Landbrugsministeriet
Statens Veterinære Institut
for Virusforskning

Veterinær forskning, overvågning og rådgivning i forbindelse med etablering og drift af biogasfællesanlæg

Modelstudier vedrørende overlevelse af virus i gylle under traditionel opbevaring og under udrådning i biogasanlæg

(Delprojekt 1, VET-BIO-1)

Anette Bøtner

Lindholm 1990

FORORD

I maj 1987 forelå "Handlingsplan for Biogasfællesanlæg", udarbejdet af Koordineringsudvalget for biogasfællesanlæg. Dette udvalg er nedsat af energiministeren efter samråd med miljøministeren og landbrugsministeren.
I denne plan indgår fire veterinære forskningsprojekter vedrørende smitterisiko og smittebeskyttelse. De fire projekter der er samlet i "Programmet for veterinær forskning, overvågning og rådgivning i forbindelse med etablering og drift af biogasfællesanlæg" omhandler: 1. Overlevelse af virus i gylle, (modelstudier). 2. Overlevelse af bakterier og parasitter i demonstrationsanlæg i drift. 3. Sygdomsovervågning i besætninger tilknyttet biogasfællesanlæg. 4. Rådgivning vedrørende smittebeskyttende foranstaltninger ved projektering, etablering og drift af biogasfællesanlæg.

I den foreliggende rapport præsenteres resultaterne af projektet: "Modelstudier vedrørende overlevelse af virus i gylle under traditionel opbevaring og under udrådning i biogasanlæg."

Projektet er udført på Statens Veterinære Institut for Virusforskning, Lindholm, i perioden 1. juli 1987 til 31. december 1989.
De i forsøgene anvendte immunsera til påvisning og identifikation af virus og antistoffer er fremstillet og stillet til rådighed af medarbejdere ved instituttet. ELISA-undersøgelserne er udført med hjælp fra dyrlægerne L. Rønsholt, P. Have, K.-J. Sørensen og B. Strandbygaard, og dyrlæge Jens Nielsen har forestået fremstillingen af cellekulturerne. Jeg ønsker at takke instituttets medarbejdere som på den ene eller den anden måde har bidraget til projektets gennemførelse. En særlig tak til laborant Inger-Lise Magnusson, som har været fast tilknyttet til projektet, og som med stor interesse har deltaget i alle faser af projektet.

Projektet er finansieret gennem bevillinger fra Landbrugsministeriet (VET-BIO-1) og fra Industri- og Handelsstyrelsen via Teknologirådet (sagsnr. 87.248).

Marts 1990

Anette Bøtner

INDHOLDSFORTEGNELSE

	side
1. INDLEDNING	3
1.1 Projektets baggrund	3
1.2 Projektets formål	4
2. MATERIALER OG METODER	6
2.1 Virus	6
2.2 Gylle	7
2.3 Forsøgsprocedure	7
2.4 Udtagning af prøver	9
2.5 Infektivitetstitreringer (Bestemmelse af indhold af infektivt virus)	9
2.6 Påvisning af virusantigen	10
2.7 Podning af naturlige værtsdyr	11
2.7.1 Blodprøveundersøgelser	12
3. RESULTATER	12
3.1 Infektivitetstitreringer	12
3.1.1 Porcint parvovirus	12
3.1.2 BVD-virus	13
3.1.3 Svineinfluenzavirus	13
3.1.4 IBR-virus	14
3.1.5 Aujeszky-virus	15
3.1.6 Mund- og klovesyge-virus	16
3.1.7 Svinepest-virus	16
3.1.8 TGE-virus	17
3.2 Påvisning af virusantigen	17
3.3 Podning af naturlige værtsdyr	18
3.3.1 IBR-virus	18
3.3.2 Aujeszky-virus	18
3.3.3 Svinepest-virus	19

4. DISKUSSION 20
4.1 Reisolering af virus fra gylle/virus-blandingerne 20
4.2 Påvisning af virusantigen 20
4.3 Podning af naturlige værtsdyr 21
4.4 Temperaturens betydning for inaktiverings-hastigheden 21
4.5 Ammoniak 22
4.6 Inaktiveringskurvens forløb for Auj.-virus 22
4.7 Sammenligning af inaktiveringshastigheden i kvæg- og svinegylle 23

5. KONKLUSION 23

REFERENCER 29

FIGURER

ORDLISTE

1. INDLEDNING

1.1 Projektets baggrund

Anvendelse af gylle til gødskning af landbrugsjord frembyder en vis risiko for spredning af patogener, idet både syge og tilsyneladende sunde dyr kan udskille smitstoffer med gødning, urin og sekreter. Da de anaerobe forhold i gyllen, i modsætning til de aerobe forhold i møddinger, ikke befordrer varmedannelse og den dermed betydelige inaktivering af smitstoffer, kunne en anden metode til smitstofreduktion i gyllen være udrådning i biogasanlæg. I de senere år er anaerob udrådning med produktion af biogas blevet brugt i stigende grad i Danmark sideløbende med intensiveringen af kvæg- og svineproduktionen. Det første biogasfællesanlæg baseret på udrådning af husdyrgylle blev etableret i Danmark i 1984.

Anvendelsen af biogasfællesanlæg rummer imidlertid nogle potentielle risici for overførsel af smitsomme sygdomme, dels i tilslutning til gylletransporten til og fra anlægget, dels som følge af at gylle fra forskellige besætninger blandes og efter udrådningen fordeles til gødskning eller deponering på flere forskellige ejendomme.
Biogasudrådningen ved mesofile og i særdeleshed ved termofile forhold befordrer imidlertid en hurtigere inaktivering af bakterier og parasitter (Larsen & Munch, 1981; Olsen et al. 1985) samt virus (Srivastava & Lund, 1980; Derbyshire et al. 1986; Monteith et al., 1986 & McKain & Hobson, 1987) end den, der foregår i konventionelle gylletanke. Derfor vil muligheden for smittespredning via returgylle principielt kunne imødegås ved en styring mod procesteknologier, der befordrer "infektionshygiejnisk acceptabel" inaktivering af de i den ubehandlede gylle forekommende smitstoffer.

Virus-inaktivering ved gylleudrådning er for nærværende kun sparsomt belyst. De rapporterede undersøgelser har hovedsageligt belyst inaktiveringen af bovine- og porcine enterovirus (Lund & Nissen, 1983; Derbyshire et al., 1986; Monteith et al., 1986; McKain & Hobson, 1987) samt bovint parvovirus (Srivastava & Lund, 1980; Monteith et al., 1986). Disse virus findes i mave-tarmkanalen og udskilles med fæces. Da gyllen imidlertid også tilføres sekreter fra f.eks øjne og respirationsveje, vil virus udskilt i sådanne sekreter ligeledes kunne findes i den ubehandlede gylle (Tabel 1). Aujeszky-virus f.eks., udskilles hovedsageligt i næsesekret (Shope, 1935), og er af Mack et. al (1986) blevet påvist i gylle fra naturligt inficerede besætninger.
Der er således en potentiel risiko for, at mange forskellige virus kan forekomme i gylle, heriblandt virus som giver anledning til ondartede smitsomme sygdomme.

1.2. Projektets formål

Formålet med den foreliggende undersøgelse er ved modelstudier i laboratoriet at undersøge inaktiveringsforløbet for forskellige virus i gylle under traditionel opbevaring i gylletanke ved henholdsvis sommer- (20°C) og vinter- (5°C) temperatur, og at sammenligne dette med inaktiveringsforløbet for de samme virus under portionsvis udrådning i biogasanlæg.
Ved projektets start var der som et led i handlingsplanen undersøgelser igang med det formål at bestemme den økonomisk optimale driftstemperatur for biogasanlæggene. Da denne endnu ikke var fastlagt, blev det besluttet ikke blot at undersøge de traditionelt anvendte mesofile og termofile temperaturområder, men at undersøge inaktiveringsforløbet for virus i temperaturområdet 35° - 55°C med intervaller på 5°C.
Undersøgelsen omfatter en række relevante sygdomsfremkaldende virus med forskellige udskillelsesveje. De pågældende virus repræsenterer, som det ses af nedenstående oversigt, forskellige virusfamilier med forskellig resistens overfor ydre påvirkninger:

Anvendt virus	Virusfamilie
Aujeszky-virus IBR-virus	Herpesvirus
TGE-virus	Coronavirus
Svinepest-virus BVD-virus	Togavirus
Mund- og klovesygevirus	Picornavirus
Porcint parvovirus	Parvovirus
Svineinfluenzavirus	Orthomyxovirus

De anvendte virus kan inddeles i tre grupper på grundlag af deres forekomst i Danmark:

1. Virus som er enzootisk forekommende i Danmark (BVD- , porcint parvo- og svineinfluenzavirus)

2. Virus som er under udryddelse her i landet (IBR-virus)

3. Virus som normalt ikke forekommer her i landet, såkaldte eksotiske virus (Aujeszky-, mund-og klovesyge-, svinepest-, samt TGE-virus).

TABEL 1

Forekomst af forskellige virus i fæces, sekreter og blod.
(Ref: R.F.Sellers, 1980)

Virus som hovedsageligt udskilles i fæces.	Virus også til stede i høj titer i:
Enterovirus	
Rotavirus	
BVD-virus	
TGE-virus	
Bovint coronavirus	
Kvægpest-virus	Respiratoriske sekreter
Parvovirus	
Adenovirus	Respiratoriske sekreter

Massiv forekomst af virus i fæces	Maximal udskillelse af virus i:
Mund- og klovesygevirus	Vesikel epithel
Smitsomt blæreudslæt-(SVD-) virus	Vesikel epithel
Svinepest-virus	Blod
Afrikansk svinepest-virus	Blod

Virus som ikke udskilles i fæces	Maximal udskillelse af virus i:
Rabies-virus	Spyt
Svineinfluenza-virus	Respiratoriske sekreter
IBR-virus	Respiratoriske sekreter
Aujeszky-virus	Respiratoriske sekreter
Vesiculær stomatitis-virus	Vesikulært epitel
Hemagglutinating encephalomyelitis-virus	Respiratoriske sekreter
Bluetongue-virus	Blod

2. MATERIALER OG METODER

2.1. Virus

Porcint parvovirus
En dansk stamme, 893, af porcint parvovirus (PPV) blev opformeret i primære svinenyrecellekulturer. Koncentrationen af det høstede virus var $10^{7,3}$ $TCID_{50}$/50µl (se ordliste).

BVD-virus
En dansk cytopatogen stamme, UG 59, af bovin virusdiarre-virus (BVD-virus) blev opformeret i primære kalvenyrecellekulturer. Koncentrationen af det høstede virus var $10^{6,5}$ $TCID_{50}$/50µl.

Svineinfluenzavirus
En dansk stamme, 4744, af svineinfluenzavirus (SI-virus) blev opformeret i primære svinenyrecellekulturer. Koncentrationen af det høstede virus var $10^{7,1}$ $TCID_{50}$/50µl.

IBR-virus
En dansk stamme, Brørup 82, af bovin herpesvirus 1, infektiøs bovin rhinotracheitis virus (IBR-virus) blev opformeret i primære kalvenyrecellekulturer. Koncentrationen af det høstede virus var $10^{6,4}$ $TCID_{50}$/50µl

Aujeszky-virus
En dansk stamme, DK 3275/81, af Aujeszky-virus (Auj.-virus) blev opformeret i primære svinenyrecellekulturer. Koncentrationen af det høstede virus var $10^{6,5}$ $TCID_{50}$/50µl.

Mund- og klovesyge-virus
En britisk stamme, type O BFS (O-British field strain), af mund- og klovesyge-virus (MKS-virus) blev opformeret i primære kalvenyrecellekulturer. Koncentrationen af det høstede virus var $10^{6,1}$ $TCID_{50}$/50µl.

Svinepest-virus
En fransk stamme, Alfort, af klassisk svinepest-virus (SP-virus) blev opformeret i PK-15 celler (en svinenyre cellelinie). Koncentrationen af det høstede virus var $10^{5,5}$ $TCID_{50}$/50µl.

TGE-virus
En amerikansk stamme (Purdue) blev anvendt i forsøgene med transmissible gastroenteritis-virus (TGE-virus). Virus blev opformeret i ST-113 celler (en svinetestikel cellelinie). Koncentrationen af det høstede virus var $10^{6,5}$ $TCID_{50}$/50µl.

2.2. Gylle

Den anvendte gylle var opsamlet fra fortankene på to ejendomme, en med søer, smågrise og slagtesvin, og en med malkekvæg samt opdræt. Gyllen blev udtaget i 10 liters dunke efter omrøring i fortankene. Der blev udtaget en ny portion gylle til hvert af de undersøgte virus.
Indledningsvis blev de største strå fjernet fra gyllen for at gøre det muligt at omhælde den. Tørstofindholdet i de anvendte portioner varierede herefter fra 6 til 11%.

2.3. Forsøgsprocedure

Forsøgene blev udført med ét virus ad gangen. Porcint parvo-, SI-, Auj.-, SP- samt TGE-virus, hvis egentlige værtsdyr er svin, samt MKS-virus, hvis naturlige værtsdyr er klovbærende dyr, blev sat til svinegylle. BVD- og IBR-virus blev sat til kvæggylle.

Fremgangsmåden var følgende for hvert virus: 800 ml af gyllen blev hældt på hver af syv 1-liters kolber, og anaerobe forhold blev etableret ved tillukning med en prop forsynet med et U-rør fyldt med vand. Fem af kolberne blev placeret i termostatregulerede

vandbade ved henholdsvis 35, 40, 45, 50 og 55°C. En af de resterende 2 kolber blev opbevaret i et køleskab (5°C), og den anden blev placeret i et termostatreguleret rum ved 20°C.
Når forsøgstemperaturerne var opnået blev virus sat til hver af kolberne, således at den oprindelige virussuspension blev fortyndet 1:20 i gyllen. Indholdet i kolberne blev blandet omhyggeligt, og hver af gylle/virus-blandingerne blev derefter fyldt på 5-10 forvarmede/afkølede 100 ml flasker i mængder á 75 ml. Propper med U-rør indeholdende vand blev påsat for et etablere anaerobe forhold, og flaskerne blev anbragt ved de respektive temperaturer.
For at kunne bestemme indholdet af infektivt virus i gyllen umiddelbart efter tilsætning af virus, T_0, blev der af hver gylle/virus-blanding hældt 4 ml på hvert af 4 "rør", som blev tilsat serum og nedfrosset som beskrevet under "Udtagning af prøver".
For at kunne bestemme den inaktiverende effekt af temperaturen alene blev virus, som var fortyndet 1:20 i næringsmedium (Eagle's MEM) indeholdende antibiotika, fyldt på rør ("Virus i medium", kontroller) og opbevaret ved de samme temperaturer som gylle/virus-blandingerne.
Auj.-virus blev desuden undersøgt særskilt for at belyse inaktiveringsforløbet ved forskellige initiale koncentrationer af virus i gyllen. Forsøget blev udført ved 40°C som ovenfor beskrevet, ved anvendelse af virussuspensionen fortyndet 1:20, 1:200 og 1:2000 i svinegylle.
Der blev herudover foretaget nogle sammenlignende undersøgelser af inaktiveringsforløbet i henholdssvis kvæg- og svinegylle med Auj.- samt MKS-virus. Forsøgene blev udført som ovenfor beskrevet med virus fortyndet 1:20 i såvel kvæg- som svinegylle. I forsøget med Auj.-virus anvendtes udelukkende 40°C som forsøgstemperatur, mens temperaturerne 20, 35 samt 55°C blev anvendt i forsøget med MKS-virus.

2.4. Udtagning af prøver.

Med forskellige tidsintervaller, afhængigt af den anvendte temperatur samt af det undersøgte virus, blev en flaske udtaget, og efter omrystning blev 4 ml af gylle/virus-blandingen hældt på hvert af 4 rør. Der blev tilsat 10 % føtalt kalveserum (FCS) eller normalt kalveserum (NKS) frit for antistoffer mod BVD-virus. Som hovedregel blev der anvendt FCS, blot ikke i forsøgene med BVD- samt SP-virus, hvor anvendelsen af NKS medførte en højere reisoleringsprocent. Umiddelbart efter tilsætningen af serum blev de 4 rør med gylle/virus-blandingen "lynfrosset" i alkohol ved -80°C og derefter opbevaret i fryser ved samme temperatur. Den resterende del af gylle/virus-blandingen i flasken blev kasseret, efter at pH var målt. "Virus i medium", kontrol blev udtaget og nedfrosset sideløbende.

2.5. Infektivitetstitreringer.
(Bestemmelse af indhold af infektivt virus.)

De udtagne 4 ml prøver, opbevaret ved -80°C, blev optøet i et 37°C varmt vandbad og derefter centrifugeret ved 650 g i 15 min ved 5°C. Supernatanterne blev fortyndet i en ti-folds fortyndingsrække i Eagle's MEM indeholdende 10 gange den antibiotika koncentration, som normalt anvendes til cellekulturer, suppleret med 10% serum. Ved titrering af SI-, porcint parvo-, Auj.- samt MKS-virus blev der anvendt FCS, mens der til titrering af BVD-, SP- og IBR-virus anvendtes NKS, og endelig blev "Newborn calf serum" brugt ved titrering af TGE-virus.
Fortyndingerne blev adsorberet til cellekulturer i mikrotiter plader (NUNC, Danmark). Ved forsøgene med porcint parvo-, SI-, Auj.- og MKS-virus anvendtes primære eller sekundære svinenyrecellekulturer, til IBR- og BVD- virus primære eller sekundære kalvenyrecellekulturer, til SP-virus PK-15 celler og til TGE-virus benyttedes ST-113 celler.

PPV blev adsorberet til et ca.70% tæt cellelag, mens et konfluerende cellelag blev benyttet til de øvrige virus. Hver fortynding blev sat til 5 brønde, 50µl/brønd. Efter adsorbering i 2 timer ved 37°C blev cellekulturerne vasket to gange med Eagle's MEM, hvorefter samme medium tilsat 10% serum (svarende til serum i adsorbtionsmedium) blev tilsat. Pladerne blev herefter inkuberet ved 37°C.

På grund af den toksiske effekt af gylle på cellekulturer anvendtes fortyndingen 1/10 som udgangsfortynding i titreringerne. To parallelle titreringer blev udført for hver udtagning/ temperatur idet gylle/virus-blandingen fra to forskellige rør blev anvendt. "Virus i medium", kontrol blev titreret på samme måde, idet der dog ikke blev udført parallelle titreringer for disse.

