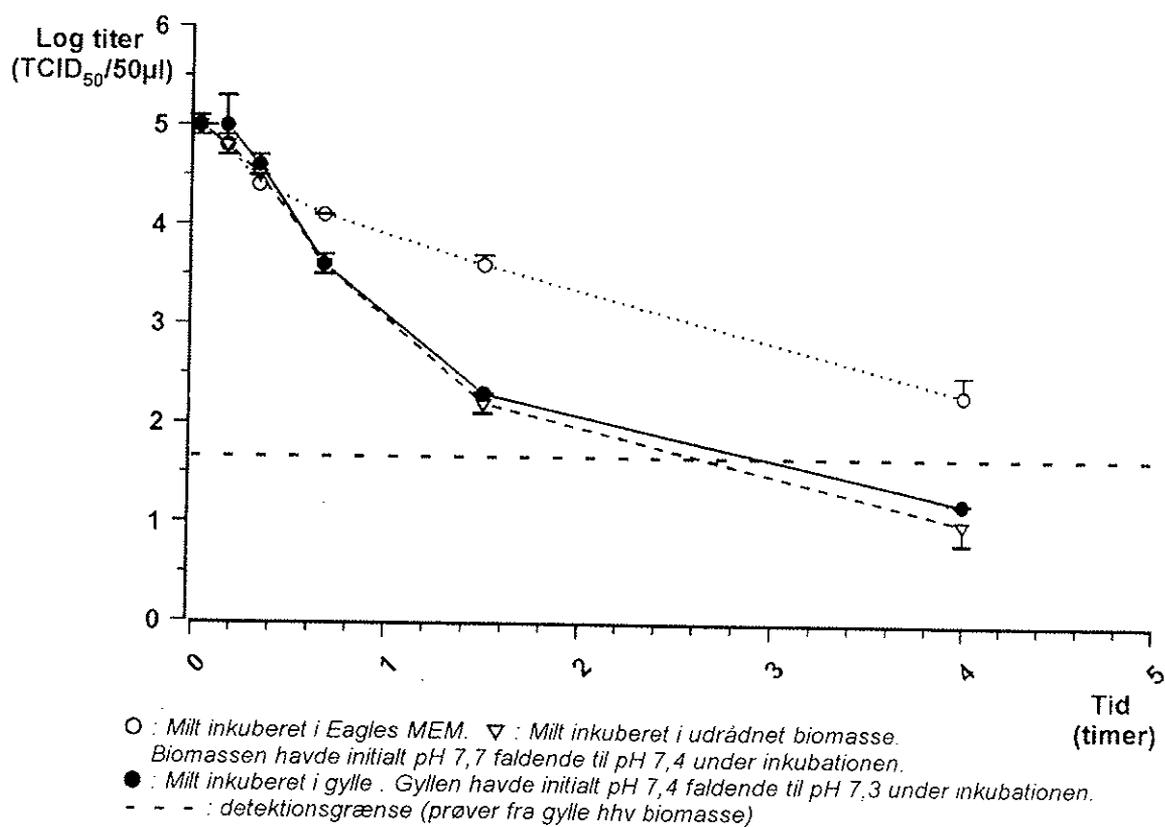
Figur 11 Inaktiveringskurver for svinepestvirus i miltvæv ved 5°C



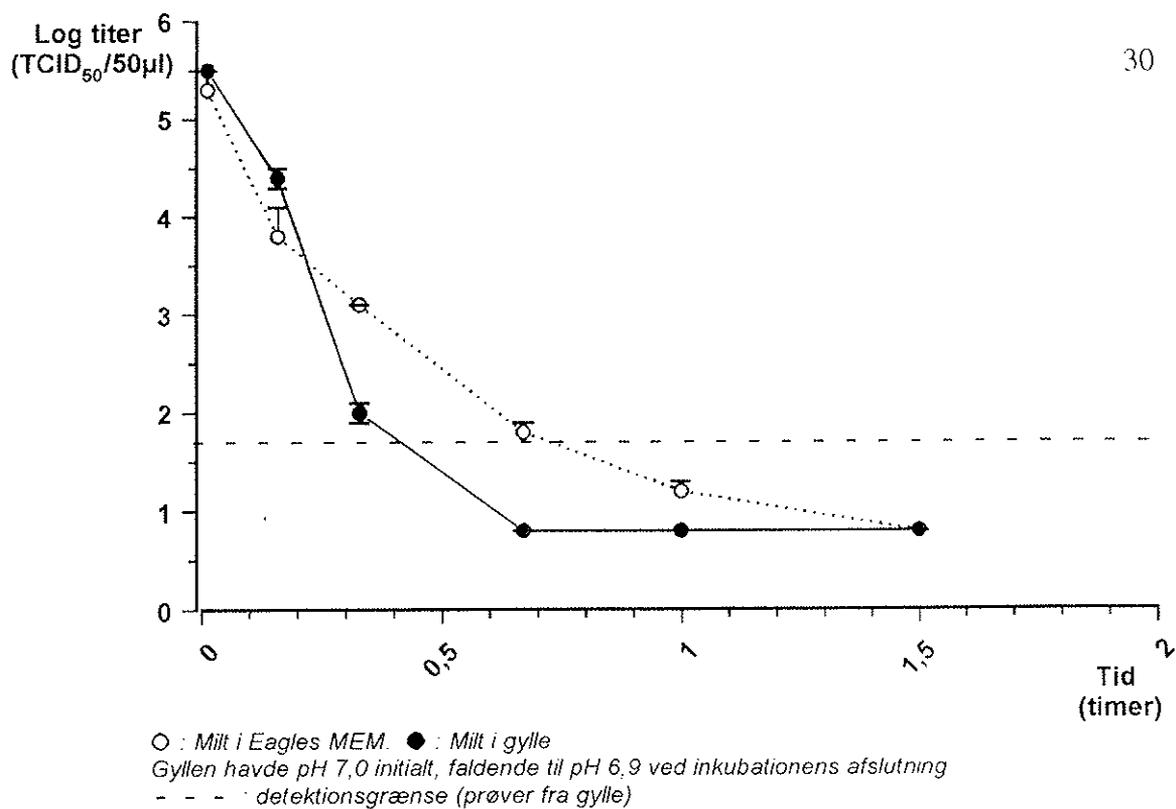
Figur 12 Inaktiveringskurver for svinepestvirus i miltvæv ved 20°C



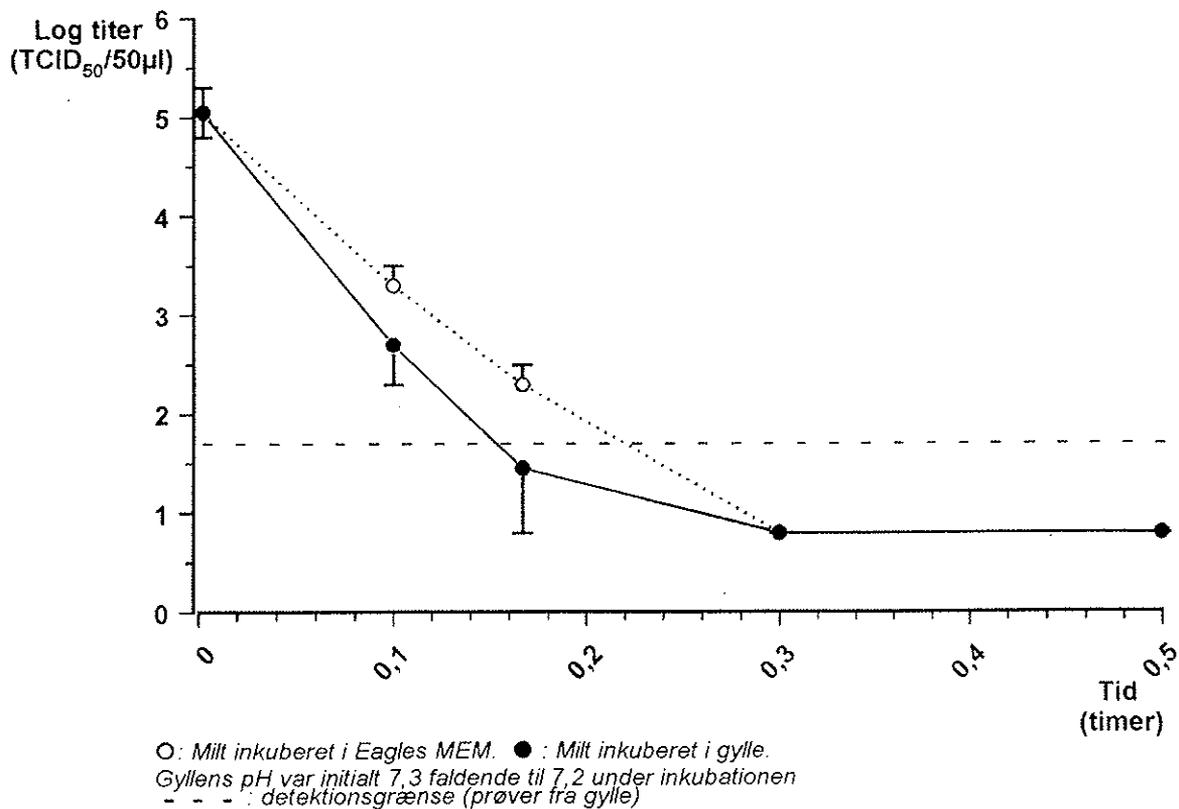
Figur 13 Inaktiveringskurver for svinepestvirus i miltvæv ved 35°C