Aflæsning af cellekulturerne blev foretaget på forskellig måde afhængigt af, hvilket virus det drejede sig om. Cellekulturerne podet med gylle tilsat SI-, IBR-, Auj.-, MKS- samt TGE-virus blev aflæst for cytopatogene forandringer (CPE) i mikroskop dagligt i 4-5 dage . Mikropladerne med BVD-, PPV- og SP-virus blev aflæst ved anvendelse af en peroxidase-bundet antistof (PLA) test, som beskrevet af Jensen (1981). Denne metode er baseret på en farvning af fixerede celler som indeholder virus-antigen. PLA teknikken blev endvidere anvendt som en ekstra sikkerhed til påvisning af SI-virus i de udtagninger hvor infektivt virus netop ikke længere kunne påvises.

Virustitrene blev beregnet efter Reed & Muench's metode (1938). De angivne titre er de teoretisk maximale titre beregnet ud fra den forudsætning, at der ville have været virusanslag i alle 5 brønde podet med ufortyndet prøve.

2.6. Påvisning af virusantigen

Til bestemmelse af indhold af porcint parvo-, BVD-, SI-, Auj.- samt MKS-virusantigen i gylle/virus-blandingerne blev der anvendt en ELISA-test. Denne blev ligesom infektivitetstitreringerne, udført på gylle/virus-supernatanter samt på de tilhørende "Virus i medium", kontroller. For hvert virus blev der undersøgt prøver fra

forsøgene udført ved en eller to af de anvendte temperaturer hvilket fremgår af Fig. 28-32. For SI-virus, 20°C, er der ikke foretaget ELISA på "Virus i medium", kontrol.

2.7. Podning af naturlige værtsdyr

Der blev udført podningsforsøg i det naturlige værtsdyr med gylle tilsat henholdsvis IBR-, Auj.- og SP-virus. Alle podninger blev fortaget intranasalt med 1 ml ikke-centrifugeret gylle/virus-blanding til hvert dyr.

IBR-virus

Tre grupper med hver 3 kalve blev anvendt i dette forsøg. I den ene gruppe blev kalvene podet med gylle/virus-blanding, T_0, 45°C. I den anden gruppe blev kalvene podet med gylle/virus-blanding udrådnet ved 45°C i 1 1/2 time og i den 3. gruppe var det anvendte podemateriale udrådnet ved 45°C i 2 1/2 time. Der blev udtaget ustabiliserede blodprøver før podningen samt 3 uger efter.
De anvendte kalve vejede cirka 150 kg.

Auj.-virus

Hver af 3 grise blev podet med gylle/virus-blanding, T_0, 45°C, og hver af 3 andre grise blev podet med gylle/virus-blanding udrådnet ved 45°C i 45 minutter. Der blev udtaget ustabiliserede blodprøver før podningen og med intervaller på 3-10 dage i løbet af en 4 ugers periode efter podning, eller indtil serokonvertering.
De anvendte grise vejede 35-40 kg.

SP-virus

Hver af 3 grise blev podet med gylle/virus-blanding udrådnet ved 35°C i 1 time. De samme grise blev 6 1/2 uge efter første podning podet igen, denne gang med gylle/virus-blanding, T_0, 35°C. Tre andre grise blev podet med gylle/virus-blanding udrådnet ved 40°C i 3 timer. Ustabiliserede blodprøver blev udtaget før podningerne

samt 6 uger efter disse. Endvidere blev der udtaget stabiliserede blodprøver 3 og 7 dage efter podning med gylle/virus-blandingen, T_0, 35°C. De anvendte grise vejede 35-40 kg.

2.7.1. Blodprøveundersøgelser

Serum fra de ustabiliserede blodprøver blev i en blokerings-ELISA undersøgt for specifikke antistoffer imod henholdsvis Auj.-virus (Sørensen & Lei, 1986) og SP-virus (Have, 1984), mens der blev anvendt en neutralisationstest (Bitsch, 1978) til undersøgelse for specifikke antistoffer imod IBR-virus.
Plasma fra de stabiliserede blodprøver i SP-podningsforsøget blev undersøgt for infektivt SP-virus ved podning på PK-15 celler. Til påvisning af virus i cellekulturerne anvendtes immunofluorescens-farvning.

3. RESULTATER

3.1. Infektivitetstitreringer

3.1.1. Porcint parvovirus

Den initiale koncentration af porcint parvovirusvirus i gyllen var beregnet til $10^{6,0}$ $TCID_{50}$ /50µl. Inaktiveringsforløbet i svinegylle ved 5, 20, 35, 40, 45, 50 og 55°C er vist på Fig. 1-3.
For virus i gylle opbevaret ved 5°C kan der ikke registreres noget fald i virustiteren over en periode på 40 uger. Ved 20°C er virustiteren i gyllen faldet med cirka 10^1 $TCID_{50}$ i løbet af en periode på 43 uger. Ved 35 og 40°C blev virus inaktiveret i løbet af henholdsvis 21 og 9 uger, mens det ved 45°C var netop detekterbart 19 dage efter tilsætningen. Ved 50°C kunne infektivt virus endnu påvises efter 2 døgn, men ikke efter 5 døgn. Derimod kunne infektivt virus stadig påvises i gylle opbevaret ved 55°C i 7 dage.
I hele forsøgsperioden varierede pH imellem 7,1 og 7,9.

PPV fandtes som ventet meget termostabilt. Det blev desuden fundet, at virus ved flere af de anvendte temperaturer blev inaktiveret langsommere i gylle end i medium, hvilket er et udtryk for, at gyllen har en beskyttende effekt overfor dette virus.

3.1.2. BVD-virus

Den initiale koncentration af BVD-virus i gyllen var beregnet til $10^{5,2}$ $TCID_{50}$ /50µl. Inaktiveringsforløbet i kvæggylle ved henholdsvis 5, 20, 35, 40, 45, 50 og 55°C er vist på Fig. 4-6.
I gylle opbevaret ved 5 og 20°C blev virus inaktiveret i løbet af henholdsvis 3 uger og 3 dage. Ved 35, 40 og 45°C kunne infektivt virus ikke påvises efter henholdsvis 3 timer, 50 minutter og 20 minutter. Ved både 50 og 55°C kunne infektivt virus ikke påvises efter 5 minutter.
I forsøgsperioden varierede pH i gyllen imellem 6,9 og 7,8.
Inaktiveringen af virus i gylle foregik ved alle de anvendte temperaturer betydeligt hurtigere end inaktiveringen af "Virus i medium", kontrol. I temperaturområdet 50-55°C synes temperaturen dog at have en inaktiverende effekt i sig selv.

3.1.3. Svineinfluenzavirus

Forsøgene med SI-virus blev, i modsætning til de øvrige forsøg, udført ved at den samlede mængde virus blev fortyndet 1:20 i gylle, som var nedkølet til 5°C. Gylle/virus-blandingen blev, efter omrøring ved 5°C i 1 time på magnetomrører, fordelt på rør i portioner á 5 ml og rørene blev herefter fordelt ved de tidligere nævnte forsøgstemperaturer. Ved hver udtagning blev 4 rør tilsat 10% serum og nedfrosset (se "Udtagning af prøver"). Der blev foretaget pH måling på et af de 4 udtagne rør før serumtilsætningen.
I forsøgsperioden varierede pH i gyllen imellem 7,2 og 7,9.
Initialkoncentration af SI-virus i gyllen var beregnet til $10^{5,8}$ $TCID_{50}$ /50µl. Inaktiveringsforløbet ved 5, 20, 35, 40, 50 og 55°C er vist på Fig. 7-9. Forsøgene ved 45°C måtte udgå af tekniske grunde.

I gylle opbevaret ved 5 og 20°C blev virus inaktiveret i løbet af henholdsvis cirka 9 uger og 15 dage. Ved 35 og 40°C kunne infektivt SI-virus stadig påvises efter 1 døgns udrådning, ved 40°C dog kun i en mængde lige omkring detektionsgrænsen, mens der ved 35°C var sket et titerfald i forhold til den beregnede udgangskoncentration på cirka $10^{4,5}$ $TCID_{50}$. Ved 50°C var infektivt virus stadig netop detekterbart efter 2 1/2 times udrådning. Infektivt virus kunne ikke påvises efter 1 times udrådning ved 55°C.
Inaktiveringsforløbet for SI-virus i gylle ved 5 og 20°C adskiller sig ikke væsentligt fra inaktiveringsforløbet for "Virus i medium", kontrol. Ved 35, 40 og 50°C foregår inaktiveringen af virus i gylle derimod væsentlig hurtigere end i de tilsvarende "Virus i medium", kontroller. Der synes således ved disse udrådningstemperaturer at være andre faktorer, som har betydning for inaktiveringen i gyllen. Når forsøget udføres ved 55°C ses en tydelig varmeinaktivering af virus.

3.1.4. IBR-virus

Den initiale koncentration af IBR-virus i gyllen var beregnet til $10^{5,1}$ $TCID_{50}$ /50µl. Inaktiveringsforløbet i kvæggylle ved 5, 20, 35, 40, 45, 50 og 55°C er vist på Fig. 10-12.
I gylle opbevaret ved 5°C kunne der stadig påvises infektivt virus 4 uger efter forsøgets start, men når temperaturen blev øget til 20°C blev virus inaktiveret i løbet af 2 dage. Ved 35, 40 og 45°C, kunne virus ikke påvises ved titrering på cellekulturer efter henholdsvis 24 timer, 3 timer og 1 1/2 time. Ved 50 og 55°C blev virus inaktiveret i løbet af henholdsvis 40 minutter og 10 minutter. Ved aflæsning af titreringerne på cellekulturerne blev det imidlertid observeret, at når den infektive virustiter i gyllen nåede ned under 10^3 $TCID_{50}$, var udviklingen af virusanslag (CPE) i fortyndingen 1:10 meget inkonstant, hvilket nedsatte følsomheden af testen med ca. 10^1 $TCID_{50}$.
I hele forsøgsperioden varierede pH i gyllen imellem 7,3 og 7,8.

Inaktiveringen af virus i gylle foregik ved alle de anvendte temperaturer hurtigere end i de tilsvarende "Virus i medium", kontroller. Ved 55°C havde temperaturen i sig selv dog en betydelig inaktiverende effekt, som medførte at "Virus i medium", kontrol blev inaktiveret i løbet af 30 minutter.

3.1.5. Aujeszky-virus

Den initiale koncentration af Auj.-virus i gyllen var beregnet til $10^{5,2}$ $TCID_{50}$ /50µl. Inaktiveringsforløbet i svinegylle ved 5, 20, 35, 40, 45, 50 og 55°C er vist på Fig. 13-15.
I gylle opbevaret ved 5 og 20°C blev virus inaktiveret i løbet af henholdsvis cirka 15 uger og 14 dage. Ved 35, 40 og 45°C kunne infektivt Auj.-virus ikke påvises efter henholdsvis 5 timer, 2 timer og 45 minutter. Ved 50 og 55°C kunne infektivt virus ikke påvises efter henholdsvis 20 og 10 minutter.
I forsøgsperioden varierede pH i gyllen mellem 7,6 og 7,9.
Især i temperaturområdet 35-45°C foregik inaktiveringen af virus væsentlig hurtigere i gylle end i medium. Ved 50 og 55°C havde varmen i sig selv en betydelig inaktiverende effekt, som medførte, at også "Virus i medium", kontrol blev hurtigt inaktiveret.
Resultatet af forsøget med 3 forskellige initiale koncentrationer af Auj.-virus i svinegylle udrådnet ved 40°C er vist i Fig. 16.
Den beregnede initiale koncentration af virus i gyllen var henholdsvis $10^{5,2}$, $10^{4,2}$ og $10^{3,2}$ $TCID_{50}$ /50µl, hvilket er i god overensstemmelse med de opnåede T_0 værdier. Tiden som krævedes for at opnå en inaktivering af virus var henholdsvis 2 1/2 time, 1 time og 10 minutter.
Sammenligningen af inaktiveringsforløbet for Auj.-virus i henholdsvis kvæg- og svinegylle ved 40°C er illustreret i Fig. 17.
Infektivt virus kunne ikke påvises i kvæggylle 40 minutter efter podning, hvorimod virus kunne påvises 2 timer efter tilsætning til svinegylle, men ikke efter 2 1/2 time. I forsøget anvendtes kvæggylle med et pH på 7,4 og svinegylle med et pH på 7,3.

3.1.6. Mund- og klovesyge-virus

Den initiale koncentration af MKS-virus i gyllen var beregnet til $10^{4,8}$ $TCID_{50}$ /50µl. Inaktiveringsforløbet i svinegylle ved 5, 20, 35, 40, 45, 50 og 55°C er vist på Fig. 18-20.

I svinegylle opbevaret ved 5°C var der stadig infektivt virus tilbage efter 14 uger; men når opbevaringstemperaturen blev øget til 20°C kunne infektivt virus ikke påvises efter 14 dage. Ved 35, 40 og 45°C kunne infektivt virus ikke påvises efter henholdsvis 24 timer, 10 timer og 5 timer. Ved såvel 50 som 55°C kunne infektivt virus ikke påvises efter 1 time.

I forsøgsperioden varierede pH i gyllen i forsøgene udført ved 5, 20, 35, 40 og 45°C imellem 7,7 og 8,1, mens pH i forsøgene udført ved 50 og 55°C nåede op på henholdsvis 8,4 og 8,2.

Sammenligningen af inaktiveringsforløbet for MKS-virus i henholdsvis kvæg- og svinegylle ved 20, 35 og 55°C er vist på Fig. 21. Ved 20°C kunne infektivt virus ikke påvises i kvæg- og svinegylle efter henholdsvis 35 og 14 dages forløb. Ved 35°C sås ligeledes et hurtigere inaktiveringsforløb for MKS-virus i svinegylle; men ved denne temperatur blev tidspunktet for fuldstændig inaktivering af virus ikke bestemt. Efter 40 minutter ved 55°C kunne infektivt virus ikke påvises i svinegylle, mens infektivt virus stadig kunne påvises i kvæggylle efter 1 time. I forsøget varierede pH i kvæggyllen imellem 7,3 og 7,7 mens pH i svinegyllen varierede imellem 7,1 og 7,7.

3.1.7. Svinepest-virus

Den initiale koncentration af SP-virus i gyllen var beregnet til $10^{4,2}$ $TCID_{50}$ /50µl. Inaktiveringsforløbet i svinegylle ved 5, 20, 35, 40, 45, 50 og 55°C er vist på Fig. 22-24.

I svinegylle opbevaret ved 5°C kunne der stadig påvises infektivt virus efter 6 ugers forløb. Ved 20°C kunne infektivt virus ikke påvises efter 15 dage. Ved 35°C blev virus inaktiveret i løbet af 4 timer, mens der ved 40 og 45°C stadig kunne påvises infektivt virus efter udrådning i 3 timer.

I forsøgene som blev udført ved 50 og 55°C var det ikke muligt at påvise infektivt virus umiddelbart efter tilsætningen af podevirus til den forvarmede gylle (T_0).
I forsøgsperioden varierede pH i gyllen imellem 7,7 og 8,0.

3.1.8. TGE-virus

Den initiale koncentration af TGE-virus i gyllen var beregnet til $10^{5,2}$ $TCID_{50}$ /50µl. Inaktiveringsforløbet i svinegylle ved 5, 20, 35, 40, 45, 50 og 55°C er vist på Fig. 25-27.
I forsøget udført ved 5°C blev virustiteren reduceret med ca. 10^4 $TCID_{50}$ i løbet af en 8 ugers periode. Når temperaturen blev øget til 20°C, blev virus inaktiveret i løbet af 14 dage. Ved 35°C blev virus inaktiveret i løbet af 24 timer, ved 40°C var virus stadig netop detekterbart 5 timer efter podning af gyllen, mens virus ved 45°C blev inaktiveret i løbet af 2 1/2 time. Ved 50 og 55°C kunne infektivt virus ikke påvises efter henholdsvis 1 time og 1/2 time.
I hele forsøgsperioden varierede pH i gyllen imellem 7,1 og 7,7.
Inaktiveringen af TGE-virus foregår ved alle de undersøgte temperaturer hurtigere i gyllen end i "Virus i medium", kontrollerne.

3.2. Påvisning af virusantigen

Resultaterne fra ELISA undersøgelserne er vist på Fig. 28-32.
På alle figurerne (undtagen for SI-virus, 20°C, hvor ELISA undersøgelserne for "Virus i medium", kontrol mangler) ses et nogenlunde ens forløb for virus-antigen i supernatanter og for virus-antigen i "Virus i medium", kontroller. Ved sammenligning med virus-inaktiveringskurverne ses at disses forløb ikke følger virus-antigen kurverne. Resultaterne tyder således ikke på, at det i infektivitetstitreringerne fundne titerfald skyldtes en opkoncentrering af virus i bundfaldet.

3.3.Podning af naturlige værtsdyr

3.3.1. IBR-virus

De 3 kalve, som blev podet med T_0, 45°C-prøverne, fik 7 dage efter podning kliniske symptomer med flåd fra øjne og næse, ophørt ædelyst samt temperaturforhøjelse, og der blev påvist specifikke antistoffer imod IBR-virus i alle 3 blodprøver udtaget 3 uger efter podningen. De 3 kalve som blev podet med gylle/virusblanding udrådnet ved 45°C i 1 1/2 time udviklede ingen symptomer; men der blev påvist specifikke antistoffer i blodprøverne fra alle 3 kalve 3 uger efter podningen, som udtryk for at dyrene havde gennemgået en aktiv infektion. Endelig udviklede de 3 kalve podet med gylle/virus-blanding opbevaret ved 45°C i 2 1/2 time ikke specifikke antistoffer.

Resultatet af podningsforsøget med IBR-virus/gylle på kalve viser, at opbevaring af gyllen ved 45°C i 1 1/2 time ikke var tilstrækkeligt til at inaktivere den tilførte mængde virus. Ved infektivitets titrering på cellekultur af en tilsvarende prøve udrådnet ved 45°C i 1 1/2 time var der ikke blevet påvist infektivt virus, hvilket formodentlig skyldes den under "IBR-virus" omtalte nedsatte følsomhed af testen forårsaget af en manglende udvikling af CPE ved anvendelse af fortyndingen 1:10.

Under hensyntagen til den nedsatte følsomhed af infektivitetstitreringerne på cellekulturerne giver de udførte forsøg ikke belæg for at antage, at IBR-virus opkoncentreres eller beskyttes imod inaktivering i bundfaldet.

3.3.2.Aujeszky-virus

Ingen af grisene podet med Auj.-virus/gylle-blanding udviklede kliniske symptomer. De 3 grise podet med T_0, 45°C-prøverne, havde udviklet specifikke antistoffer 11 dage efter podningen, mens de 3 grise podet med gylle udrådnet ved 45°C i 45 minutter forblev seronegative i en 4 ugers periode efter podningen.

Resultatet af podningsforsøget med Auj.-virus/gylle på grise viser således, at opbevaring af gyllen ved 45°C i 45 minutter var tilstrækkelig til at inaktivere den tilførte mængde virus, som inden udrådningen var i stand til at etablere en infektion. Dette er i overensstemmelse med resultatet af infektivitetstitreringerne på cellekulturerne.

3.3.3. Svinepest-virus

De 3 grise som blev podet med gylle/virus-blanding udrådnet ved 35°C i 1 time udviklede hverken kliniske symptomer eller specifikke antistoffer i en 6 ugers periode efter podningen. De samme grise blev herefter som tidligere nævnt podet med gylle/virus-blandingen T_0, 35°C, og 5 dage efter denne podning fik grisene forhøjet temperatur. Der blev påvist SP-virus i blodprøver udtaget fra alle 3 grise både 3 og 7 dage efter sidstnævnte podning, og i blodprøver udtaget 4 1/2 uge efter podningen kunne der påvises specifikke antistoffer.

De 3 grise, som blev podet med gylle/virus-blanding udrådnet ved 40°C i 3 timer, udviklede ikke specifikke antistoffer i løbet af en 8 ugers periode efter podning.

Resultatet af podningsforsøget med svinepest-virus/gylle på grise viser, at udrådning af gyllen ved henholdsvis 35°C i 1 time og ved 40°C i 3 timer var tilstrækkelig til at inaktivere den tilførte mængde virus, som inden udrådningen var tilstrækkelig til at forårsage en infektion i grisene med deraf følgende udvikling af specifikke antistoffer.

Resultaterne af disse podningsforsøg giver ikke belæg for at antage at SP-virus opkoncentreres eller beskyttes imod inaktivering i bundfaldet. Udrådningstiden, som var nødvendig for at opnå en tilstrækkelig inaktivering af den tilsatte mængde virus, således at den tilbageblevne mængde af virus/ml gylle var mindre end én infektiv dosis for en gris, var således mindre end de ved infektivitetstitreringerne i cellekulturerne fundne inaktiveringstider.

4. DISKUSSION

4.1 Reisolering af virus fra gylle/virus-blandingerne

I forsøgene med BVD-, IBR-, svinepest- og TGE-virus fandtes en reisoleringsprocent i T_0-udtagningerne på op til 20-40% af den tilsatte virusmængde, mens reisoleringsprocenten for T_0-udtagningerne i forsøgene med porcint parvo-, svineinfluenza-, Auj.- samt MKS-virus nåede op på 100% . Disse reisoleringsprocenter er høje sammenlignet med resultater fra lignende forsøg (Srivastava & Lund, 1980; Lund & Nissen, 1983; Koch & Euler, 1984; Mack et al., 1986; Mckain & Hobson, 1987). Forklaringen herpå kan være anvendelsen af 10% serum i adsorptionsmediet, idet CPE ikke udvikledes når serum ikke var tilsat til dette medium. Når reisoleringsprocenten for BVD-, IBR-, svinepest- og TGE-virus ikke kommer op på 100%, kan det skyldes, at der er andre faktorer i gyllen som hurtigt inaktiverer virus, som foreslået af McKain & Hobson, (1987).

På grund af en toxisk effekt af ucentrifugerede gylle/virusprøver på cellekulturer blev der som nævnt udelukkende anvendt supernatanter fra centrifugerede prøver til infektivitetstitreringerne. Dette kunne antages at medføre en forsøgsusikkerhed, idet virus eventuelt kunne adsorberes til gyllepartikler og således bindes til bundfaldet, og desuden kunne eventuelt bundne virus partikler være beskyttet imod inaktivering. De opnåede resultater tyder dog ikke på, at disse forhold har nogen væsentlig betydning.

4.2. Påvisning af virusantigen

For at undersøge om virus blev adsorberet til og således opkoncentreret i bundfaldet, blev der ved hjælp af ELISA testen udført forsøg til bestemmelse af koncentrationen af virusantigen (d.v.s. såvel infektiøst som inaktiveret virus) i supernatanter og i "Virus i medium", kontroller. Formålet var at undersøge, om der samtidig med den registrerede reduktion i indhold af infektivt

virus i gylle kunne konstateres et fald i koncentrationen af virusantigen i supernatanterne. Et sådant sammenfald kunne være ensbetydende med at viruspartiklerne blev bundet til bundfaldet. Ved ingen af ELISA-undersøgelserne, som blev udført for SI-, porcint parvo-, BVD-, Auj,- samt MKS-virus, fremkom der resultater, som tydede på at de fundne virusinaktiveringer skyldtes en opkoncentrering af virus i bundfald.

4.3. Podning af naturlige værtsdyr

Podningerne i værtsdyr med ucentrifugerede gylle/virus-blandinger blev udført for at supplere cellekultursystemet med et ekstra og eventuelt mere følsomt system til påvisning af restinfektivitet i de udrådnede prøver. Endvidere ville det hermed være muligt at undersøge, om virus, som eventuelt var bundet til bundfaldet og derfor ikke kunne påvises ved titreringerne på cellekulturerne, var beskyttet imod inaktivering. Disse undersøgelser blev foretaget med gylle tilsat IBR-, Auj.- og svinepest-virus. De opnåede resultater giver ikke grundlag for til at antage, at virus i bundfaldet er beskyttet imod inaktivering.

4.4. Temperaturens betydning for inaktiveringshastigheden

I overensstemmelse med tidligere undersøgelser (Srivastava & Lund, 1980; Lund & Nissen, 1983; McKain & Hobson, 1987) blev det fundet, at inaktiveringshastigheden for virus i gylle øgedes med stigende temperatur. Imidlertid synes der også at være andre faktorer involveret, idet inaktiveringen i gylle i langt de fleste tilfælde forløber hurtigere end i medium. For flere af de tilsatte virus ses der især under mesofile betingelser en hurtigere inaktivering i gylle end i de tilsvarende "Virus i medium", kontroller. Der blev imidlertid observeret nogle undtagelser. Porcint parvovirus inaktiveres generelt som det eneste af de undersøgte virus langsommere i gyllen end i "Virus i medium", kontrollerne (50°C dog undtaget) og synes dermed beskyttet af gyllen.

4.5. Ammoniak

Ammoniak har været diskuteret som en mulig virusinaktiverende faktor i gyllen, men dette er kun fundet at være af betydning, når pH er over 8, og fri ammoniak (NH_3) dermed er til stede i gyllen (Ward & Ashley, 1977; Wekerle & Albrecht, 1983). I de foreliggende undersøgelser har pH kun undtagelsesvis været over 8, og der må derfor antages at være andre faktorer end ammoniak, som er involveret i inaktiveringen af virus i gyllen.

4.6. Inaktiveringskurvens forløb for Auj.-virus

Især for Auj.-virus sås et markant fald i den infektive virustiter i den første periode sammenlignet med resten af perioden. I en undersøgelse foretaget af McKain & Hobson (1987) med porcint enterovirus fandtes en lignende excessiv inaktivering initialt, hvad enten virus var indesluttet i en dialyseslange og således beskyttet fra kontakt med faste partikler, eller det var frit i gyllen. Forklaringen på det initiale drop i virustiter kan derfor næppe forklares med en adsorption til faste partikler i gyllen, hvilket ELISA resultaterne i den foreliggende undersøgelse som nævnt heller ikke tyder på.

For at undersøge om det excessive initiale fald i infektivitet og den efterfølgende langsommere inaktivering af Auj.-virus eventuelt skyldtes tilstedeværelse af en lille stabil fraktion af viruspartikler, som foreslået af Monteith et al. (1986), blev der udført et forsøg ved 40°C med 3 forskellige udgangskoncentrationer. Resultatet af dette forsøg (Fig.16) indicerer, at den tilførte virussuspension indeholdt en lille mere stabil fraktion af viruspartikler på cirka 0,1%, hvilket svarer til følgende teoretiske titre for den stabile fraktion: $10^{2,2}$, $10^{1,2}$, og $10^{0,2}$ $TCID_{50}$ /50µl. For de to førstnævnte titre er dette nogenlunde sammenfaldende med knækket på kurven, og for den sidste titer er denne under detektionsgrænsen.

4.7. Sammenligning af inaktiveringshastigheden i kvæg- og svinegylle

For at undersøge om der er forskel på inaktiveringshastigheden i kvæg- og svinegylle, blev der foretaget sammenlignende undersøgelser af inaktiveringsforløbet for Auj.- og MKS-virus i de to typer af gylle. Resultaterne viser en tydelig forskel på inaktiveringshastigheden for begge virus i de to typer gylle. Auj.-virus inaktiveredes hurtigst i kvæggylle, mens MKS-virus blev inaktiveret hurtigst i svinegylle. Da pH i både kvæg- og svinegylle holdt sig indenfor værdierne 7,1-7,9, synes denne faktor ikke at have haft nogen betydning. Årsagen til forskellene i inaktiveringshastighederne i de to typer gylle kendes ikke; men det er bemærkelsesværdigt, at inaktiveringen foregår mindre hurtigt i gyllen fra de dyr som oftest inficeres.

5. KONKLUSION

De opnåede resultater er baseret på modelstudier, som skal afspejle forholdene i henholdsvis konventionelle gylletanke og i biogasanlæg med portionsvis udrådning. Forsøgene er udført med gylle tilsat cellekulturvirus, og inaktiveringsforholdene efter en sådan tilblanding kan ikke forventes at være helt de samme som ved tilstedeværelse af virus udskilt ved naturlig infektion.

En samlet oversigt over inaktiveringstiderne for de undersøgte virus ved såvel de konventionelle opbevaringstemperaturer som udrådningstemperaturerne er vist i Tabel 2. I oversigten angives tiden som krævedes for inaktivering af hele den tilsatte mængde virus, således at virus ikke længere kunne påvises ved isolering i cellekulturer.

Undersøgelserne viser, at traditionelt opbevaret gylle udgør en potentiel smittefare for husdyr. Afhængigt af virus kan denne smittefare strække sig over en periode på mere end 14 uger om

Tabel 2. Oversigt over de ved infektivitets titreringerne fundne inaktiveringstider for de undersøgte virus ved forskellige opbevarings-/udrådningstemperaturer.

	SI-virus	PPV	BVD-virus	IBR virus	Auj.-virus	MKS-virus		SP-virus	TGE-virus
Initial konc. af virus i gyllen $TCID_{50}/50\mu l$	$10^{5,8}$	$10^{6,0}$	$10^{5,2}$	$10^{5,1}$	$10^{5,2}$	$10^{4,8}$		$10^{4,2}$	$10^{5,2}$
- gylle	svine	svine	kvæg	kvæg	svine	svine	kvæg	svine	svine
Forsøgstemperatur									
5°C	9 uger	*>40 uger	3 uger	*>4 uger	15 uger	*>14 uger	I.u.	*>6 uger	*>8 uger
20°C	2 uger	*>40 uger	3 dage	2 dage	2 uger	2 uger	5 uger	2 uger	2 uger
35°C	*>24 timer	21 uger	3 timer	24 timer	5 timer	24 timer	*>24 timer	4 timer	24 timer
40°C	*>24 timer	9 uger	50 min.	3 timer	2 timer	10 timer	I.u.	*>3 timer	*>5 timer
45°C	I.u.	*>19 dage	20 min.	#1½ time	45 min.	5 timer	I.u.	*>3 timer	2½ time
50°C	*>2½ time	5 dage	5 min.	40 min.	20 min.	1 time	I.u.	momentant	1 time
55°C	1 time	8 dage	5 min.	10 min.	10 min.	1 time	*>60 min.	momentant	30 min.

* Tidspunktet for fuldstændig inaktivering (koncentration under detektionsgrænsen) ikke nået.

I.u. Ikke udført

\# Infektivt virus påvist ved podningsforsøg på kalve. Efter 2½ times udrådning ved 45°C kunne infektivt virus ikke påvises ved podning på kalve.

vinteren og på op til 5 uger om sommeren, efter tilførsel af frisk gylle. Parvovirus, som er betydeligt mere stabilt end de øvrige virus, udgør dog en undtagelse herfra.

Undersøgelserne viser endvidere at smitterisikoen reduceres betydeligt ved såvel mesofil som termofil udrådning af gyllen.

Ved fastlæggelse af hvilke krav der bør stilles til biogasfællesanlæg med henblik på at reducere mængden af infektivt virus inden udbringning fra anlægget, må følgende forhold medindrages i vurderingen:

1. Aktuel initialkoncentration af virus i gyllen ved behandlingens start:

Undersøgelser vedrørende forekomst af virus i gylle er kun foretaget i begrænset omfang, og der eksisterer derfor kun lidt viden om naturlige viruskoncentrationer i gylle. Derbyshire & Brown (1978) fandt imidlertid porcine enterovirus i koncentrationer på op til $10^{5,5}$ $TCID_{50}$/liter svinegylle, og Sellers (1980) har angivet $10^{5,5}$ og $10^{2,9}$ ID_{50}/gram henholdsvis kvæg- og svinefæces som de maximale titre fundet for mund- og klovesyge-virus i fæces (10^9 ID_{50}/gram vesikulært epithel).

2. Inaktiveringshastighed for det/de aktuelle virus under den pågældende behandling:

For bakterier synes inaktiveringen oftest at være eksponentiel, det vil sige at der igennem hele drabsperioden pr. tidsenhed inaktiveres en konstant procentdel af de overlevende bakterier (Schlundt, 1982, Larsen et al., 1989). Inaktiveringshastigheden kan ved et sådant drabsforløb udtrykkes ved decimeringstiden, T_{90} (tiden som hengår til 90% reduktion af populationen).
For nogle af de her undersøgte virus foregår inaktiveringen imidlertid ikke med konstant hastighed, idet denne foregår hurtigere i starten, hvor der er flest infektive viruspartikler til stede. Følgeligt synes decimeringstiden (T_{90}) ikke generelt anvendelig for virus.

3. Hvilken restkoncentration af virus kan anses for acceptabel hvis tilstedeværelse af infektivt virus overhovedet kan accepteres:

Den acceptable restkoncentration af infektivt virus i behandlet gylle afhænger af virusarten og anvendelsen af det færdigudrådnede produkt.

Som følge af den manglende viden om de aktuelle koncentrationer af virus i ubehandlet gylle, og på grund af at der ikke for alle virus kan angives en konstant inaktiveringshastighed, må andre kriterier danne grundlag for beslutningen om, hvilke krav der skal gælde for behandlingen af ubehandlet gylle og for driften af biogasfællesanlæg.
De beregnede initiale koncentrationer af virus i gylle i de foreliggende modelundersøgelser varierer fra $10^{7,3}$ til $10^{5,5}$ $TCID_{50}$/ml gylle. Dette er høje udgangstitre sammenlignet med de i litteraturen angivne koncentrationer for naturlig forekomst af virus i gylle/fæces. Man kan imidlertid ikke gå ud fra, at der under naturlige forhold sker en fuldstændig jævn fordeling af virus i gyllen, da virus kan findes koncentreret i vævsstykker som f.eks. afstødt tarmepithel eller vesikelepithel. Da der i modelforsøgene er anvendt kulturvirus, som er frit tilgængeligt og derfor muligvis inaktiveres hurtigere end virus udskilt fra inficerede dyr, må det være rimeligt at indlægge en sikkerhedsmargin ved fastsættelsen af de nødvendige krav til behandling af gyllen.
I tilfælde af udbrud med ondartede smitsomme sygdomme (eksotiske virus), vil det således være rimeligt at forlange, at gyllen mindst bliver udsat for en behandling, som i forsøgene har været tilstrækkelig til at inaktivere hele den tilsatte mængde af virus.

På basis af det foreliggende kendskab til smitstofinaktivering i biogasreaktorer er der af Larsen et al. (1989), for så vidt angår infektionshygiejnisk forsvarlig anvendelse af udrådnet gylle fra

biogasfællesanlæg med forskellige procesteknologier, givet følgende "kvalificerede skøn", væsentligst baseret på kendskab til forhold omkring bakterier og parasitter:

1. Termofil udrådning, 50-60°C, kontinuert, hydraulisk opholdstid mindst 10 døgn, Sikret opholdstid mindst 12 timer (aftapning før indfødning), derefter:
   a. Sort jord: efter "husdyrgødningsbekendtgørelsen" (Miljøministeriet, bekendtgørelse nr.15, 1986)
   b. Grøntafgrøder til slæt til konservering (hø, ensilage, pellettering): som a.
   c. Grøntafgrøder til afgræsning eller slætfodring: som a, karensperiode mindst 14 dage.

2. Mesofil udrådning, 30-35°C, portionsvis, opholdstid 15-20 døgn, derefter:
   som 1. a-c.

3. Mesofil udrådning, 30-35°C, kontinuert, hydraulisk opholdstid 15-20 døgn, sikret opholdstid mindst 24 timer, med termofil forbehandling, 50-60°C sikret opholdstid mindst 6 timer, derefter:
   som 1. a-c.

4. Mesofil udrådning, 30-35°C, kontinuert, hydraulisk opholdstid 15-20 døgn, sikret opholdstid mindst 24 timer, uden termofil forbehandling:
   efterlagring ved overlagring mindst 30 dage sommer og 60 dage vinter, derefter
   a. Sort jord: som 1.a.
   b. Grøntafgrøder: fortrinsvis til konservering, jf.1.b.
   c. Grøntafgrøder til afgræsning eller slætfodring som 1.c, karensperiode mindst 30 dage.

De ovenfor skønnede mulige retningslinier for infektionshygiejnisk forsvarlig anvendelse af gylle udrådnet i biogasfællesanlæg er som nævnt væsentligst baseret på kendskab til forhold omkring bakterier og parasitter. Det er derfor interessant at sammenholde disse retningslinier med resultaterne af de foreliggende virologiske undersøgelser. For alle de undersøgte virus, bortset fra porcint parvovirus, vil en behandling af gyllen efter de nævnte retningslinier være tilstrækkelig til at inaktivere virus i gyllen. Ved anvendelse af de i Pkt. 1-3 nævnte udrådningsprocedurer vil alene udrådningen give så stor en sikkerhed for inaktivering af virus, at de nævnte restriktioner vedrørende anvendelsen af slutproduktet kan slækkes eller eventuelt udelades.