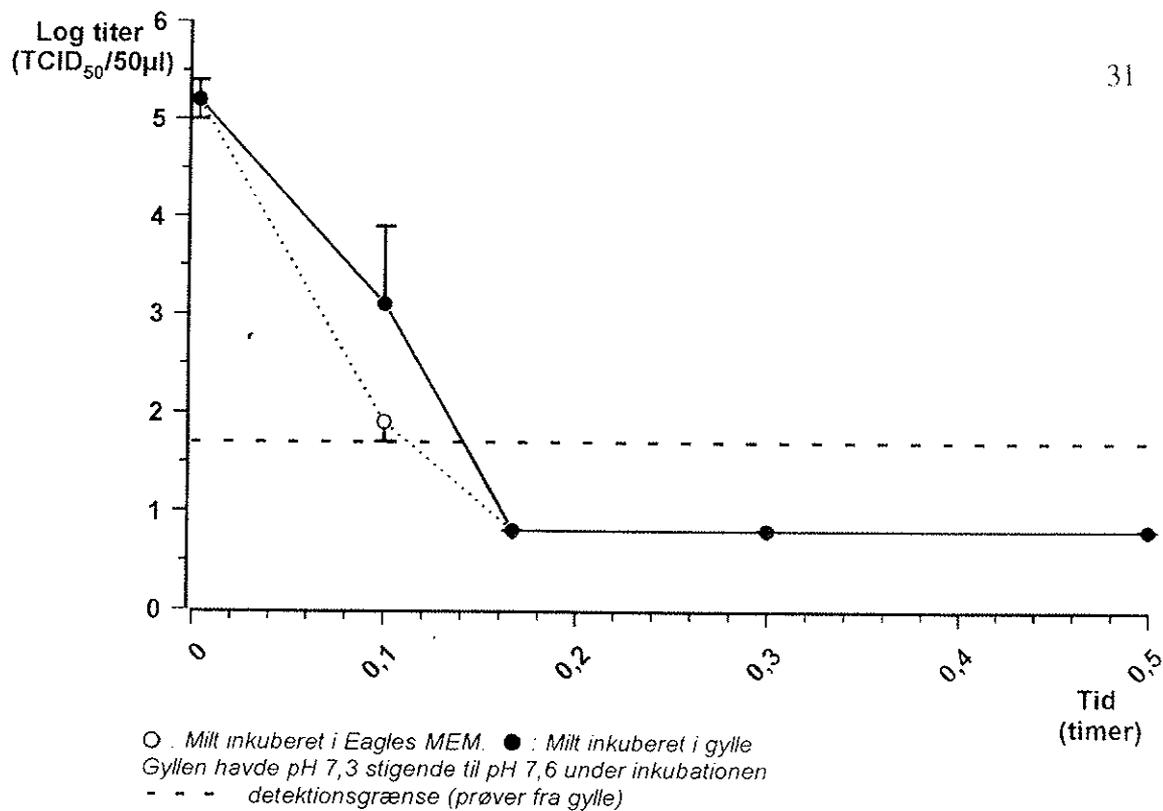
Figur 14 Inaktiveringskurver for svinepestvirus i miltvæv ved 50°C



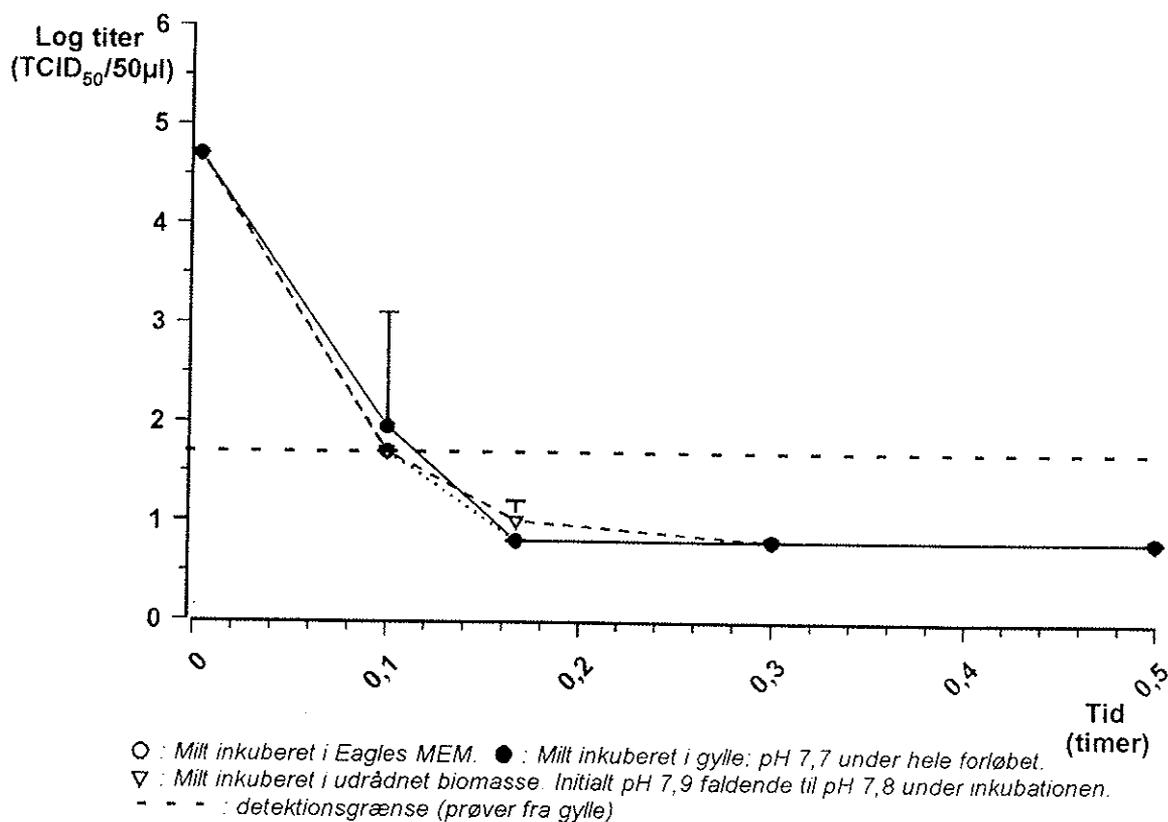
Figur 15 Inaktiveringskurver for svinepestvirus i miltvæv ved 55<sup>0</sup>C



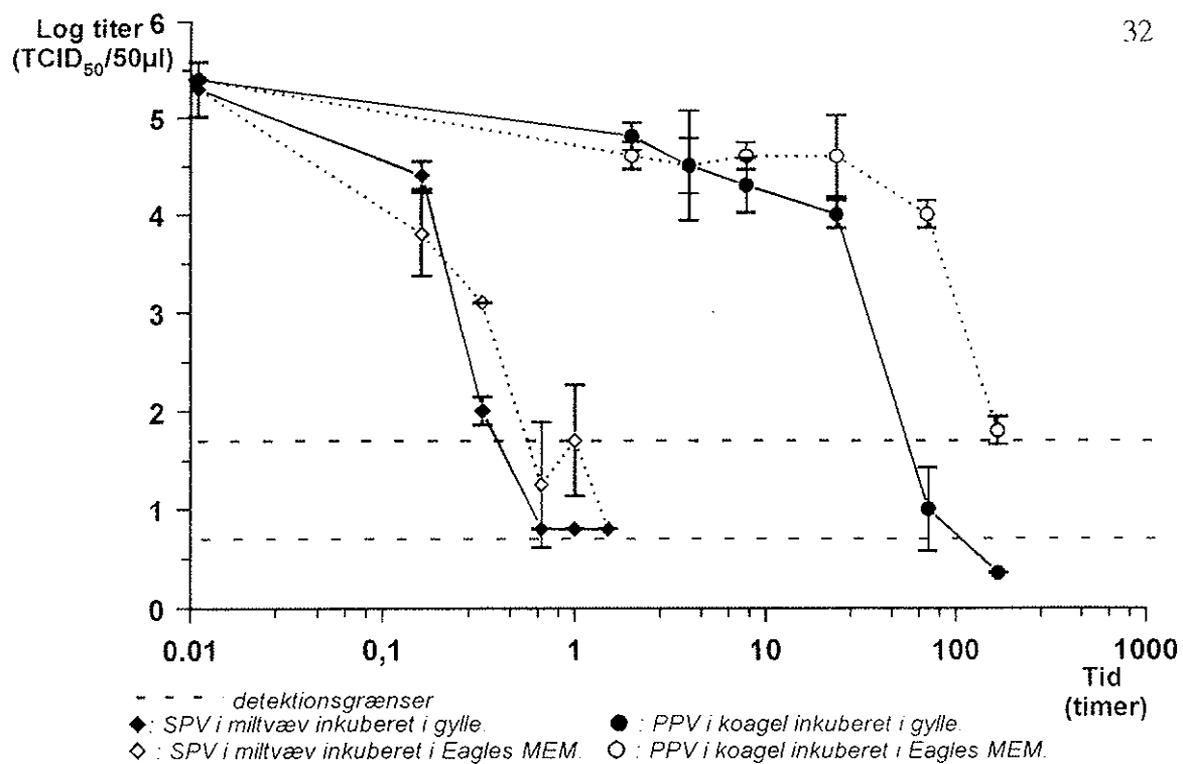
Figur 16 Inaktiveringskurver for svinepestvirus i miltvæv ved 60<sup>0</sup>C