Med hensyn til porcint parvovirus kan ingen af de beskrevne procedurer give sikkerhed for inaktivering af virus, men de vil alle, i særdeleshed den termofile udrådning, give anledning til en inaktivering, som langt overstiger den, som finder sted i konventionelle gylletanke ved såvel sommer- som vintertemperaturer.

Det skal sluttelig nævnes, at forudsætningen, for at anvendelse af biogasfællesanlæg ikke medfører øget fare for smittespredning, er, at håndteringen af den ubehandlede gylle sker forsvarligt ved afhentning og transport bl.a. ud fra den forudsætning, at der er størst smittefare ved frisk afsat gødning.

For så vidt angår de specielle smittespredningsproblemer, der opstår ved udbrud af ondartede virussygdomme, er de opnåede inaktiveringstider under traditionel opbevaring af gyllen af særlig interesse. Som det fremgår, kræves der for nogle af de undersøgte virus, f.eks. MKS-virus, adskillige uger ved 5°C, før smitterisikoen er reduceret væsentligt.

Det skal endelig bemærkes, at gylle som sådan er et relativt homogent medium, og at inaktiveringsbetingelserne kan blive væsentligt ændret, såfremt der tilføres andet materiale til gyllen, f.eks. slagteaffald. I sådanne tilfælde er rapportens konklusioner ikke umiddelbart overførbare, og stillingtagen vil kræve et nærmere kendskab til faktorer som findelingsgraden af materialet, inden det bliver tilført anlægget, og til henfaldet af det tilblandede materiale under udrådningen.

REFERENCER

Bitsch, V., 1978. The P37/24 modification of the Infectious Bovine Rhinotracheitis virus-serum neutralization test. Acta vet. Scand., 19: 497-505.

Derbyshire, J.B. and Brown, E.G., 1978. Isolation of animal viruses from farm lilvestock waste, soil and water. J. Hyg. Camb., 81: 295-302.

Derbyshire, J.B., Monteith, H.D. and Shannon, E.E., 1986. Virological Studies on an Anaerobic Digestion System for Liquid Pig Manure. Agric. Wastes, 18: 309-312.

Have, P., 1984. Detection of antibodies against swine fever virus by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Acta vet. Scand., 25: 462-465.

Jensen, M.H., 1981. Detection of antibodies against hog cholera virus and bovine viral diarrhea virus in porcine serum. Acta vet.scand., 22: 85-98.

Koch, K.M.A. and Euler, B., 1984. Lime as a disinfectant for pig slurry contaminated with Aujeszky's disease (Pseudorabies) virus (ADV). Agric. Wastes, 9: 289-297.

Larsen, H.Errebo & Munch, B.(red.), 1981. Sygdoms- og miljømæssige problemer i forbindelse med behandling og spredning af flydende husdyrgødning (gylle). Rapport til Statens jordbrugs- og veterinærvidenskabelige Forskningsråd, pp. 233. DSR´s boghandel, KVL. København

Larsen, H.Errebo, Munch. B., Elmerdahl, J. & Nansen, P., 1989. Om smitstofdrab og smitterisici ved udrådning af husdyrgødning i biogasanlæg. Dansk Veterinærtidsskrift, 24: 1411-1418

Lund, E., 1983. Virologi for veterinærstuderende. 7.udgave. DSR forlag. Landbohøjskolen. København.

Lund, E. and Nissen, B., 1983. The survival of enterovirus in aerated and unaerated cattle and pig slurry. Agric. Wastes, 7: 221-233.

Mack, von H., Wekerle, J. and Strauch, D., 1986. Vorläufige Mitteilung über die Isolierung von Aujeszky-Virus aus Fest- und Flüssigmist von Schweinen sowie aus Stalluft. Tierärztl. Umschau, 41: 32-38.

McKain, N. and Hobson, P.N., 1987. A note on the destruction of porcine enteroviruses in anaerobic digestions. Biologic. Wastes, 22: 147-155.

Miljøministeriets bekendtgørelse nr. 15 af 24. januar 1986. Bekendtgørelse om husdyrgødning og ensilage m.v.

Monteith, H.D., Shannon, E.E. and Derbyshire, J.B., 1986. The inactivation of a bovine enterovirus and a bovine parvovirus in cattle manure by anaerobic digestion,heat treatment, gamma irradiation, ensilage and composting. J. Hyg. Camb., 97: 175-184.

Olsen, J.E., Larsen, H.E. and Nansen, P., 1985. Smitstofreduktion ved Biogasproduktion i Husdyrbruget. Samarbejdsgruppen for Teknologisk Udvikling af Biogas, STUB. Rapport nr.20.

Reed, L.J. and Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hyg.,27: 493-497.

Schlundt, J., 1982. Overlevelse af sygdomsfremkaldende tarmbakterier i biogasanlæg og på gyllebehandlede marker. Licentiatafhandling, pp.215. Institut for veterinær mikrobiologi og hygiejne, KVL.

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

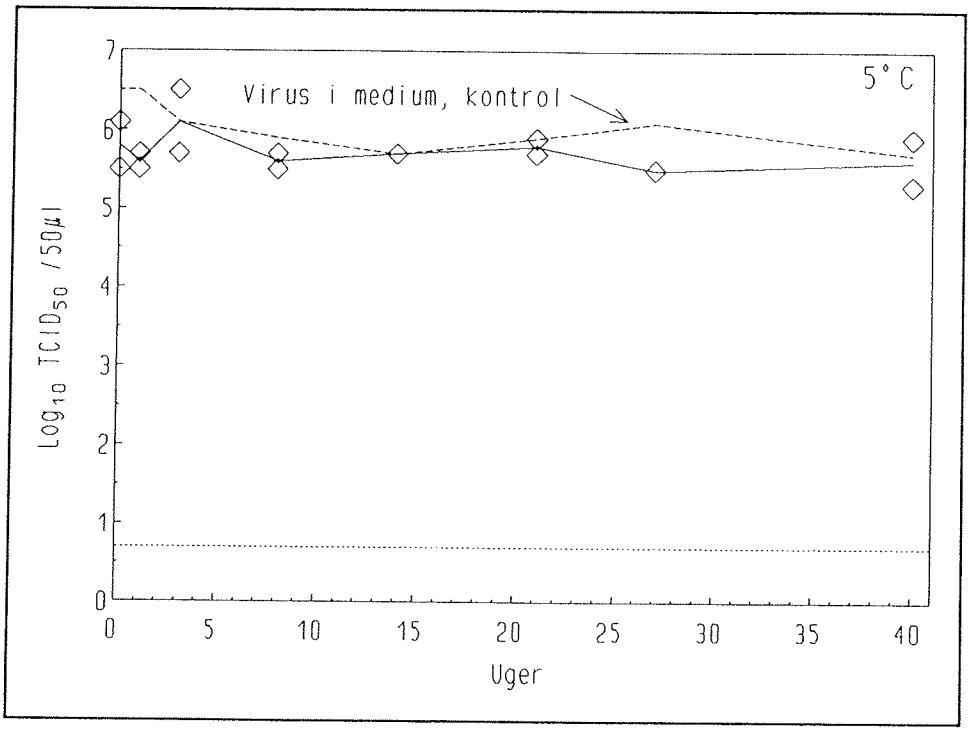
Shope, R.E., 1935. Experiments on the epidemiology of pseudo-rabies. J. Exp. Med., 62: 85-99.

Srivastava, R.N. and Lund, E., 1980. The stability of bovine parvovirus and its possible use as an indicator for the persistence of enteric viruses. Water Res., 14: 1017-1021

Sørensen, K.J. and Lei, J.C., 1986. Aujeszky's disease: Blocking ELISA for the detection of serum antibodies. J. Vir. Meth., 13: 171-181.

Ward, R.L. and Ashley, C.S., 1977. Identification of the virucidal agent in wastewater sludge. Appl. Environ. Microbiol., 33: 860-864.

Wekerle, J. & Albrecht, H., 1983. Inactivation of vaccinia virus and a bovine enterovirus in aerated pig slurry with special regard to pH, temperature and free ammonia modification during aeration. Agric. Wastes, 7: 39-50



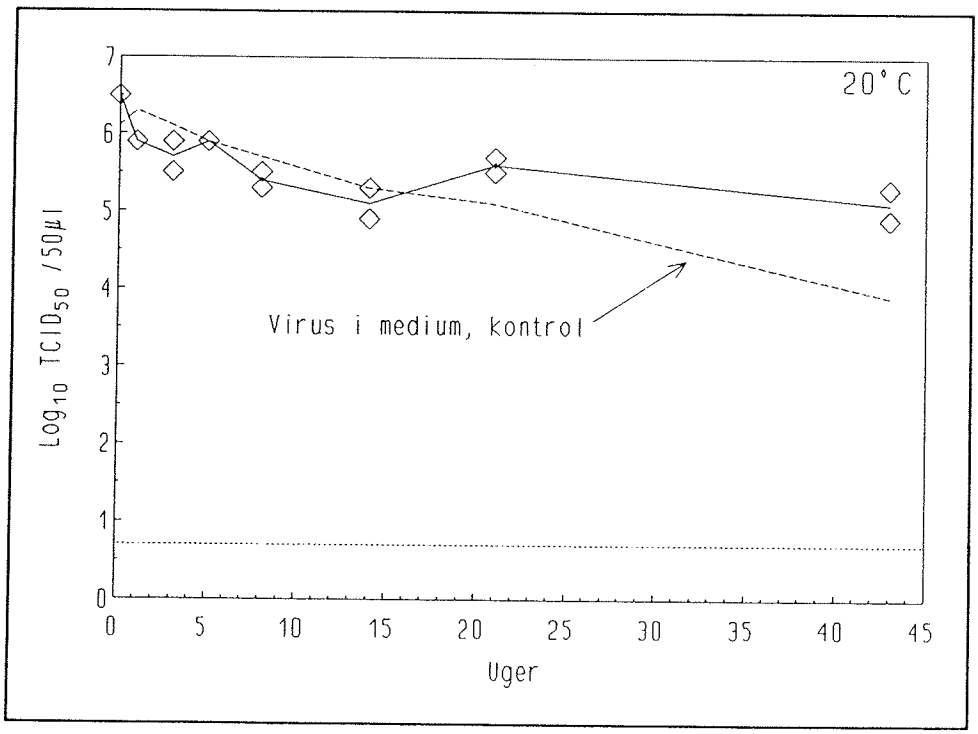


Fig.1. Inaktiveringsforløbet for porcint parvovirus i svinegylle ved traditionel opbevaring i gylletanke ved henholdsvis vinter- og sommertemperatur. ····· Detektionsgrænse.
◇ Virus påvist i gyllen.

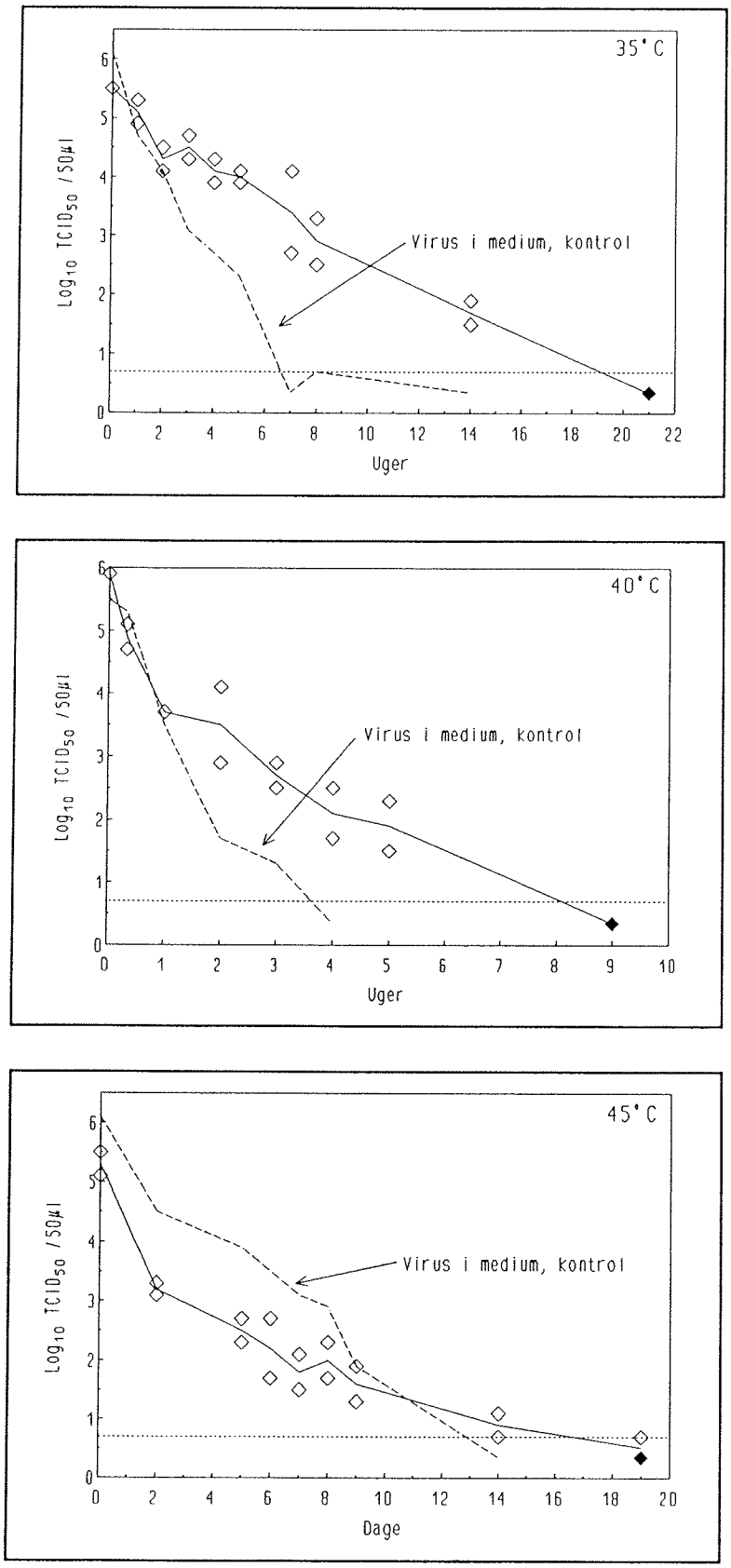
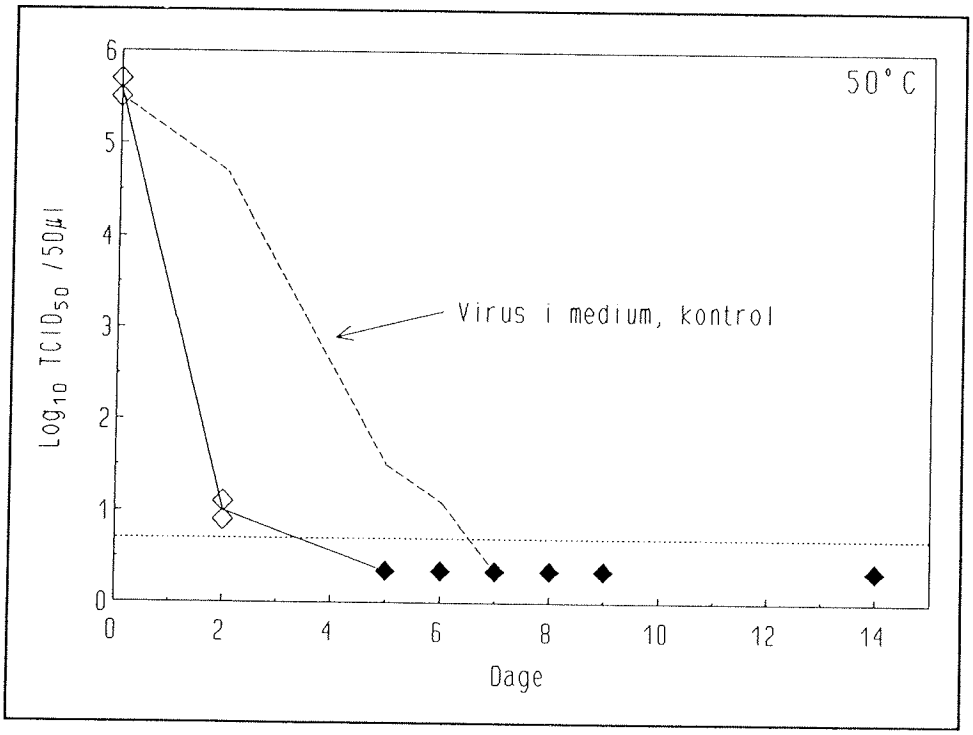


Fig. 2. Inaktiveringsforløbet for porcint parvovirus i svinegylle ved mesofil anaerob udrådning. ····· Detektionsgrænse.
◇ Virus påvist i gyllen. ◆ Virus ikke påvist i gyllen.



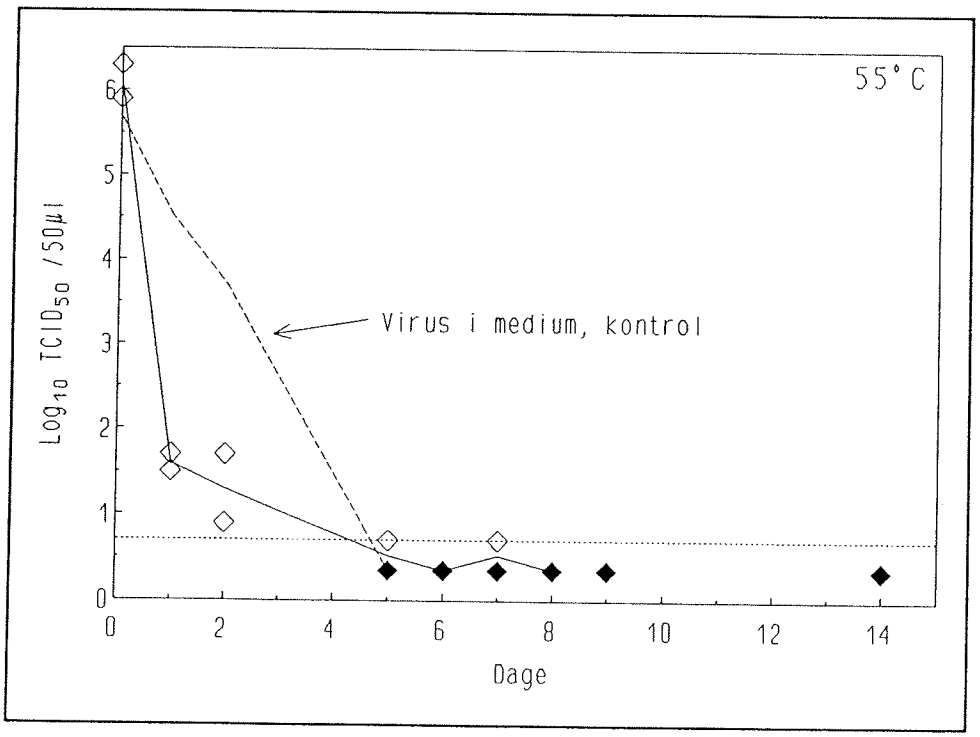
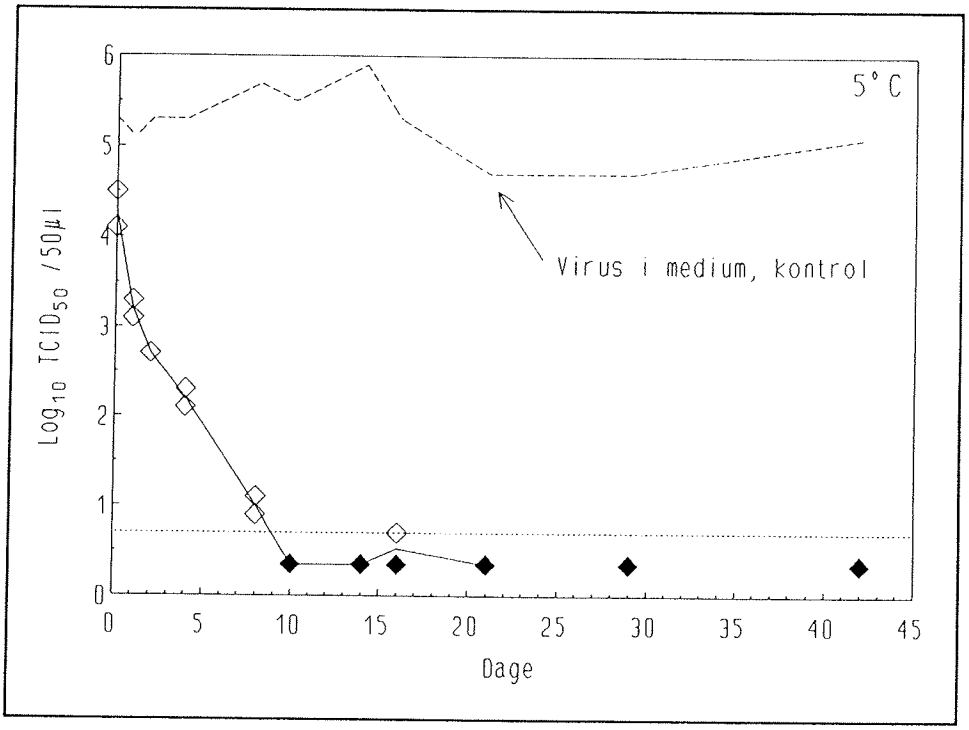


Fig. 3. Inaktiveringsforløbet for porcint parvovirus i svinegylle ved termofil anaerob udrådning. ····· Detektionsgrænse.
◇ Virus påvist i gyllen. ◆ Virus ikke påvist i gyllen.



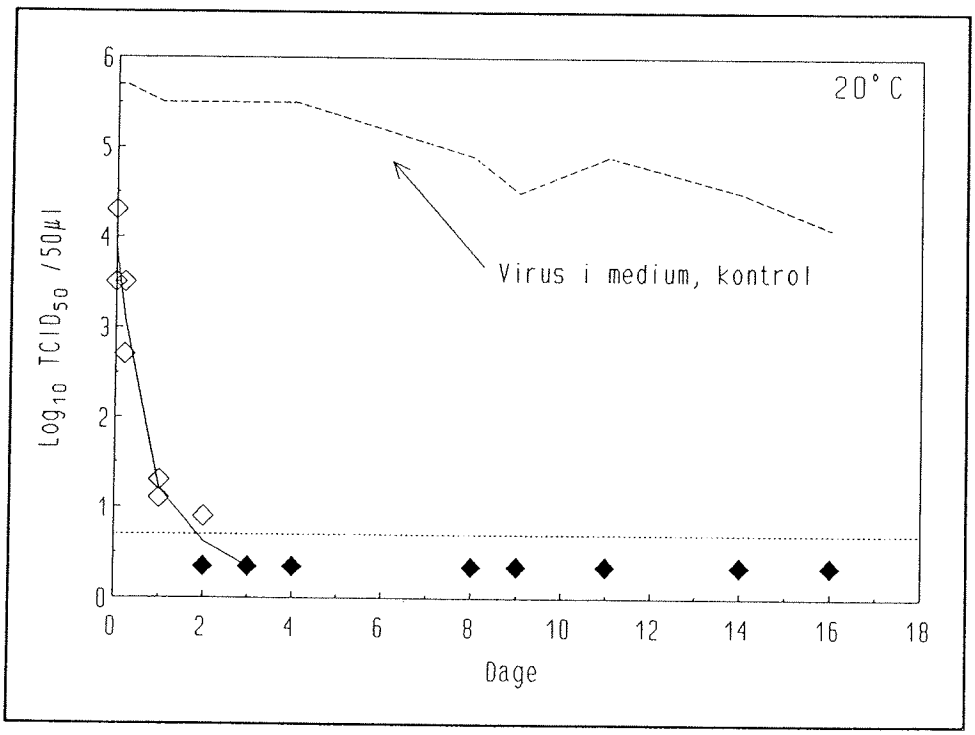
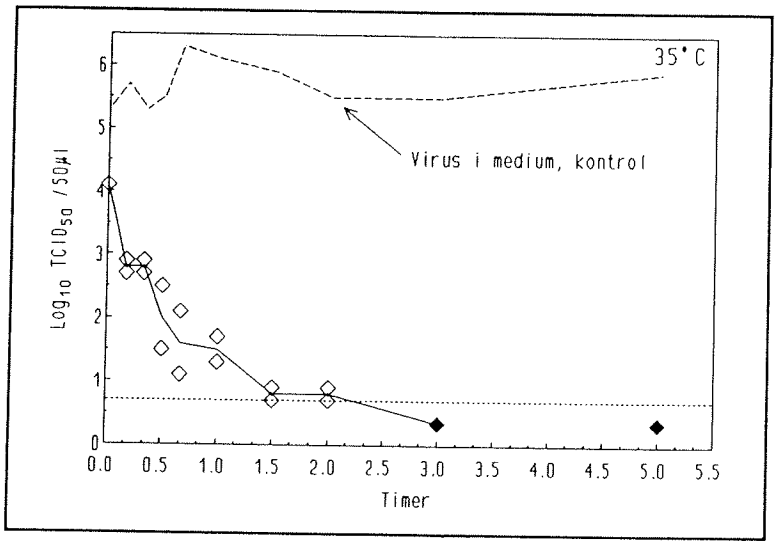
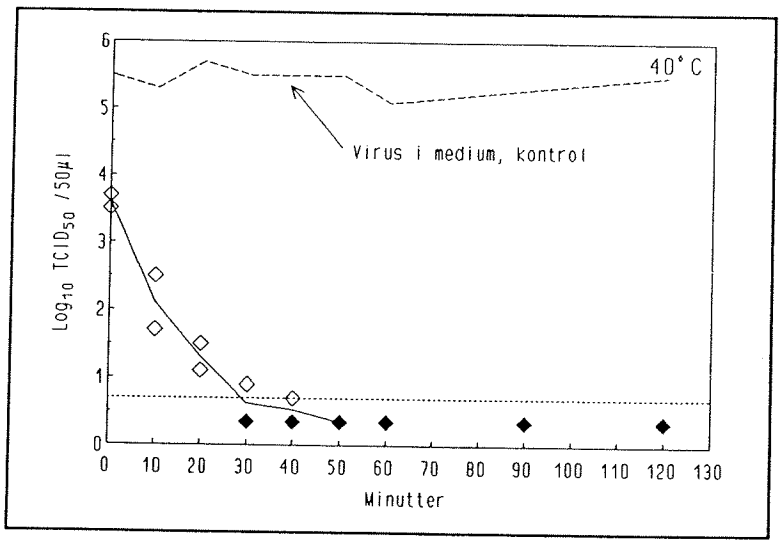


Fig. 4. Inaktiveringsforløbet for BVD-virus i kvæggylle ved traditionel opbevaring i gylletank ved henholdsvis vinter- og sommertemperatur. ····· Detektionsgrænse.
◇ Virus påvist i gyllen. ◆ Virus ikke påvist i gyllen.





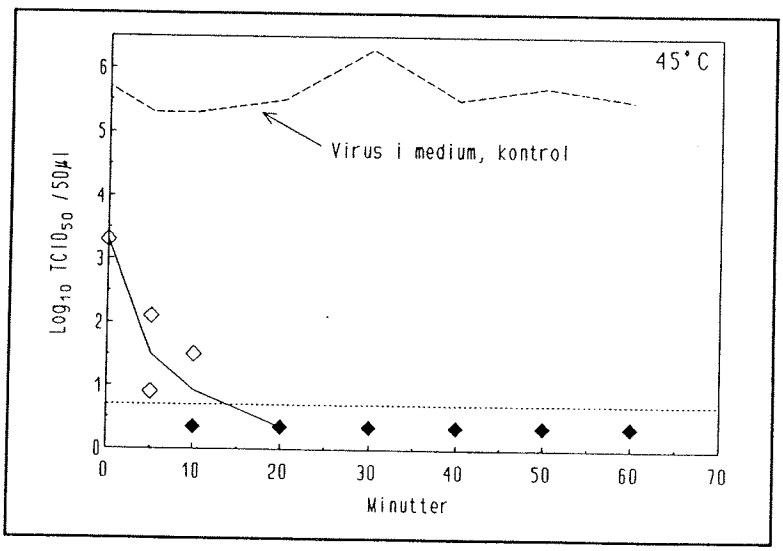
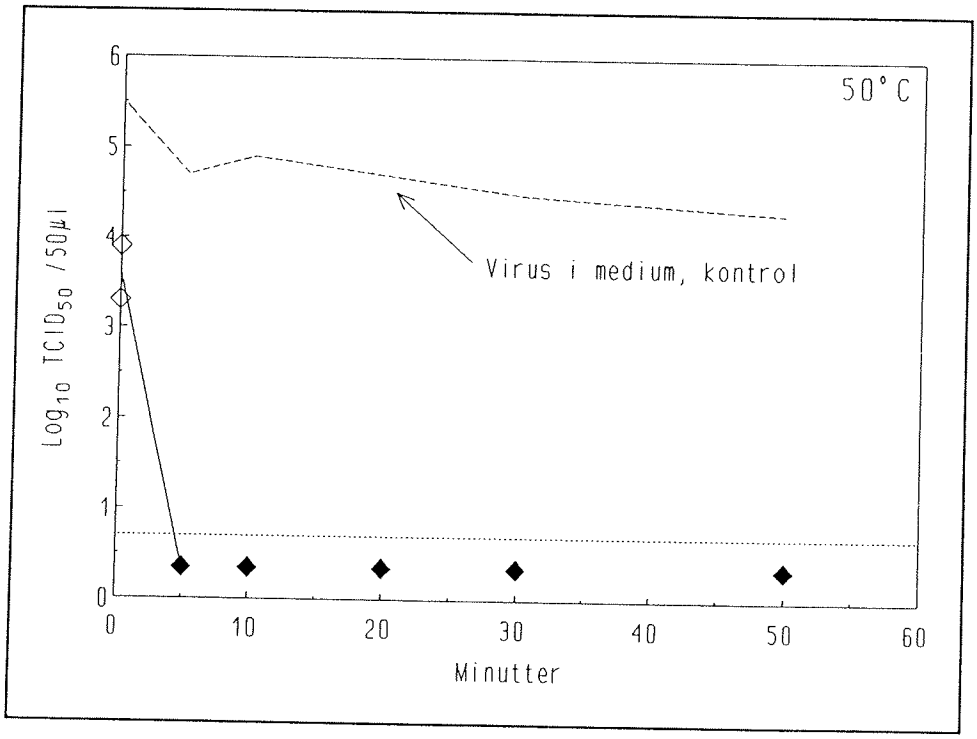


Fig.5. Inaktiveringsforløbet for BVD-virus i kvæggylle ved mesofil anaerob udrådning.
..... Detektionsgrænse.
◇ Virus påvist i gyllen. ◆ Virus ikke påvist i gyllen.



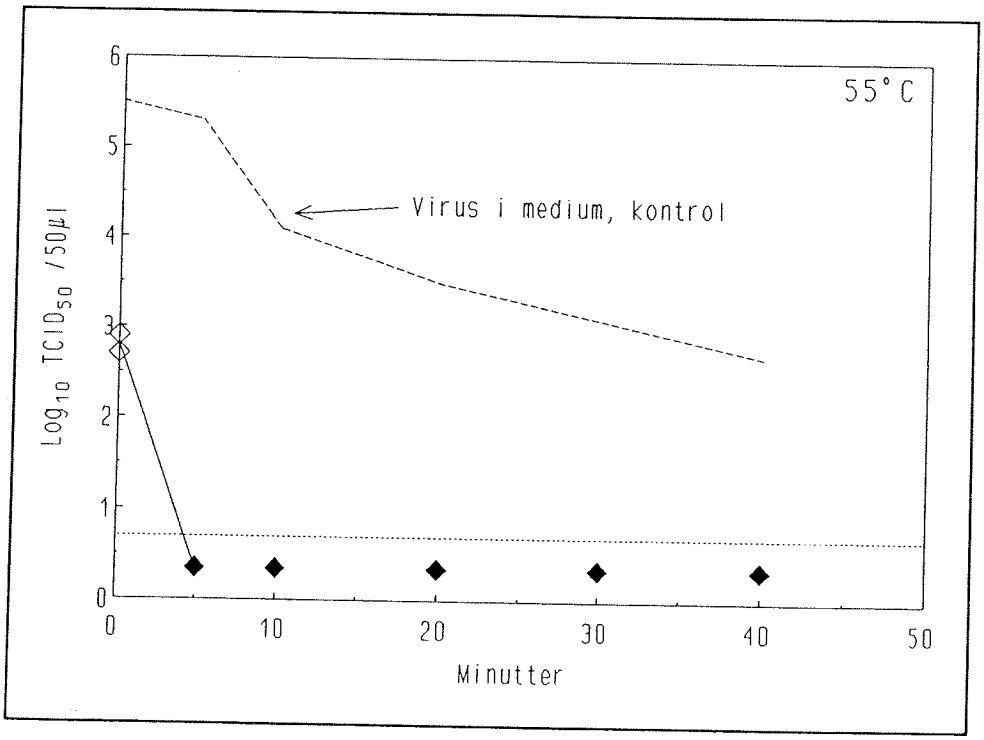
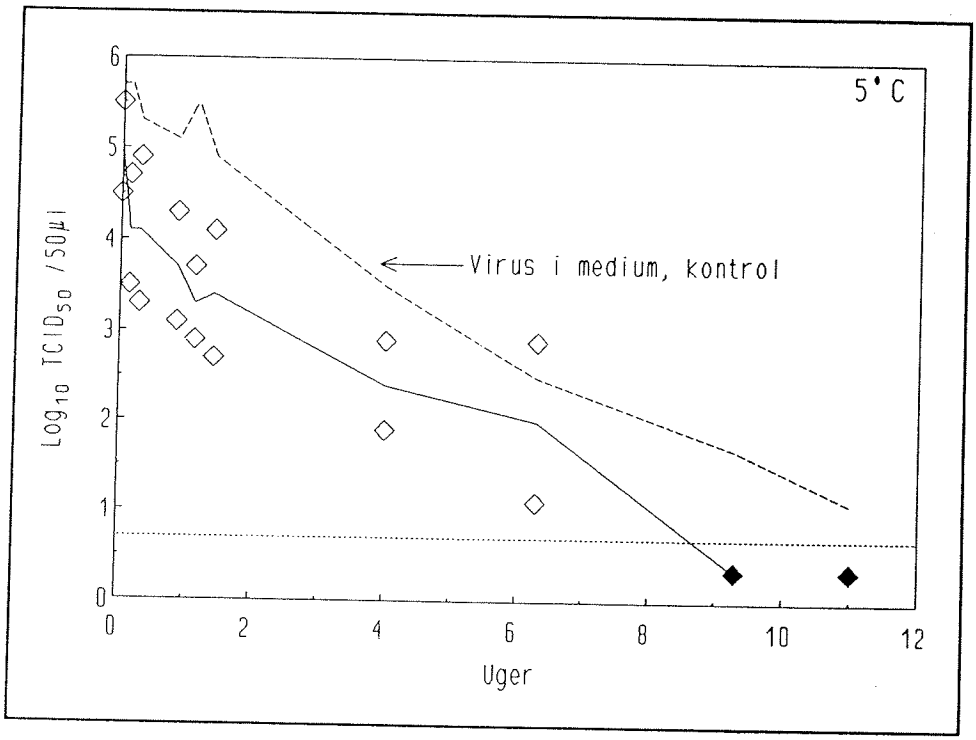


Fig. 6. Inaktiveringsforløbet for BVD-virus i kvæggylle ved termofil anaerob udrådning.
◇ Virus påvist i gyllen. ····· Detektionsgrænse. ◆ Virus ikke påvist i gyllen.