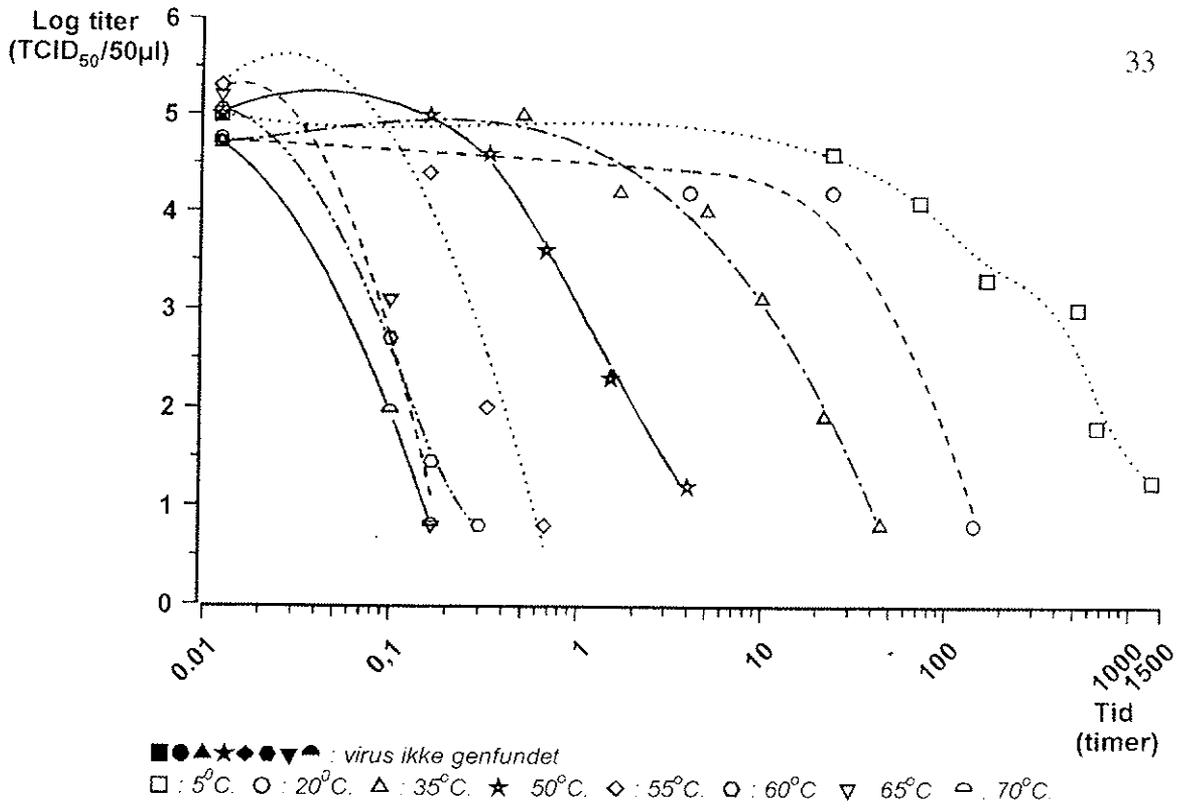
Figur 17 Inaktiveringskurver for svinepestvirus i miltvæv ved 65°C



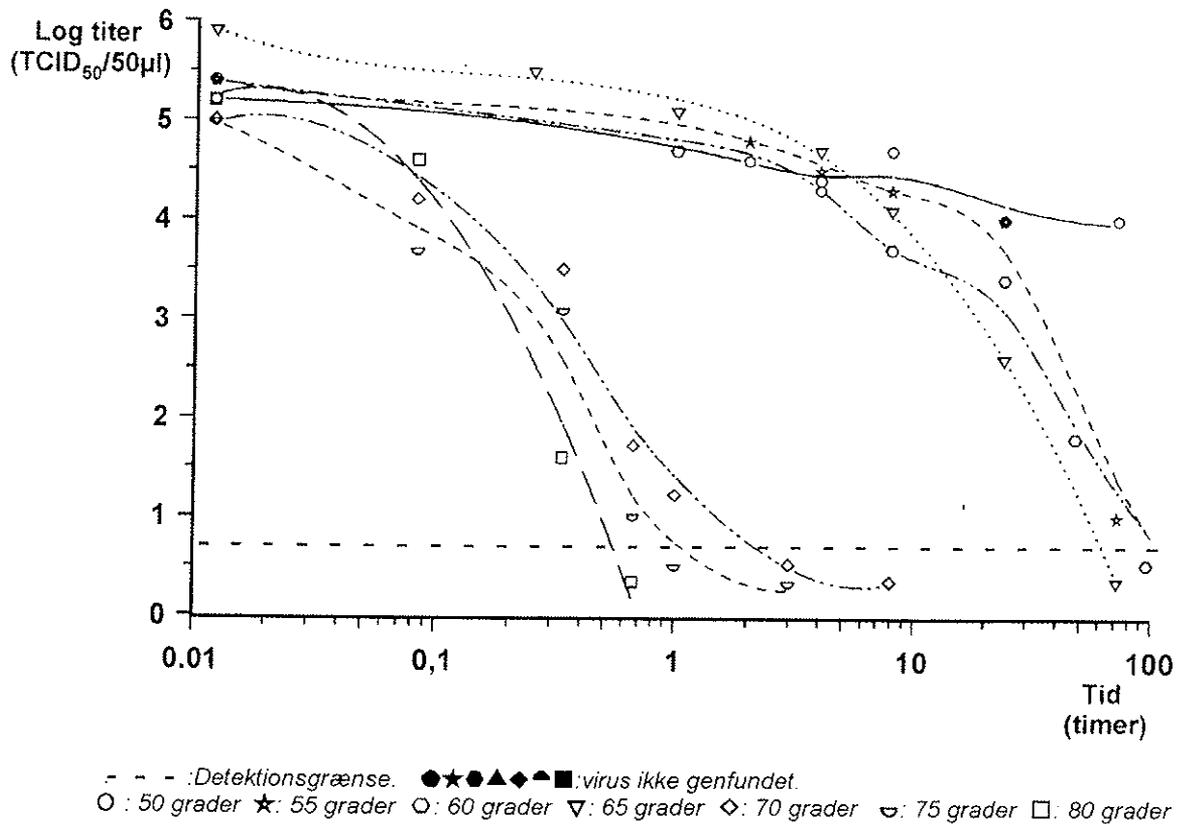
Figur 18 Inaktiveringskurver for svinepestvirus i miltvæv ved 70°C



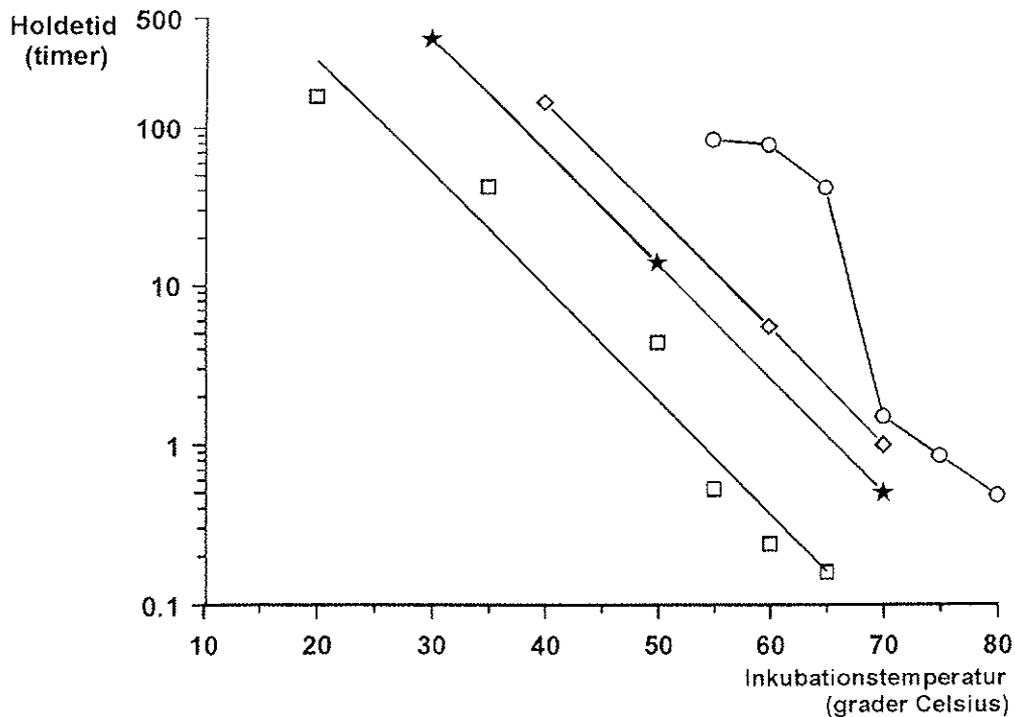
Figur 19 Inaktivering af porcint parvovirus og svinepestvirus ved 55°C