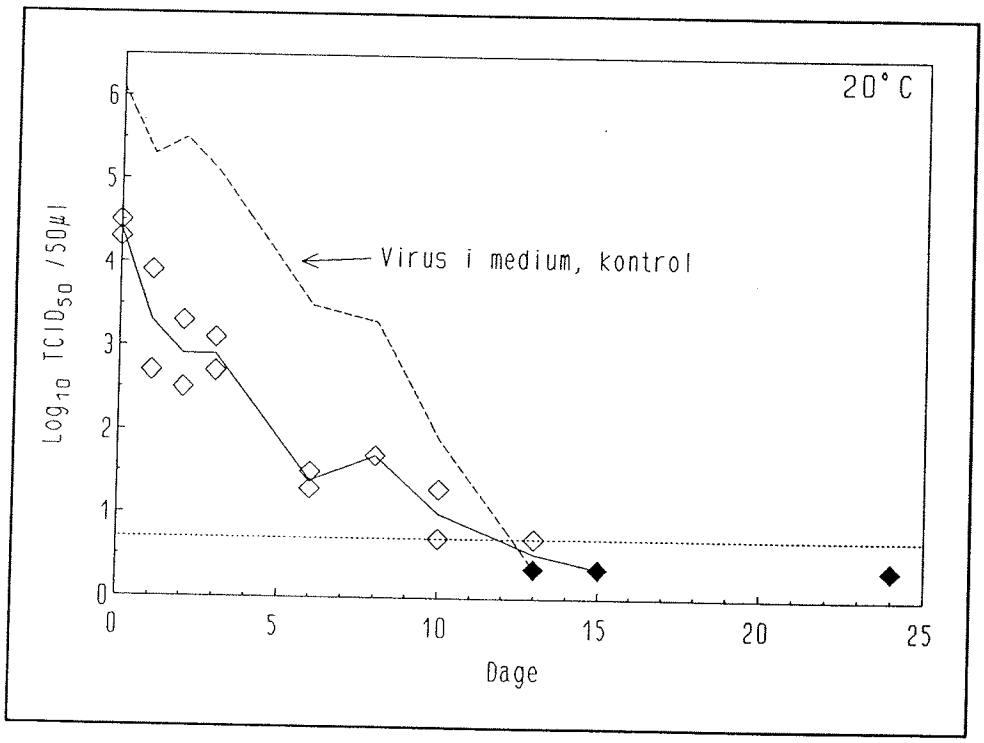
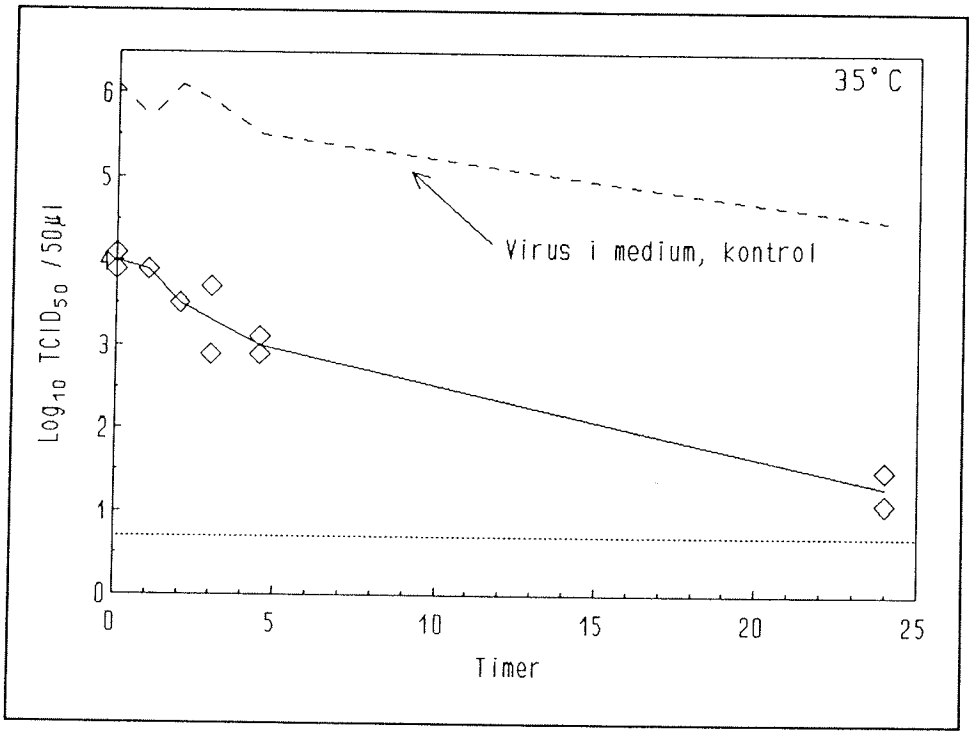


Fig. 7. Inaktiveringsforløbet for svineinfluenza-virus i svinegylle ved traditionel opbevaring i gylletanke ved henholdsvis vinter- og sommertemperatur. ····· Detektionsgrænse.
◇ Virus påvist i gyllen. ◆ Virus ikke påvist i gyllen.



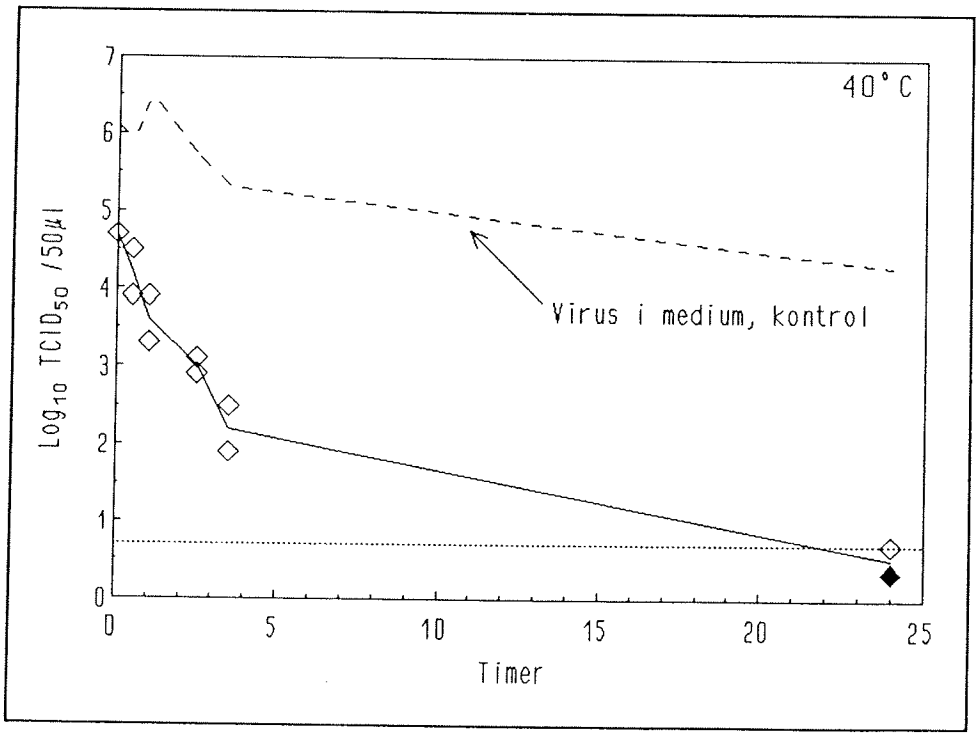
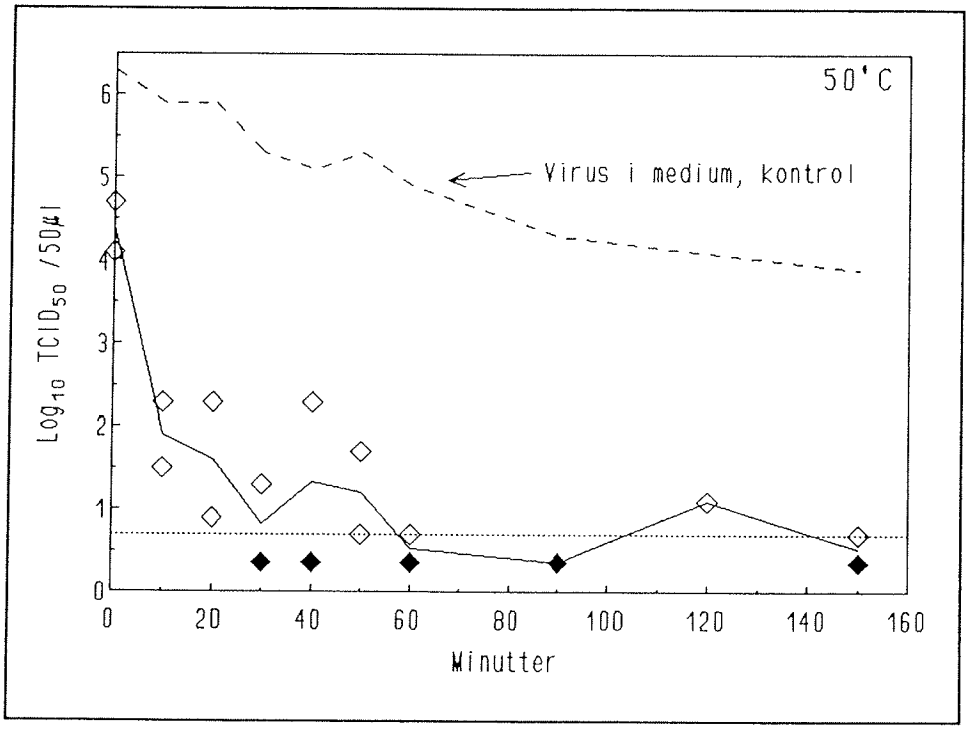


Fig. 8. Inaktiveringsforløbet for svineinfluenza-virus i svinegylle ved mesofil anaerob udrådning. ····· Detektionsgrænse.
◇ Virus påvist i gyllen. ◆ Virus ikke påvist i gyllen.



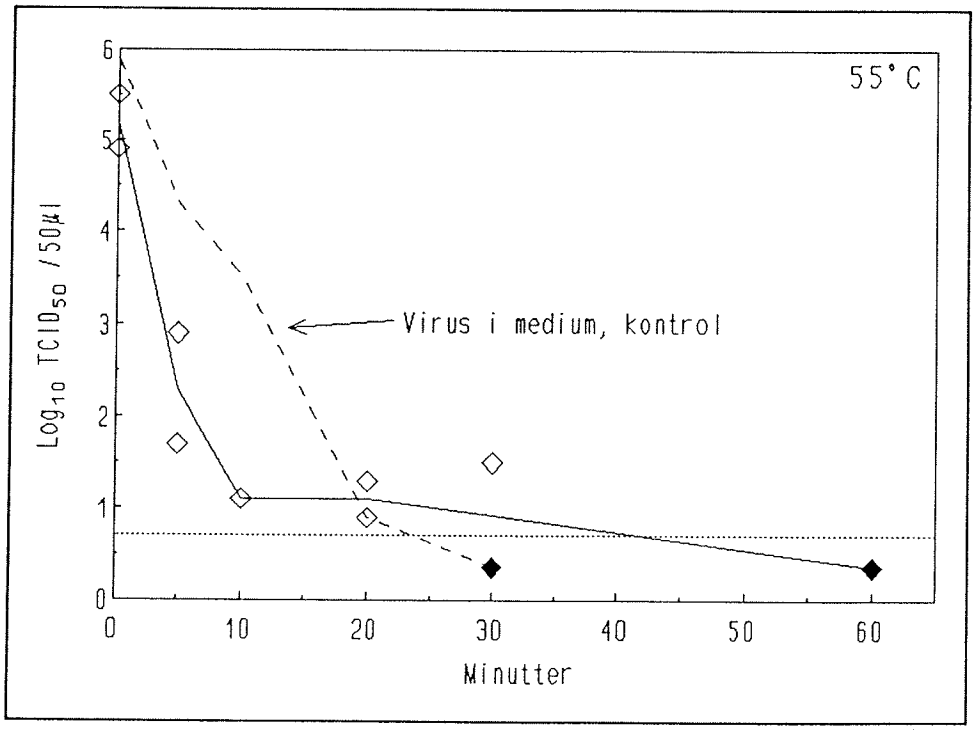
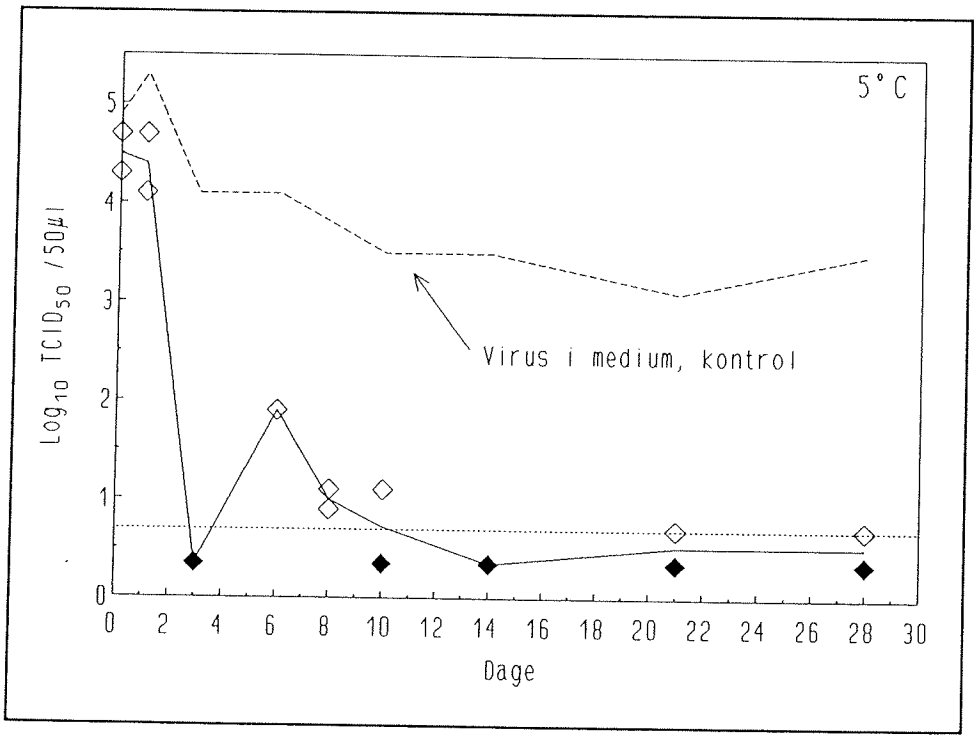


Fig. 9. Inaktiveringsforløbet for svineinfluenza-virus i svinegylle ved termofil anaerob udrådning. ····· Detektionsgrænse.
◇ Virus påvist i gyllen. ◆ Virus ikke påvist i gyllen.



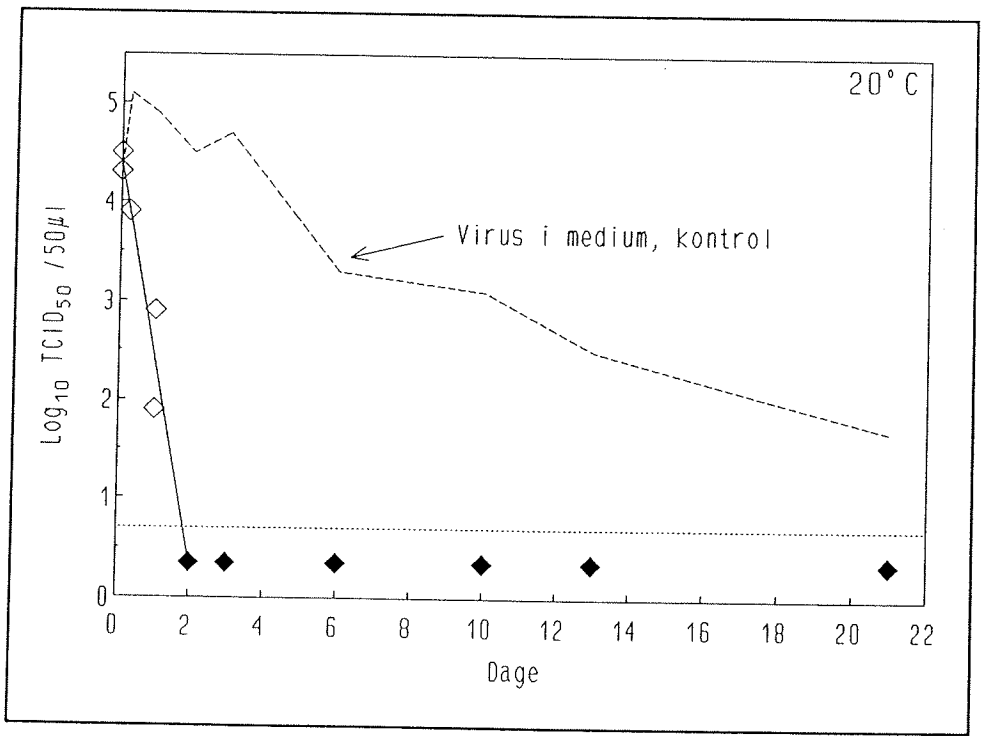


Fig.10. Inaktiveringsforløbet for IBR-virus i kvæggylle ved traditionel opbevaring i gylletank ved henholdsvis vinter- og sommertemperatur.

◇ Virus påvist i gyllen. ····· Detektionsgrænse. ◆ Virus ikke påvist i gyllen.