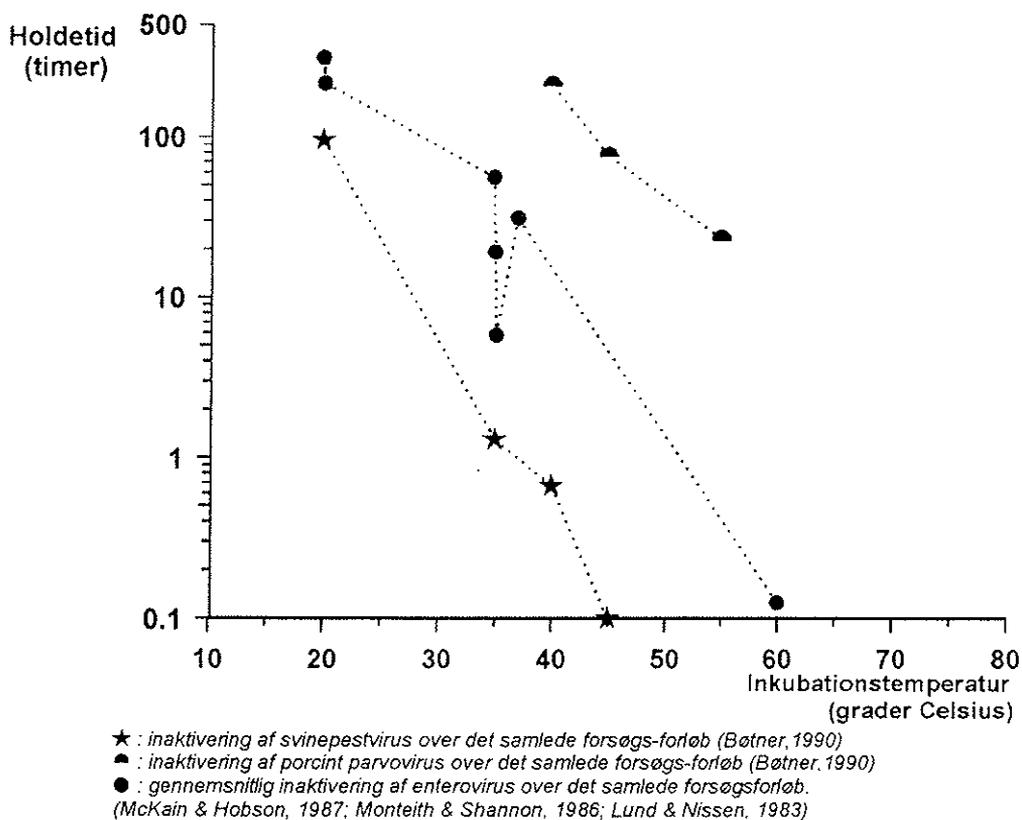
Figur 20 Inaktivering af svinepestvirus i miltvæv i gylle.



Figur 21 Inaktivering af porcint parvovirus i koagel inkuberet i gylle.



Figur 22 Virusinaktivering i væv i gylle.  
 Den påkrævede holdetid til opnåelse af  $4 \log_{10}$  enheders reduktion, som funktion af temperaturen



Figur 23 Virusinaktivering i gylle under anaerobe forhold.  
 Den påkrævede holdetid til opnåelse af  $1 \log_{10}$  enheders reduktion, som funktion af temperaturen

Tabel 1: Inaktiveringshastighed for SPV i væv;  
beregnet ved lineær regression.

Inkubations temperatur	væv i Eagles MEM		væv i gylle	
	Inaktiverings hastighed $\log_{10}/\text{time}$	regressions- koefficient r	Inaktiverings hastighed $\log_{10}/\text{time}$	regressions- koefficient r
5°C (STD)	$9,4 \cdot 10^{-4}$ ( $1,1 \cdot 10^{-4}$ )	0,97	0,0026 (0,0005)	0,93
20°C (STD)	0,0041 (0,0010)	0,89	0,026 (0,002)	0,99
35°C (STD)	0,043 (0,013)	0,83	0,090 (0,012)	0,96
50°C (STD)	0,64 (0,07)	0,98	0,97 (0,19)	0,93
55°C (STD)	2,8 (0,57)	0,93	7,3 (1,5)	0,95
60°C (STD)	14,2 (1,22)	0,99	14,1 (3,6)	0,94
65°C (STD)	27 (4,8)	0,99	26,3 (3,6)	0,99
70°C (STD)	26 (5,9)	0,98	26 (4,0)	0,99

Tabel 2: Inaktiveringshastighed for PPV i væv;  
beregnet ved lineær regression.

Inkubations temperatur	væv i Eagles MEM		væv i gylle	
	Inaktiverings hastighed $\log_{10}/\text{time}$	regressions- koefficient $r$	Inaktiverings hastighed $\log_{10}/\text{time}$	regressions- koefficient $r$
35°C (STD)	$1,3 \cdot 10^{-3}$ ( $1,8 \cdot 10^{-4}$ )	0,95	-	-
50°C (STD)	0,014 (0,002)	0,94	0,011 (0,06)	0,68
55°C (STD)	0,018 (0,002)	0,96	0,054 (0,005)	0,98
60°C (STD)	0,032 (0,005)	0,94	0,046 (0,006)	0,95
65°C (STD)	0,069 (0,008)	0,96	0,071 (0,009)	0,96
70°C (STD)	0,46 (0,09)	0,92	1,3 (0,5)	0,82
75°C (STD)	2,8 (1,1)	0,84	4,4 (0,7)	0,96
80°C (STD)	15,0 (1,4)	0,996	7,7 1,5	0,97

Tabel 3: 4 log<sub>10</sub>enheders inaktivering af SPV.

Inkubationstemperatur	lineær regression timer/4 log <sub>10</sub>	grafisk aflæst timer/4 log <sub>10</sub>
5°C (STD)	1515 (278)	1700
20°C (STD)	152 (14)	159
35°C (STD)	44 (6)	41
50°C (STD)	4,1 (0,8)	4,4
55°C (STD)	0,55 (0,11)	0,53
60°C (STD)	0,28 (0,07)	0,24
65°C (STD)	0,15 (0,02)	0,16
70°C (STD)	0,16 (0,02)	0,18

Tabel 4: 4 log<sub>10</sub>enheders inaktivering af PPV.

Inkubationstemperatur	lineær regression timer/4 log <sub>10</sub>	grafisk aflæst timer/4 log <sub>10</sub>
50°C (STD)	> 354* (1942)	-
55°C (STD)	73 (7)	82
60°C (STD)	86 (11)	76
65°C (STD)	56 (7)	41
70°C (STD)	3,0 (1,0)	1,5
75°C (STD)	0,91 (0,15)	0,85
80°C (STD)	0,52 (0,10)	0,48

\* stor usikkerhed pga den begrænsede inaktivering indenfor forsøgsperioden

## Diskussion

Undersøgelsens hovedformål er at skaffe viden om inaktiveringsforløbet af naturligt forekommende virus, her vævsindlejret virus, under udrådning i biogasanlæg. Ud fra de fundne inaktiveringsforløb vil betydningen af vævsindlejringen vurderes og så vidt muligt vil resultaterne blive ekstrapoleret til andre virus. Formålet hermed er at bedre grundlaget for fastsættelse af den nødvendige holdetid i biogasreaktorerne ved behandling af risikoaffald.

En forudsætning for ekstrapolation ud fra resultaterne er at den anvendte model i rimelig grad afspejler de virkelige forhold. Den mikrobielle aktivitet i gyllen i den anvendte model er lav sammenlignet med en aktiv biogasreaktor. Under den anaerobe inkubation vil den gasproducerende mikroflora udvikles afhængigt af temperaturerne; i nærværende forsøg sås en gasproduktion mest tydeligt ved 35°C, hvor gasudviklingen begyndte i løbet af et par dage. Ved de højere temperaturer er inkubationen relativt kort (især for SPV) og gasudviklingen er ikke tydelig i forsøgsforløbet. Det mikrobielle miljø i denne model vil derfor afvige noget fra miljøet i en aktiv biogasreaktor.

Ved sammenligning af resultaterne for PPV i de tidligere forsøg på SVIV (Bøtner, 1990) og forsøgene i samarbejdet mellem SVIV og DTI (Have et al., 1994), hvor der anvendtes modelbiogasreaktorer der nøje afspejler forholdene i BFA, kunne der imidlertid ikke påvises forskel i inaktiveringshastigheden for PPV. Endvidere ses i nærværende forsøg ingen signifikant forskel mellem inaktiveringen i væv i gylle og væv i udrådningsbiomasse. Det må herudfra vurderes som rimeligt at ekstrapolere resultaterne fra nærværende forsøg vedr. betydning af indlejring af virus i væv til de virkelige forhold i BFA.

### Inaktiveringsforløb for virus indlejret i væv

Adskillige undersøgelser af virusinaktiveringen i gylle og spildevandsslam, hvor virus er tilsat som suspension (Lund et al., 1983; Bøtner, 1990; McKain & Hobson, 1987; m.fl.), viser at inaktiveringen sker meget hurtigt initialt, mens en lille fraktion af virus persisterer i lang tid. I de tidligere forsøg udført på SVIV (Bøtner, 1990) sås ved temperaturer >40°C typisk en meget hurtig reduktion over de første 2-4  $\log_{10}$ -enheder med langvarig persistens af en lille fraktion af virus. Lund et al. (1982) samt Sanders et al. (1979) har sandsynliggjort, at dette for en stor del skyldes at en del af viruspartiklerne adsorberes til partikler, hvorved de bliver mere resistente. Den tidlige fase med hurtig inaktivering som følge af direkte kontakt med biomassen kunne derfor forventes elimineret i nærværende forsøg hvor alle viruspartikler er beskyttet mod direkte kontakt med biomassen.

En generel tendens for inaktivering af virus indlejret i væv er en faldende inaktiveringshastighed, men fænomenet er som forventet langt fra så udtalt som når virus tilsættes som suspension. Ved inkubationstemperaturer i området 5°C til 75°C for PPV ses en hurtigere inaktivering initialt (over de første 0,5-1  $\log_{10}$ -enheder) end senere i inaktiveringsforløbet. Også for SPV ses en tendens til faldende inaktiveringshastighed, men inaktiveringsforløbet er ikke tydeligt bifasisk.

Ved lineær regression over inaktiveringsforløbene for SPV og PPV opnås derfor generelt høje korrelationskoefficienter sammenlignet med tidligere forsøg (Bøtner, 1990; Have et al., 1994),

især for SPV i gylle (jvf. tabel 3 og 4). Dette viser at virus i væv er mere ensartet mht. resistens end virus tilsat som suspension, formentlig som følge af at viruspartiklerne i mere ligelig grad er udsat for de inaktiverende faktorer. Årsagen til at der også ses en let faldende inaktiveringshastighed i væv, kan dels være, at virus i vævet stadig er beskyttet i forskellig grad, men det kan også skyldes et andet velkendt fænomen, nemlig at viruspartiklernes stabilitet i sig selv varierer.