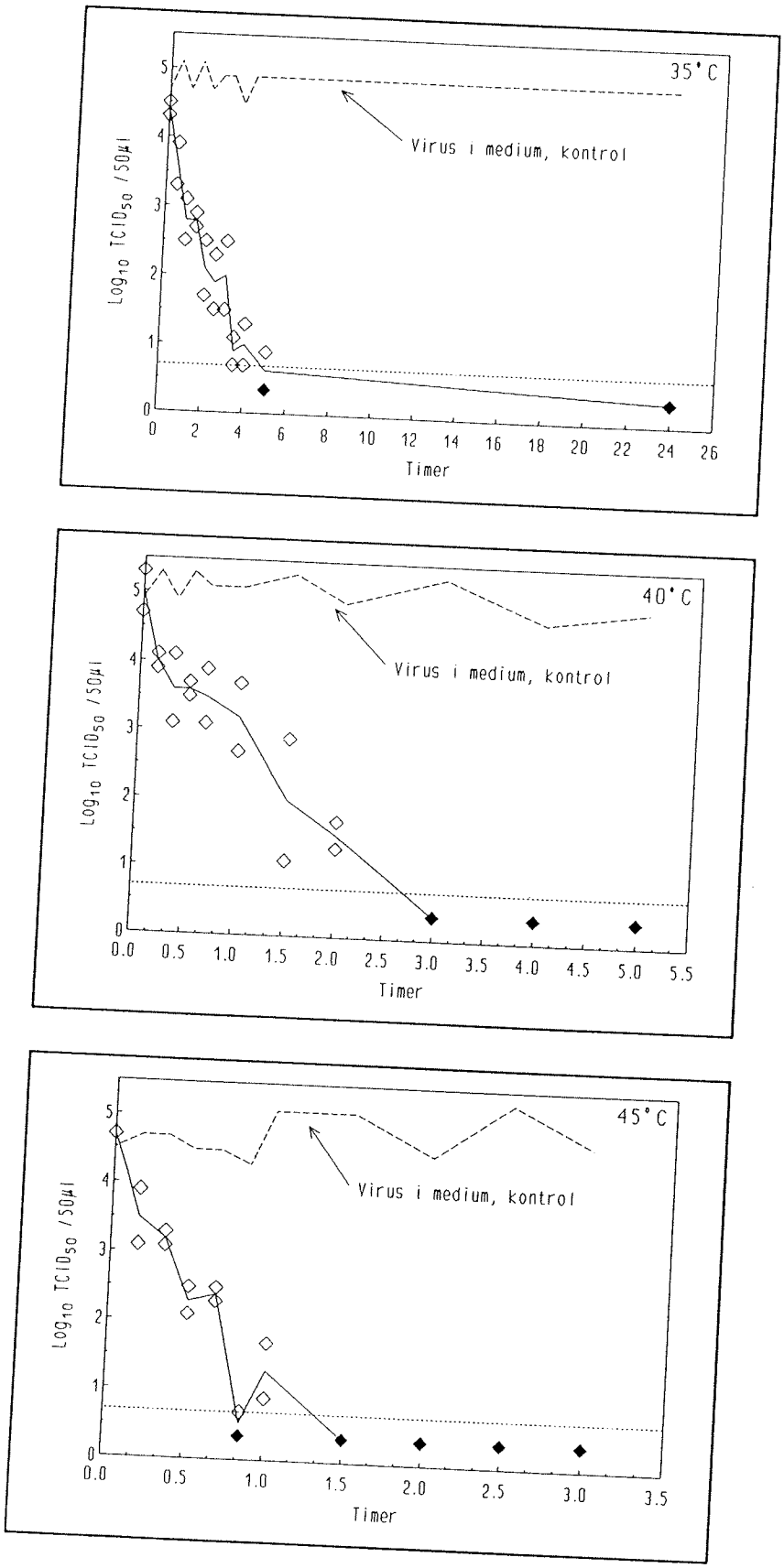
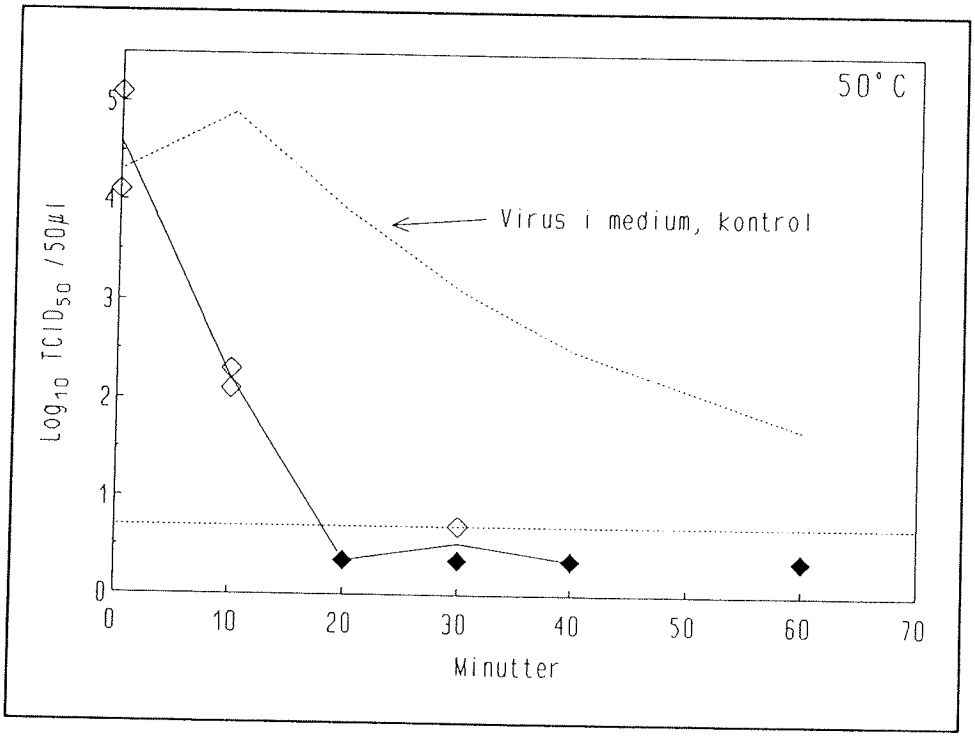


Fig.11. Inaktiveringsforløbet for IBR-virus i kvæggylle ved mesofil anaerob udrådning.
◇Virus påvist i gyllen. ····· Detektionsgrænse.
◆Virus ikke påvist i gyllen.



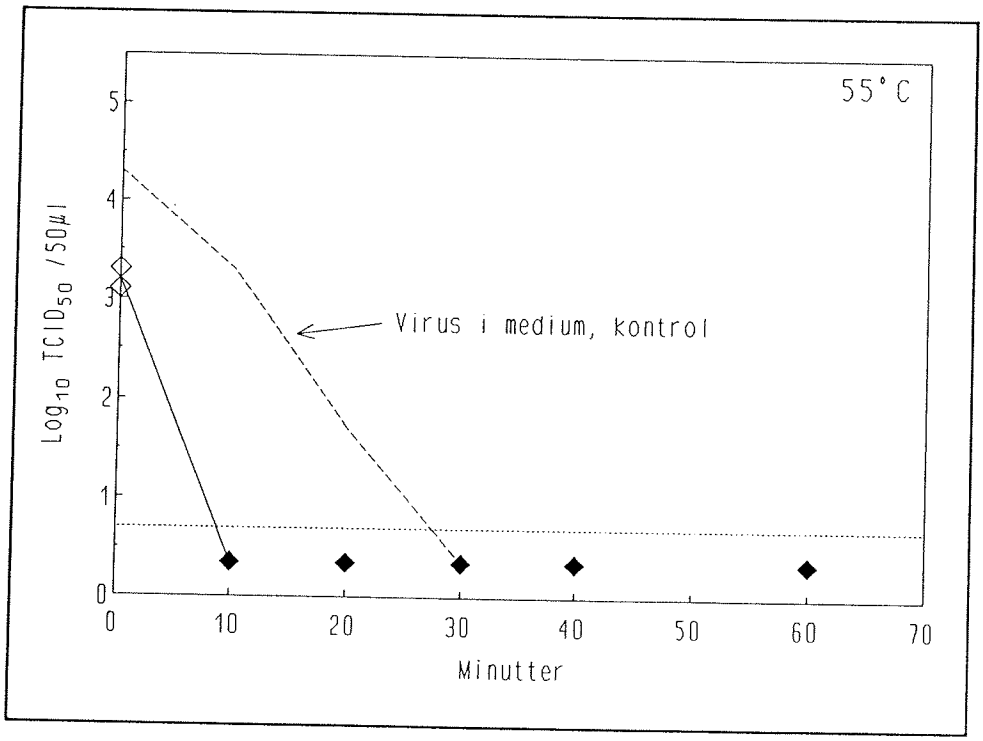
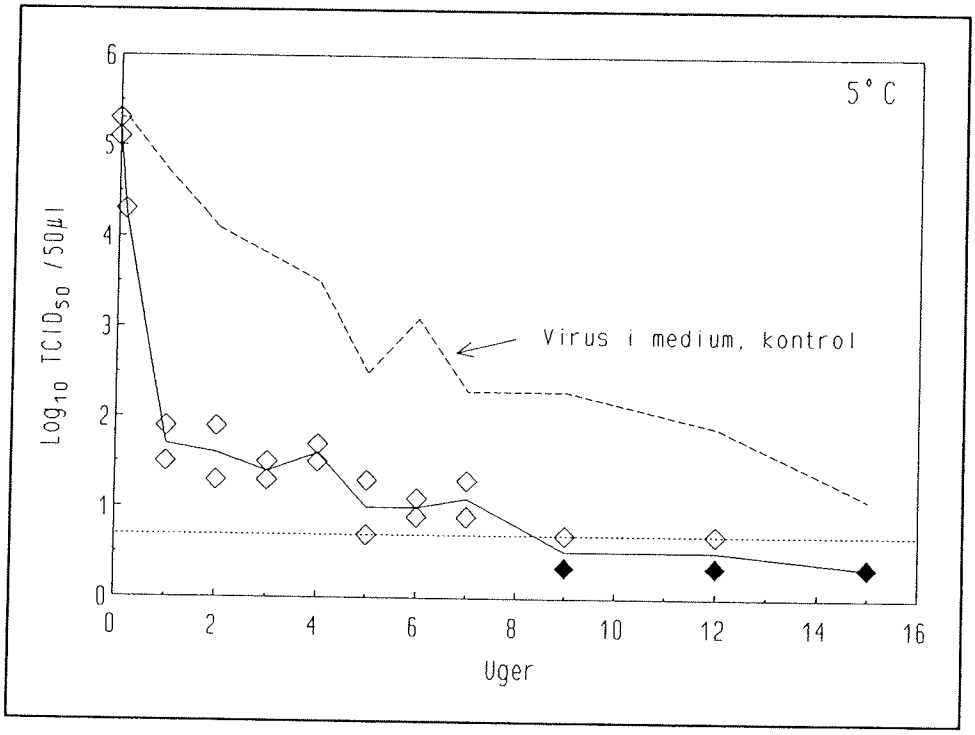


Fig.12. Inaktiveringsforløbet for IBR-virus i kvæggylle ved termofil anaerob udrådning.
◇Virus påvist i gyllen. ····· Detektionsgrænse. ◆Virus ikke påvist i gyllen.



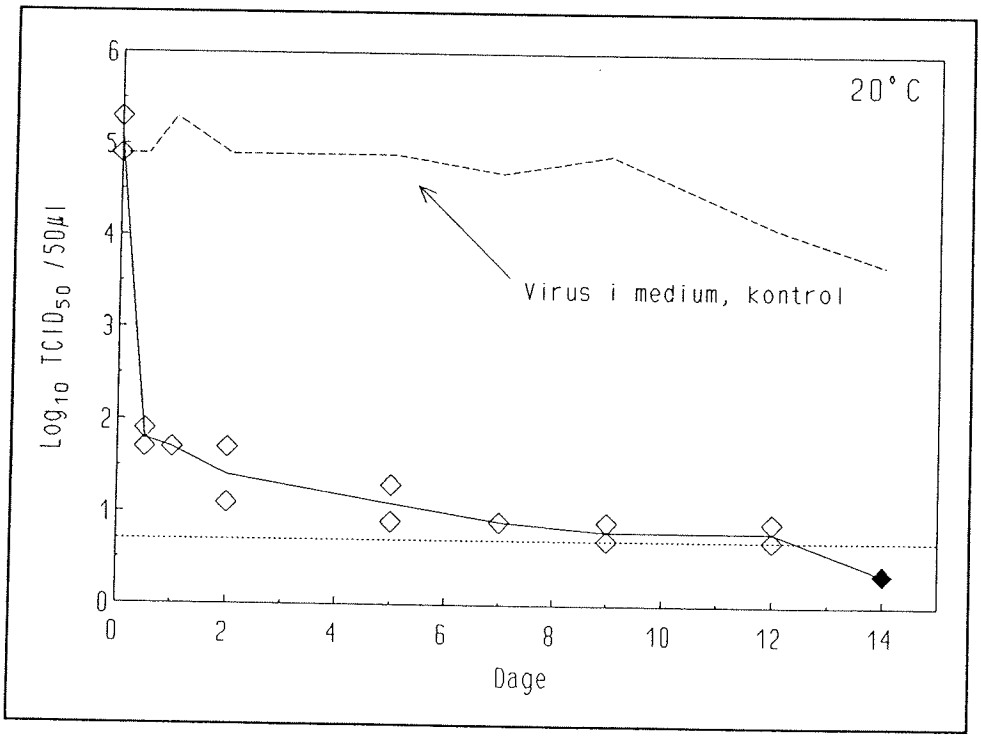


Fig.13. Inaktiveringsforløbet for Aujeszky-virus i svinegylle ved traditionel opbevaring i gylletank ved henholdsvis vinter- og sommertemperatur.

◇Virus påvist i gyllen. ◆ Virus ikke påvist i gyllen. ····· Detektionsgrænse.

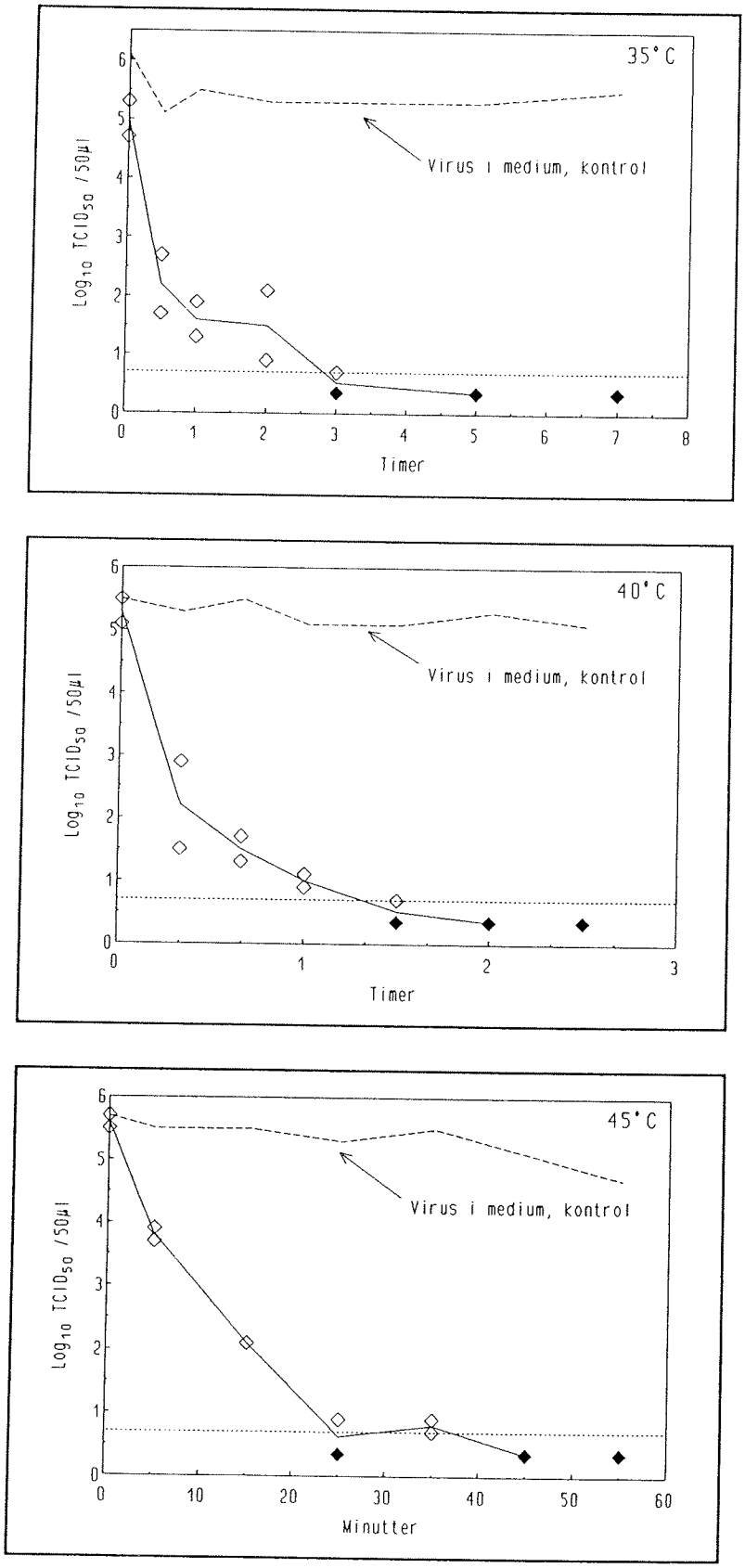
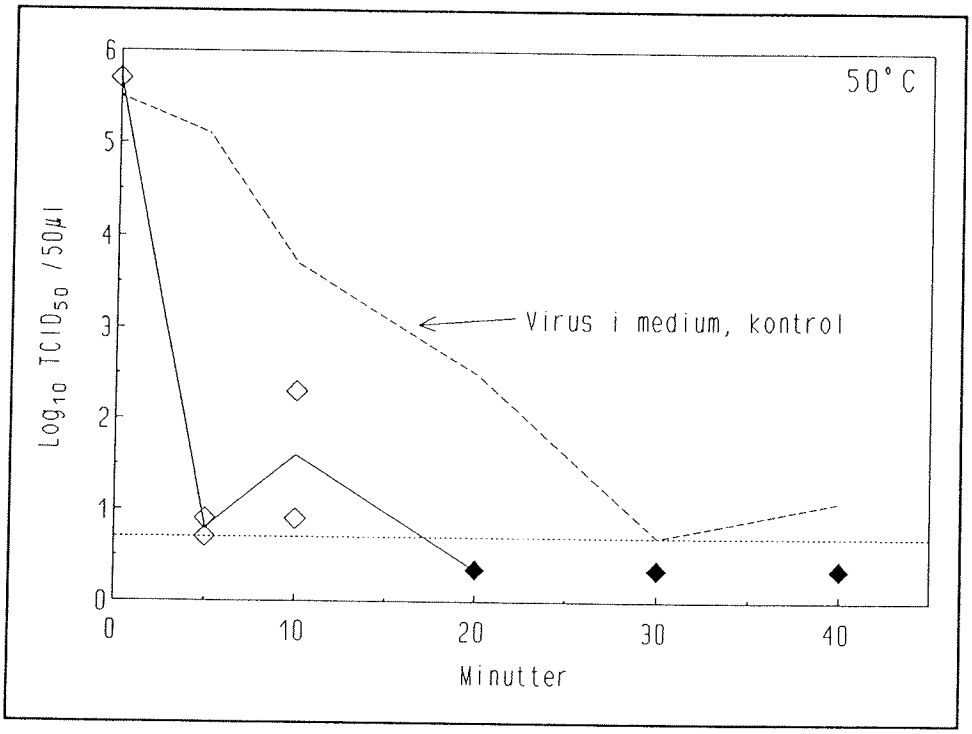


Fig.14. Inaktiveringsforløbet for Aujeszky virus i svinegylle ved mesofil anaerob udrådning.
◇ Virus påvist i gyllen. ····· Detektionsgrænse. ◆ Virus ikke påvist i gyllen.