#### Inaktiveringsforløb i Eagles MEM:

Inaktiveringen her vil være udtryk for varmeinaktivering, eventuelt interfererende med faktorer i vævet. Inaktiveringsforløbet for SPV i væv i medium er ved lave temperaturer (5° og 20°C) mere lineært end i gylle. Ved højere temperaturer ses derimod initialt en hurtigere inaktivering i medium end i gylle og herefter et mere lineært forløb end i gylle, dvs et mere udtalt bifasisk forløb. Dette skyldes formentlig at varmeledningen er bedre i medium end i gylle. Inaktiveringen i medium overgås imidlertid hurtigt af inaktiveringen i gylle som udtryk for en kombination af den fulde varmeeffekt, som kommer let forsinket i gyllen, og de øvrige virucide faktorer i gyllen.

Ved temperaturer > 60°C for SPV er der ikke signifikant forskel på inaktiveringshastigheden i væv i medium hhv. i gylle; dette skyldes delvist den større usikkerhed ved bestemmelse af inaktiveringshastigheden under hurtige inaktiveringsforløb (høje temperaturer) - idet små afvigelser af inkuberingstid og ved afkølingsproceduren giver relativt større afvigelser i varmebehandlingen og dermed varmeinaktiveringen. Men det er formentlig også et udtryk for at kemiske faktorer i gyllen dels ikke kan nå at penetrere vævet i samme grad som ved de lave temperaturer, dels at de kemiske faktorer har mindre betydning relativt ved en kraftig termisk inaktivering. I de foregående undersøgelser blev således vist at den termiske inaktivering af PPV udgjorde 11% (initialt) hhv 48% (terminalt) ved 55°C og 100% ved 70°C (Have et al, 1994).

#### Vævet betydning for virusinaktiveringen

Ved sammenligning med de tidligere undersøgelser (Bøtner, 1990) ses at inaktivering af virus i væv er væsentlig langsommere end inaktiveringen af virus direkte i gylle ved temperaturer > =35°C (tabel 5 og 6).

Tabel 5: inaktiveringshastigheden af svinepestvirus i gylle.

Svinepestvirus	direkte i gylle#	i væv i gylle
5°C	2 log / 2 uger <sup>□</sup>	1,8 log/2uger
20°C	1,5 log / dg <sup>□</sup>	2 log/3 dg
35°C	1,5 log <sub>10</sub> / 1 time <sup>□□</sup>	2 log <sub>10</sub> /10 timer
50°C	i.g.*	3log <sub>10</sub> / 1½ time
55°C	i.g.*	3 log <sub>10</sub> / 20 min.

\* ikke genfundet : inaktiveret indenfor 5 min,  
svarende til 4 log inaktiveret på <5 min.

□ lille fraktion kan genfindes i uger herefter.

□□ lille fraktion kan genfindes i 3 timer

#Bøtner (1990).

Tabel 6: inaktiveringshastigheden af porcint parvovirus i gylle.

Porcint parvovirus	direkte i gylle#	i væv i gylle
20°C	0,5 log <sub>10</sub> /10 uger	0,4 log <sub>10</sub> / 10 uger
35°C	4 log <sub>10</sub> / 2 uger	opløst <7 dage**
50°C	5 log <sub>10</sub> / 2 dage	opløst <7 dage 1 log <sub>10</sub> / 2 dage
55°C	4 log <sub>10</sub> / 1 dag	4 log <sub>10</sub> / 3 dage

\*\* væv opløst inden en inaktivering er målelig.

#Bøtner (1990).

Indlejring i væv virker således i væsentlig grad beskyttende overfor de inaktiverende faktorer i gyllen ved  $\geq 35^{\circ}\text{C}$ . Der ses generelt en større beskyttende effekt ved indlejring i væv jo højere temperaturen er (med en enkelt undtagelse, PPV ved  $55^{\circ}\text{C}$ ).

Effekten er markant større for SPV end for PPV: For SPV ved  $35^{\circ}\text{C}$  er inaktiveringshastigheden ca. en 8-fold langsommere i væv i gylle end for virus tilsat direkte til gylle. For inkubation ved  $50^{\circ}$  og  $55^{\circ}\text{C}$  er det ikke muligt at estimere hvor meget inaktiveringen forhales, da SPV inaktiveres momentant ved tilsætning til gyllen, men effekten er markant større end ved  $35^{\circ}\text{C}$ .

For PPV ses ingen beskyttende effekt ved  $20^{\circ}\text{C}$ , men ved  $50^{\circ}$  og  $55^{\circ}\text{C}$  er inaktiveringen ca. 3-5 fold langsommere ved indlejring i væv. Ved  $5^{\circ}$  og  $20^{\circ}\text{C}$  ses ikke markant forskel i inaktiveringshastigheden af PPV og SPV i gylle hhv. væv i gylle. Dette gælder også for inaktiveringen i medium hhv. væv i medium.

Inaktiveringen af SPV i væv i medium er hurtigere end inaktiveringen af virus direkte i medium, ved  $55^{\circ}\text{C}$  omtrent dobbelt hastighed. Ved  $35^{\circ}$  og  $50^{\circ}\text{C}$  kan der ikke måles nogen inaktivering af SPV i medium på 4 timer hhv. 1 time (Bøtner, 1990), mens der i væv ses en inaktivering på  $1 \log_{10}/10$  timer hhv.  $2,5 \log_{10}/4$  timer i væv; der er således en tendens til en hurtigere inaktivering i væv. Årsagen hertil er ukendt, men skyldes formentlig uspecifikke virusneutraliserende faktorer i væv (enzymmer o.lign.), usikkerheden er dog relativt stor grundet den meget lave inaktiveringshastighed og i forhold dertil for kort observationstid for SPV i medium.

For PPV ved  $35^{\circ}$  og  $50^{\circ}\text{C}$  er inaktiveringshastigheden tilsvarende ca. en 2-fold langsommere i væv end virus direkte i medium og ved  $55^{\circ}\text{C}$  ca. en 3-fold.

Der ses en betydelig hurtigere virusinaktivering ved inkubation af væv i gylle end i væv inkuberet i et neutralt medium. Omend vævet virker beskyttende på virus, er der således ikke tale om en ren varmeinaktivering, men en kombination mellem varme og miljøfaktorer. En virucid effekt af faktorer i biomassen forudsætter at vævsmaterialet henfalder og/eller de inaktiverende faktorer penetrerer vævsmaterialet. Vævets opbygning og vævstykkelsen er begge afgørende faktorer for nedbrydningshastighed og penetration.

Metzler et al. (1993) har fundet at der i biomassen findes lavmolekylære forbindelser med væsentlig virucid effekt, som er i stand til at penetrere polycarbonatmembraner. Det er sandsynligt, at det er de samme faktorer, som er i stand til at diffundere ind i vævet. Metzler et al. foreslår at  $\text{NH}_3$  eller  $\text{H}_2\text{S}$  kunne være de aktive forbindelser.

### Hygiejniseringsstrin

Et andet formål med undersøgelserne var at undersøge hvorvidt der var forskel på inaktiveringshastigheden i gylle hhv. udrådnings biomasse, idet dette vil være af betydning for placering af et eventuelt hygiejniseringsstrin.

Ved nedbrydning af vævet under udrådningen bliver biomassen mere homogen (jvf resultater s. 16). Det er muligt at vævsnedbrydningen er hurtigere i biogasanlæg som følge af den høje mikrobielle aktivitet. Varmetransmissionen og tilgængeligheden for virucide faktorer bliver

hermed bedre, hvilket kunne være et argument for at placere et eventuelt hygiejniseringsstrin efter udrådningen.

Endvidere har Ward & Ashley (1977) vist at spildevandsslams virucide effekt øges ved udrådningen og har fundet at det primært skyldes en stigning i indholdet af ammoniak. Dette er yderligere et argument for at placere et hygiejniseringsstrin efter udrådningen for at udnytte effekten af en kombination af varme og frit ammoniak (indholdet af  $\text{NH}_3$  stiger ved opvarmning).

I nærværende forsøg ses imidlertid ingen forskel mellem inaktiveringshastigheden i gylle og i udrådet biomasse, selvom der kun er anvendt gylle med  $\text{pH} < 7,8$  - dvs. koncentrationen af frit ammoniak er formodentlig lav. Hvor slam inden udrådning kan have en direkte beskyttende effekt på virus (Lund et al, 1983; Ward et al, 1976), er gylle allerede inden udrådning et relativt virucidt medium. Endvidere tilstræbes under udrådning et  $\text{pH}$  på højst 8 for at modvirke en stigning i ammoniak (Angelidaki & Ahring, 1993). Samlet kan dette kan være årsagen til at den virucide effekt i gyllebaseret biomasse (tilsyneladende) ikke øges under udrådning, i modsætning til hvad der er fundet for slam.

Endvidere er det en fordel at hygiejniserer det problematiske affald inden sammenblanding med store mængder gylle (det er mere økonomisk at opvarme det mindre volumen). Endelig vil der ved efterhygiejniserering kunne ske en fremvækst af patogene bakterier, pga. fravær af en kompetitiv flora. Placering af et eventuelt hygiejniseringsstrin ved  $70^\circ\text{C}$  inden udrådningen må derfor stadig foretrækkes. Er der derimod tale om en hygiejniserering ved  $50^\circ\text{C}$ - $55^\circ\text{C}$  kan en efterhygiejniserering være at foretrække.

#### Holdetiden i relation til inkubationstemperatur og virus

Kravene til den mindste garanterede opholdstid (MGRT) i reaktortankene må oplagt afhænge af reaktortemperaturen; dette fordrer indgående kendskab til inaktiveringshastigheden for relevante virus ved forskellige temperaturer i et reaktormiljø.

Ved en grafisk fremstilling af inaktiveringen af PPV og SPV overfor en logaritmisk tidsskala (figur 20 og 21) fås kurver med et brat fald efter en kort "nøle periode"- en følge af at inaktiveringen initielt ikke er logaritmisk selvom den sker hurtigt initialt. Kurverne for de forskellige temperaturer synes parallelforskuet. I figur 22 ses den påkrævede holdetid til sikring af en  $4 \log_{10}$  inaktivering afbildet som en funktion af inkubationstemperaturen. Ved lineær regression over kurven for SPV ses en høj korrelation ( $r=0,98$ ) med en linie med formlen:

$$\text{MGRT} = 10(-0,072 * \text{temp} + k)$$

hvor  $k=3,88$

Dette betyder at en sænkning af driftstemperaturen må medføre krav om en logaritmisk øgning af holdetiden - jo lavere temperaturen er desto større forøgelse af holdetiden vil være nødvendig ved f.eks. en grads nedsættelse af temperaturen.

Holdetider svarende til denne linie vil imidlertid ikke være tilstrækkeligt til at opnå inaktivering

af andre eksotiske virus som mund- og klovesygevirus og TGE-virus, da SPV er et mere følsomt virus (Bøtner, 1990).

En tilsvarende standardlinie, ud fra hvilken man for en given temperatur kan beregne den nødvendige mindste garanterede holdetid (MGRT), må lægges et sted mellem linien for svinepestvirus og det særdeles resistente parvovirus, så det sikres at f.eks. picornavirus (mund- og klovesyge virus samt en række humane og animale enterovirus) inaktiveres.

I figur 22 er indtegnet 2 linier parallelt med linien for 4  $\log_{10}$  inaktivering af svinepest. Linierne er "standardlinier" svarende til 70°C 0.5 time og 70°C 1 time. Disse "standardlinier" er dog ikke umiddelbart anvendelige; ser man nemlig på punkterne for SPV ses at der er tale om et svagt S-formet forløb og kurven for PPV er i endnu højere grad S-formet. Dette skyldes formentlig at inaktiveringsmekanismen er forskellig afhængig af temperaturniveauet. For SPV er det kritiske område tilsyneladende 50°-55°C og for PPV 65°-70°C. Også for andre virus må forventes forskellige inaktiveringsmekanismer. For poliovirus er således fundet at inaktiveringsmekanismen ændres ved temperaturstigning i området mellem 40°C og 50°C. Ved temperaturer over 50°C er inaktiveringen meget hurtig. (Burge et al, 1983).

Der foreligger ikke andre undersøgelser over inaktiveringshastigheden af virus i væv. Det vides derfor ikke hvordan andre vigtige virus forholder sig under sådanne betingelser. Der foreligger en række internationalt publicerede undersøgelser af inaktiveringen af forskellige enterovirus i slam og gylle; enterovirus omfatter en række af de almindeligste virus i slam (humane) og gylle (porcine og bovine) samt de eksotiske virus Teschen-syge virus og agens for svinets smitsomme blæreudslæt (SVDV); endvidere er mund- og klovesygevirus nært beslægtet. I figur 23 er resultaterne af disse undersøgelser vedr. inaktivering i gyllebaseret biomasse forsøgt samlet, idet decimeringstiden er beregnet for det samlede inaktiveringsforløb. Der må regnes med en meget stor spredning som følge af meget forskellige forsøgsbetingelser.

For enterovirus ses et markant fald på kurven omkring 50°-55°C, hvilket formentlig hænger sammen med ændring i den termiske inaktiveringsmekanisme for enterovirus generelt, svarende til hvad der er fundet for poliovirus (Burge et al, 1983).

I figur 23 er endvidere vist decimeringstiden af enterovirus i gylle (resultater fra litteraturen, se figur 23) over det samlede inaktiveringsforløb og tilsvarende for SPV og PPV ud fra Bøtner's resultater. Kurven for enterovirus ligger omtrent midt imellem kurverne for SPV og PPV. Man må dog fortsat være opmærksom på at forsøgsbetingelserne varierer meget mellem de forskellige undersøgelser.

Ved fastsættelse af kontinuerede standardkrav for MGRT over et bredt temperaturområde vil det umiddelbart synes rimeligt at en kurve med et buet forløb lægges til grund, dvs i nogle temperaturområder vil en sænkning af temperaturen kræve større forøgelse af MGRT end i andre områder. Da det kritiske område afhænger af hvilket virus der er tale om, er det imidlertid vanskeligt at afgøre hvor "knækket" på kurven bør ligge, - det forudsætter at alle relevante virus undersøges. En standardkurve kan derfor endnu ikke fastlægges, men krav til MGRT må specificeres for bestemte temperaturområder af særlig interesse.

### Ekstrapolation til andre virus.

I tidligere undersøgelser er inaktiveringen af virus i gylle undersøgt for en række vigtige patogene animalske virus (Bøtner, 1990). I disse forsøg skilte PPV sig ud fra de øvrige virus ved en meget langsommere inaktivering. Formentlig er det primært følsomheden overfor faktorer i biomassen, der er afgørende for betydningen af den beskyttende effekt ved indlejring i væv. Ud fra denne antagelse vil betydningen være størst for virus som SPV og Aujeszkyvirus, men af samme størrelsesorden for de øvrige virus i Bøtners undersøgelse, PPV undtaget.

I tabel 7 er angivet  $8 \times 4 \log_{10}$  inaktiveringstiden for virus i gylle ud fra Bøtners resultater (1990), hvilket er et estimat for  $4 \log_{10}$  inaktiverings tiden i væv i gylle ud fra antagelsen, at inaktiveringen forsinkes en faktor 8 ved indlejring i væv (jvf. diskussionen s. 40)

Tabel 7: Liste over estimater for  $4 \log_{10}$  inaktivering af virus i væv beregnet som  $8 \times 4 \log_{10}$  reduktion ud fra Bøtners (1990) resultater for virusinaktivering i gylle.

virus	35°
Svinepestvirus (svin)	16 t
Aujeszkyvirus (en række dyrearter, primært svin)	16 t
TGEvirus (transmissable gastroenteritis; svin)	72 t
Svineinfluenza-virus (svin)	240 t
IBRvirus (Infektiøs bovin rhinotracheitis; kvæg)	40 t
BVDvirus (bovin virusdiarre; kvæg)	14 t
Mund- og klovsygevirus (klovbærende dyr)	160 t

Alle de nævnte virus er kappebærende undtagen mund-og klovsygevirus.

Ud fra de tidligere resultater for forskellige vigtige patogene virus og ud fra antagelsen om at inaktiveringen af disse forsinkes i samme grad som SPV ved indlejring i væv, vil krav om MGRT på 35°C i 160 timer sikre inaktivering af de fleste vigtige eksotiske virus (jvf tabel 7). En MGRT på 160 timer ved 35°C ligger på linien svarende til 70°C 0.5 time (35°C, 162 timer).

Der ses i dette forsøg som nævnt en generel tendens til at den beskyttende effekt på virus ved vævsindlejring stiger med temperaturen. Da det ikke har været muligt at fastsætte en værdi for effekten ved højere temperaturer end 35°C er det ikke muligt at ekstrapolere fra SPV til andre virus ved 50°C og 55°C.

#### Kriterier for fastsættelse af holdetid

Europakommisionens program Cost 68/681, 1972-90 (Strauch & Carrington, 1992) resulterede bl.a. i en anbefaling om at der sættes krav til gylle- og slambehandlingsanlæg om en 4 log<sub>10</sub>-enheders reduktion af parvovirus eller enterovirus. Et krav om 4 log<sub>10</sub>-enheders reduktion af parvovirus vil ikke være realistisk, grundet parvovirus' ekstreme resistens (jvf. Have et al, 1994), men krav om 4 log<sub>10</sub> reduktion af enterovirus og andre relevante virus, der hører til de mere resistente virus, må anbefales.

Et givent krav til smitstofreduktion skaber ikke sikkerhed for at transmission forhindres, men skaber en vis barriere. Ved yderligere krav omkring udbringning skabes yderligere en barriere mod risiko for transmission af virus (o.a. patogener). Ved fastsættelse af krav til smittereduktion må indgå vurderinger af risiko for transmission, som beskrevet indledningsvis (s. 8), men også overvejelser omkring konsekvenser ved transmission. Konsekvenserne ved transmission af eksotiske virus vil være meget store (stop for eksport og igangsættelse af kostbare bekæmpelsesforanstaltninger) hvorfor der må være høje krav til behandling af affald der indebære en risiko i så henseende.

Risikovurderinger omfatter som nævnt en række forhold (jvf s. 8), herunder affaldets sammensætning og potentiel forekomst af patogener, behandlingsmetode, densitet i dyreholdet, anvendelsesgrad af det behandlede affald på landbrugsjorden, patogenets persistens efter udbringning, samt national og regional sygdomsstatus. Der mangler fortsat viden til at kunne foretage en reel risikovurdering, men visse forhold må man være særligt opmærksom på i forbindelse med virus:

- For enzootiske virus vil formålet være at holde smittepresset nede ved smitstofreducerende behandling og restriktioner ved udbringning.
- For eksotiske virus må der lægges større vægt på hygiejnisering i anlæggene, da restriktioner ved udbringning ikke hindrer overførsel til den vilde fauna (af eksempelvis mund- og klovesygevirus). Endvidere er der i forbindelse med udbringning risiko for vindbåren smitte.
- Virus må forventes at kunne forblive infektive i lang tid på markerne i Danmark grundet det i kolde og fugtige klima (Straub et al, 1993).

Forekomst af eksotiske virus i affaldet må forventes at være sjælden. Koncentrationen i affaldet

vil kunne være meget høj, eksempelvis var titeren af SPV i nærværende forsøg op til  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/50 $\mu$ l i milt; endnu højere titre kan forventes i andre væv såsom tarm og lymfeknuder, og de høje titre ses også, selvom der er tale om lavpatogene stammer af SPV (Shannon et al, 1993), hvilket øger risikoen for import med subklinisk inficerede dyr.

Under forudsætning af at der sker en homogenisering (pulpning) inden anvendelsen i BFA, vævsnedbrydning under udrådningen samt en fortynding ved blanding med andet affald og biomasse, må det dog anses for tilstrækkeligt med et generelt krav om en MGRT, der sikrer en  $4 \log_{10}$  inaktivering af virus også ved anvendelse af risikobehæftet affald som husholdningsaffald.

De foreløbige retningslinier for hygiejniserende behandling i termofile reaktorer, 55°C i 4 timer eller 50°C i 8 timer (Bendixen & Ammendrup, 1991), vil efter tidligere undersøgelser (Bøtner, 1990; Have et al, 1994) at dømmes være tilstrækkeligt til behandling af en homogen gyllebaseret biomasse tilsat biomasse fra affaldskategori A og B.

Behandlingen kan imidlertid ikke umiddelbart sidestilles med en kontrolleret hygiejnisering (70°C i 1 time). En MGRT på 4 timer ved 55°C vil ikke være tilstrækkeligt til behandling af problematisk affald med vævsrester mm. Vurderet ud fra inaktiveringen af SPV i væv kan inaktiveringen af virus være forhalet op mod 20-fold ved 50°-55°C ved indlejring i væv. Bøtner har fundet at mund- og klovesygevirus inaktiveres på ca. 40 minutter ved 55°C, og såfremt inaktiveringshastigheden nedsættes i samme grad som for SPV ved indlejring i væv, vil det fordrage holdetider på omkring 12 timer i termofile reaktorer. Inaktiveringen af dette mere resistente virus forhalet dog næppe i samme grad som SPV; der er behov for yderligere undersøgelser til afklaring af dette.

I Storbritanniens Code of Practice sidestilles en behandling 30 min ved 70°C med 4 timer ved 55°C (Bruce, Pike & Fisher, 1990). Parallelt hermed skulle en kontrolleret hygiejnisering 70°C i 1 time kunne sidestilles med 8 timer ved 55°C; vurderet ud fra de nu foreliggende resultater er dette imidlertid ikke tilfældet (Have et al 1994, samt nærværende undersøgelse).

Vurderingen af hvilken behandling der kan sidestilles med den kontrollerede hygiejnisering må fortsat ske på basis af reduktionen af PPV, da dette virus er det eneste der er tilstrækkeligt varmeresistent til sammenlignende undersøgelser ved de høje temperaturer.

På kurven, som viser holdetiden som funktion af temperaturen (Figur 22), ses for PPV, at en behandling 70°C, 1 time ikke kan sidestilles med 8 timer ved 55°C; netop resultaterne for inaktiveringen ved 70°C hersker der dog nogen usikkerhed om. Varmebehandling 1 time ved 70°C har vist at give ca  $1 \log_{10}$  (0,6-1,4  $\log_{10}$ ) reduktion af PPV i gyllebaseret biomasse og 0,6  $\log_{10}$  reduktion i fysiologisk saltvand (Have et al, 1994). I nærværende forsøg er fundet 1,5  $\log_{10}$  reduktion i væv i medium og 4  $\log_{10}$  reduktion i væv i gylle ved 70°C, 1 time. Årsagen til den hurtigere reduktion i væv i medium sammenlignet med virus i saltvand må skyldes faktorer i koagelet og kunne være, at virus bindes fastere i koaglet ved varmekoagulationen, hvorved virus bliver mindre tilgængeligt ved titrering. Dette vil også delvist være årsag til hurtige reduktion i væv i gylle, men årsagen til at inaktiveringen er så markant hurtigere end i andre forsøg kendes ikke. Det er imidlertid bemærkelsesværdigt at der ved 65°C ikke er signifikant forskel mellem inaktiveringen i væv i gylle og væv i medium og ved 75°C kun er en lille forskel. Inaktiveringen i udrådet biomasse er lige så hurtig som i

gylle og de 2 forsøgskørsler er udført adskilt, hvilket gør det mindre sandsynligt at der er sket en fejl. Resultatet for PPV i gylle og biomasse ved 70°C må dog tolkes med forbehold.

Samlet må det siges at der er noget divergerende resultater m.h.t. inaktivering af PPV ved 70°C. Disse forhold må uddybes nærmere før en standard på grundlag af PPV kan fastlægges.

Ved de tidligere forsøg (Have et al, 1994) kunne 70°C, 1 time sidestilles med 13 timer ved 55°C, beregnet som decimeringstiden i den sene fase af inaktivering; i den initiale fase (0-4 timer) var inaktiveringshastigheden 4 gange hurtigere. Det er bemærkelsesværdigt at forholdet mellem inaktiveringshastigheden i de to faser er det samme, som er fundet ved sammenligning af inaktivering af PPV i væv i gylle og inaktivering i gylle i den initiale fase (5-fold ved 50°C og 3-fold ved 55°C). Dette underbygger den tidligere fremsatte teori, at inaktiveringshastigheden i den sene fase af virus der er tilsat i suspension, er mere repræsentativ for inaktivering af naturligt forekommende virus. Ved 55°C er decimeringstiden for PPV i væv i gylle 18 timer, dvs lidt længere end i den sene fase for virus tilsat som suspension.

FS-metoden (Bennetsen & Mikkelsen, 1993), der forventes anvendt som kontrolmetode for biogasanlæggenes driftsstabilitet og patogen reducerende effekt, kan anvendes til sikring af holdetider op til ca. 5 timer ved 55°C (Have et. al., 1994). Krav om holdetider i termofile reaktorer i området 8-12 timer ved 55°C vil derfor indebære at FS-metoden kan udgøre et nødvendigt men ikke tilstrækkeligt kriterium til at sikre at holdetiden overholdes.

## Konklusion

Inaktiveringen af porcint parvovirus og klassisk svinepestvirus i væv inkuberet i gylle under anaerobe forhold er undersøgt ved en række temperaturer i området 5°-80°C. Parallelt hermed er virusinaktiveringen fulgt i væv i et neutralt medium. Endvidere er inaktiveringen undersøgt for virus i væv i udrådnet biomasse ved en relevant udrådningstemperatur, 50°C samt 70°C, simulerende efterhygiejnisering.

Decimeringshastigheden for virus er aftagende med tiden og udviser ofte et bifasisk forløb. Det bifasiske forløb er langt mere udtalt, når virus forekommer frit i suspension end når virus er indlejret i væv. I de tidligere forsøg udført på SVIV sås typisk en meget hurtig reduktion over de første 2-4  $\log_{10}$ -enheder med langvarig persistens af en lille fraktion af virus. Dette fænomen er fra flere sider søgt forklaret ved en beskyttende effekt på virus ved association af en del af viruspartiklerne til mediets partikulære fase.

Indlejring af virus i væv medfører at virus ikke udsættes for direkte kontakt med biomassen, og dette resulterer i et langt mere lineært forløb. Ved lineær regression for inaktivering i væv i gylle fås generelt høje korrelationskoefficienter (0,93-0,99) for svinepestvirus i væv i gylle, omend der er en faldende inaktiveringshastighed. Generelt er inaktiveringsforløbet for porcint parvovirus mere udpræget bifasisk med en hurtig inaktivering over de første 0,5-1  $\log_{10}$ -enheder.

Inaktiveringen ved høje temperaturer (over 55°C) er initialt hurtigere i neutralt medium end i gylle, formentlig pga. bedre varmetransmission. Dette har dog kun betydning kortvarigt. Selvom virus er indlejret i væv ses en effekt af virucide faktorer i biomassen (additiv effekt) i forhold til en rent termisk inaktivering i et neutralt medium; de virucide faktorer må således til en vis grad være i stand til at penetrere vævet. Den relative betydning af disse faktorer aftager med stigende temperatur, svarende til at den termiske effekt øges tilsvarende. Den termiske effekt er for svinepestvirus altdominerende ved temperaturer over 60°C.

Det vides ikke hvilke faktorer der er aktive, men det er formentlig lavmolekylære stoffer (bl.a. svovlbrinte eller ammoniak), som kan diffundere ind i vævet. Endvidere ses en tydelig proteolytisk effekt med opløsning af vævsmaterialet ved temperaturer < 50°C. Ved opløsning af vævet fremmes kontakten med andre virucide faktorer, hvilket muligvis kan anvendes i et hygiejniseringstrin.

Indlejring i væv virker i væsentlig grad beskyttende overfor de inaktiverende faktorer i gyllen ved > 35°C. For begge virus gælder generelt, at de inaktiveres væsentlig langsommere, når de er indlejret i væv end når de forekommer frit i gyllen/biomassen. Den relative betydning varierer med temperaturen, idet betydningen af vævsindlejringen stiger med stigende temperatur i området 5°-55°C.

Indlejringen i væv har altså langt større betydning for det følsomme svinepestvirus end PPV og det synes rimeligt at antage at den beskyttende effekt generelt har større betydning for kappebærende virus. For svinepestvirus ved 35°C er inaktiveringshastigheden ca. 8-fold langsommere i væv i gylle end for virus tilsat direkte til gylle. I det termofile område er inaktiveringen over 20-fold langsommere i væv end for svinepestvirus direkte i gylle, men det er ikke ud fra nærværende forsøg muligt at give et nærmere estimat, da svinepestvirus

inaktiveredes momentant ved tilsætning til gylle.

For porcint parvovirus ses ingen beskyttende effekt ved 20°C, men i det termofile område er inaktivering en 3-5 fold langsommere ved indlejring i væv.

Ud fra de tidligere resultater for forskellige vigtige patogene virus og ud fra antagelsen om at inaktiveringen af disse forsinkes i samme grad som svinepestvirus ved indlejring i væv, vil krav om MGRT på 35°C i 160 timer sikre inaktivering af de fleste vigtige eksotiske virus (jvf tabel 7). Ud fra nærværende forsøg må det endvidere estimeres, at en samlet holdetid ved 55°C på 12 timer vil være tilstrækkeligt til at sikre inaktivering af mere resistente virus som transmissible gastroenteritis virus og mund- og klovesygevirus.

Et krav om en behandling der sikrer en 4 log<sub>10</sub> reduktion af relevante patogener (specielt eksotiske), også når disse er indlejret i vævsrester, bør lægges til grund for fastsættelse af mindste garanterede holdetid i BFA, når der anvendes risikobehæftet affald som husholdningsaffald og slagterislam mv. Et sådant krav vil efter nærværende undersøgelser endvidere være foreneligt med det hidtil gældende krav om varmebehandling 70°C i 1 time eller tilsvarende.

Grundet den høje varmeresistens er parvovirus anvendeligt som indikator ved fastlæggelse af alternative kriterier for temperatur/holdetid i forhold til hygiejniserings ved 70°C i 1 time. Der er dog tale om komplekse ikke-lineære sammenhænge, med forskellige inaktiveringsmekanismer og mange betydende faktorer. Samlet må det siges, at der er noget divergerende resultater m.h.t. inaktiveringen af porcint parvovirus ved 70°C. Der bør udføres supplerende studier til klarlægning af disse forhold, specielt effekten af behandlingen 70°C i 1 time, før en generel standard på grundlag af parvovirus kan fastlægges ved ekstrapolation til andre temperaturområder.

FS-metoden kan anvendes til sikring af holdetider op til ca. 5 timer ved 55°C og som kontrolmetode for biogasanlæggenes driftsstabilitet. Krav om holdetider i termofile reaktorer i området 8-12 timer eller derover ved 55°C vil derfor indebære, at FS-metoden kan benyttes som et nødvendigt men ikke tilstrækkeligt kriterium til at sikre at holdetiden overholdes ved behandling af problematisk affald.

## Litteraturliste

- Angelidaki, I. & B.K. Ahring, (1993): Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: The effect of ammonia. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38, pp.560-564.
- Berg, G. & D. Berman, (1980): Destruction by anaerobic mesophilic and thermophilic digestion of viruses and indicator bacteria indigenous to domestic sludges. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, no.2, 361-368.
- Bendixen, H.J. (1993): Kontrol med smitstoffer ved recycling af biomasse. *Dansk Veterinær Tidsskrift*, 76, 86-100.
- Bendixen, H.J. (1993): "Midtvejsrapport for det Veterinære Følgeprogram."
- Bendixen H.J. & S. Ammendrup (1991): Smittebeskyttelse i biogasanlæg. Rådgivning om forebyggelse af smittespredning og krav til hygiejnisering. Delprojekt 4. Veterinærdirektoratet, 32 sider.
- Bennetsen, Olaf & U. S. Mikkelsen (1993): FS-metodens anvendelighed som hygiejnisk kontrolparameter. *Dansk Veterinær Tidsskrift* 76,14, 597-656.
- Bruce, A.M. , E.B. Pike & W.J. Fisher, (1990): "A review of Treatment Process Options to Meet the EC Sludge Directive", *J. Int. Water Environmental Management*, 4., 1990.
- Burge, W.D., W. N. Cramer & K. Kawata, (1983): Effect of heat on Virus Inactivation by ammonia. *Applied and Environmental Microbiology*, August, 1983, 446-451.
- Bøtner, A. (1990): Modelstudier vedr. overlevelse af virus i gylle under traditionel opbevaring og under udrådning i biogasanlæg. Delprojekt 1. Veterinær forskning og rådgivning i forbindelse med etablering og drift af biogasanlæg. Statens Veterinære Institut for virusforskning, 64 sider.
- Deng, M.Y. & D.O. Cliver, (1992): Inactivation of Poliovirus Type 1 in Mixed Human and Swine Wastes and Bacteria from Swine Manure. *Applied and Environmental Microbiology*, Juni 1992, 2016-2021.
- Derbyshire, J.B., H.D. Monteith & E.E. Shannon, (1986): Virological Studies on an Anaerobic Digestion System for Liquid Pig Manure. *Agricultural Wastes*, 18(1986), p.309-312.
- Ellis, J.R. & McCalla, T.M. (1978): Fate of Pathogens in Soils Receiving Animal Wastes .A Review. *Transactions of the ASAE*, 1978, 21, no. 2., pp.309-313.
- Have, P., B.K. Ahring, V.F. Jensen, G. Jungersen & B. Lund, (1994): Modelstudier vedrørende overlevelse af virus i gyllebaseret biomasse under udrådning i laboratorie-skala biogasanlæg. Rapport. Det veterinære overvågningsprogram for biogasanlæg, (Energistyrelsen). Statens Veterinære Institut for Virusforskning og Dansk Teknologisk Institut, Afdeling for Bioteknik. November 1994.

Korn, G. & W. Matthaeus, (1976): Swine fever disease, a virus-induced disorder of the enzyme system: The pathogenicity of normal pancreas and chymotrypsin. I : Hog Cholera / Classical Swine fever and African Swine fever. Seminar under EEC program for coordination af forskning i svinepest, 6. -11. sept. 1976. B. Liess (Formand).

Krause, M., S. Jepsen & H. Grüttner (1994): Hygiejniske aspekter ved behandling og genanvendelse af organisk affald. Forundersøgelse. Vandkvalitetsinstituttet.

Larsen, H. E. & Munck, B. (1981). Sygdoms og miljømæssige problemer i forbindelse med behandling og spredning af flydende husdyrgødning (gylle). Department of veterinary Mikrobiology and Hygiene, Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen. ISBN 877432 206 0.

Lund, E., B. Lydholm & A.L. Nielsen, (1983): The Fate of viruses during sludge stabilization especially during thermophilic digestion. In: Bruce, A.M., Havelaar, A.H. & L. Hermite, P. (Eds.): Disinfection of Sewage Sludge: Technical, Economic and Microbiological Aspects. Proceedings of a Workshop. Afholdt i Zürich, 11.-13. Maj, 1982.

Lydholm, B. & A.L. Nielsen, (1981): The use of a soluble polyelektrolyte for the isolation of virus in sludge. In Viruses and wastewater treatment. M. Goddard & M. Butler (eds.). Gergamon Press, Oxford.

McKain, N & P.N. Hobson, (1987): A Note on the Destruction of Porcine Enteroviruses in Anaerobic Digestions. Biological Wastes, 22, 147-155.

Mebus, C.A., C. House, F. Ruiz Gonzalvo, J.M. Pineda, J. Tapiador, J.J. Pire, J. Bergada, R.J. Yedloutschnig, S. Sahu, V. Becerra & J.M. Sanchez-Vizcaino (1993): Survival of foot-and-mouth disease, African swine fever and hog cholera viruses in Spanish serrano cured hams and Iberian cured hams, shoulders and loins. Food Microbiology, 10, pp. 133-143.

Metodeforslag til Dansk Standard (1993): Miljøbiologisk undersøgelse af fæcale streptococcer i biomasser ved pladespredningsmetode.

Metzler, A.E. (1993): Virusinaktivation during anaerobic fermentation of source separated waste. Foredrag holdt på IEA-biogasgruppemøde, 4. okt. 1993. (Upubliceret). Arbeitsgruppe für Umwelthygiene, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Zürich, Schweiz.

Miljøministeriets bekendtgørelse nr. 736 af 26. oktober, om anvendelse af slam, spildevand og kompost m.v. til jordbrugsformål.

Salo, R.J. & D.O. Cliver, (1976): Effekts of Acid pH, Salts and Temperature on the Infekitivity and Physical Integrity of Enteroviruses, Archives of Virology, 52, pp. 269-282, 1976.

Sanders et al (1979): J. of Water Poll Contr. Federation, 51, 333-343.

Sellers, R.F., (1980): Absolute safety. CEC. Communicable diseases resulting from storage, handling, transport and landspreading of manures. 4.- 6. November, Hannover. Ed.: Walton, J.R. & White, E.G.

Shannon, A.D. , C. Morrissy, S.G. Mackintosh & H.A. Westbury (1993): DEtection of hog cholera virus antigens in experimentally-infekted pigs using an antigen-capture ELISA. *Veterinary Mikrobiology*, 34, pp.233-248, 1993.

Straub, T.M., I.L. Pepper & C.P. Gerba (1993): Virus Survival in Sewage Sludge amended Desert Soil. *Water Science and Technology*, 27, no 3-4, pp.421-424.

Strauch & Carrington, (1992): Hygiejnic aspects related to treatment and sabitary aspects of slurries and manures. In : Treatment and use of sewage sludge and liquid wastes. Review of COST 68/681 programmet 1972-1990. J.L.Hall, P.L L Hermite & P.J.Newman (eds.)

Ward, R.L., C.S. Ashley & R.H. Moseley, (1976): Heat Inactivation of Poliovirus in Wastewater Sludges. *Applied and Environmental Microbiology*, 32, no 3 (Sept. 1976), pp. 339-346.

Ward, R.L. & Ashley, C.S. ,(1977): Identification of the Virucidal Agent in Wastewater Sludges. *Applied and Environmental Microbiology*, 33, no 4 (april 1977), pp.860-864.

Veterinærdirektoratets bekendtgørelse nr. 789 af 21 september 1992 omforarbejdning af animalsk affald og fremstilling af dyrefoder med animalsk indhold.