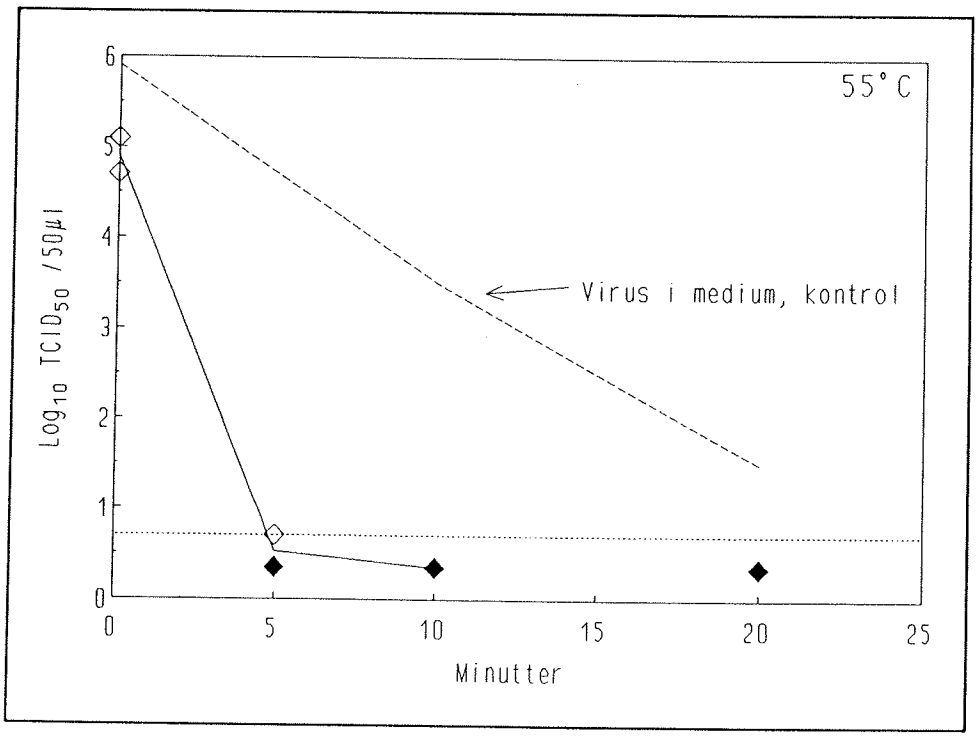


Fig.15. Inaktiveringsforløbet for Aujeszky-virus i svinegylle ved termofil anaerob udrådning. ····· Detektionsgrænse.
◇ Virus påvist i gyllen. ◆ Virus ikke påvist i gyllen.

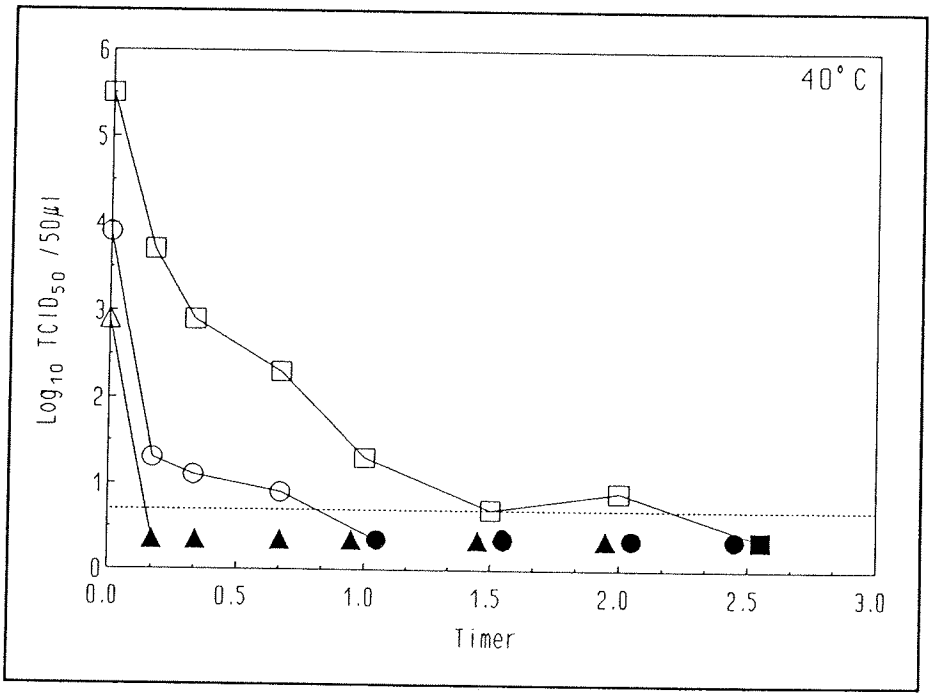


Fig.16. Inaktiveringsforløbet for Aujeszky-virus i svinegylle ved anvendelse af forskellige initial koncentrationer af virus i gyllen. Virus fortyndet 1:20 (□——□), 1:200 (○——○) og 1:2000 (△——△) i gyllen. ····· Detektionsgrænse.
Åbne symboler: Virus påvist i gyllen.
Lukkede symboler: Virus ikke påvist i gyllen.

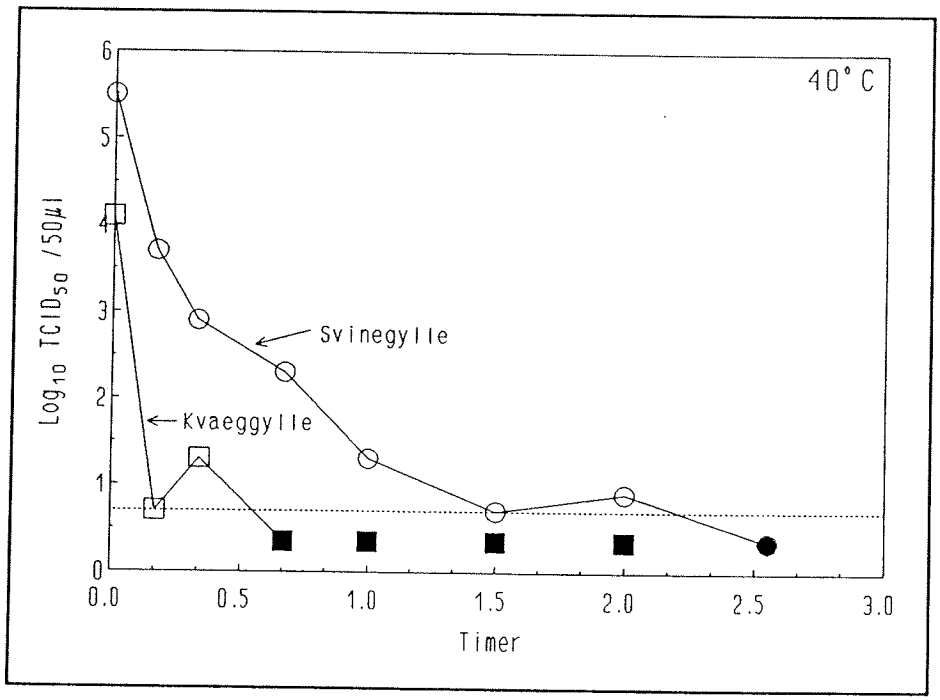
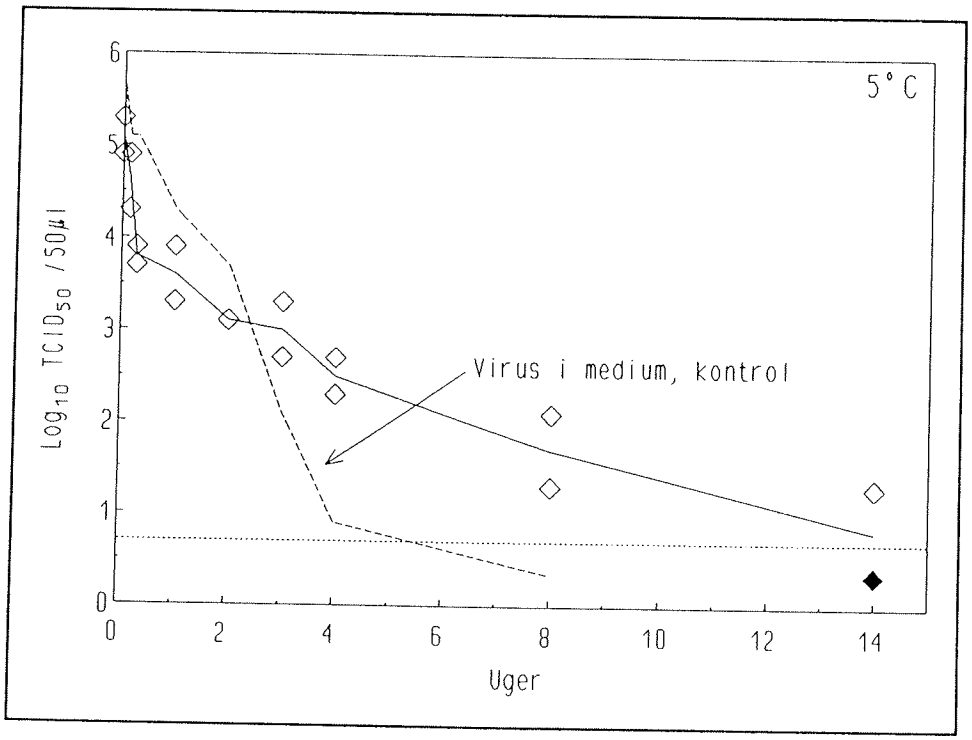


Fig.17. Inaktiveringsforløbet for Aujeszky-virus i henholdsvis kvæg- og svinegylle. ····· Detektionsgrænse.
Åbne symboler: Virus påvist i gyllen.
Lukkede symboler: Virus ikke påvist i gyllen.



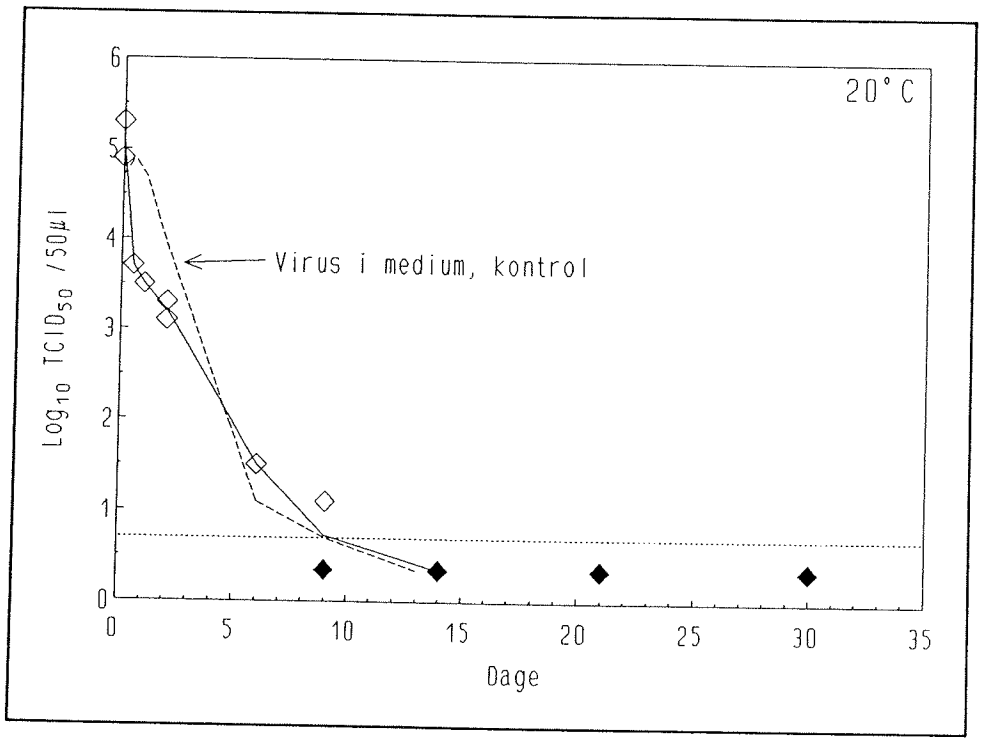


Fig.18. Inaktiveringsforløbet for mund- og klovesyge-virus i svinegylle ved traditionel opbevaring i gylletank ved henholdsvis vinter- og sommertemperatur.

◇Virus påvist i gyllen. ◆ Virus ikke påvist i gyllen. ····· Detektionsgrænse.

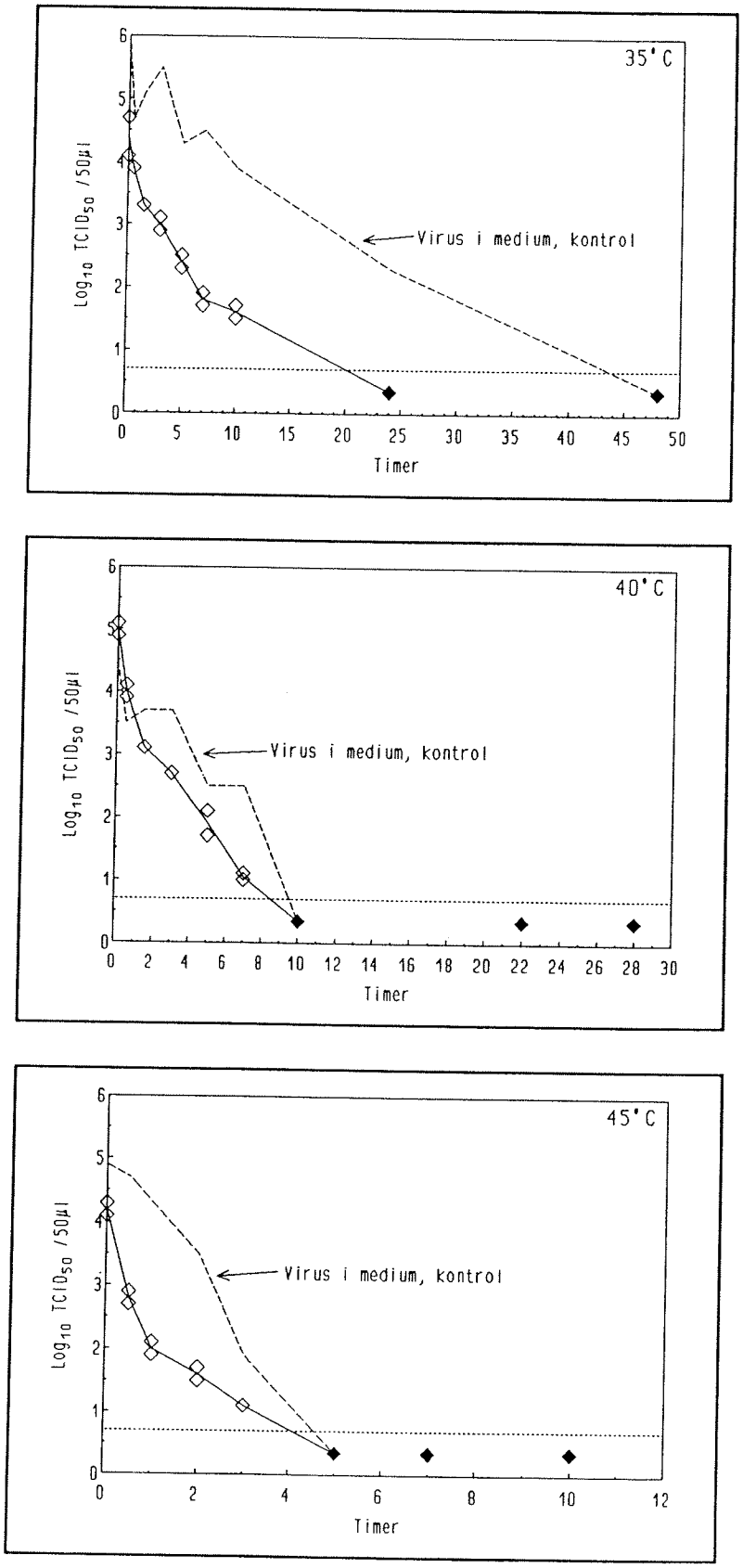
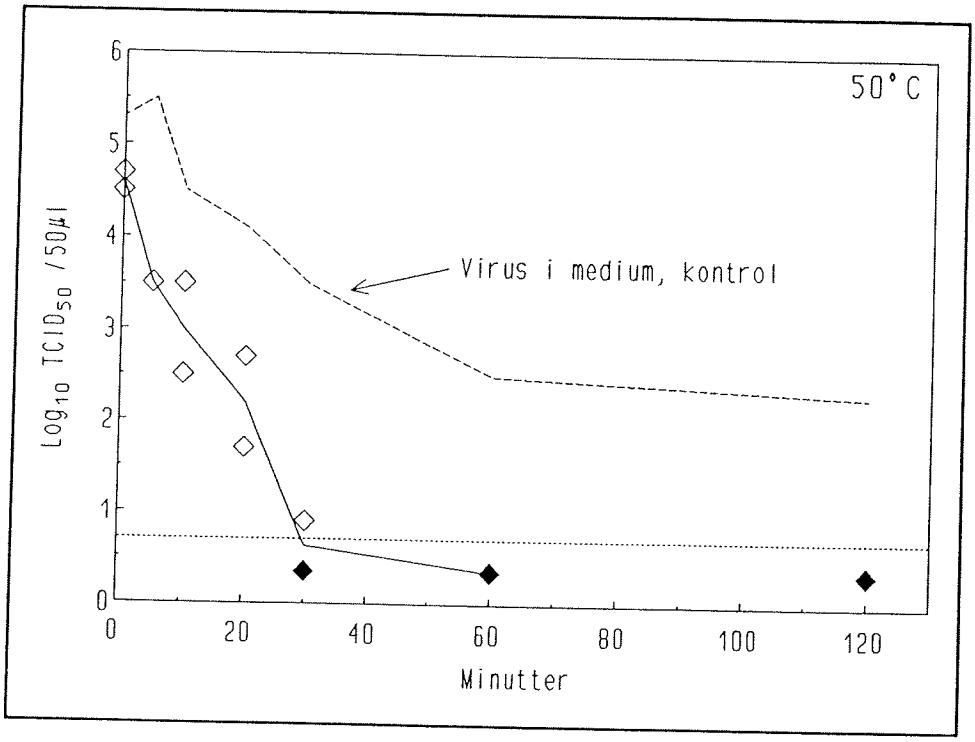


Fig.19. Inaktiveringsforløbet for mund- og klovesyge-virus i svinegylle ved mesofil anaerob udrådning. ····· Detektionsgrænse.
◇ Virus påvist i gyllen. ◆ Virus ikke påvist i gyllen.



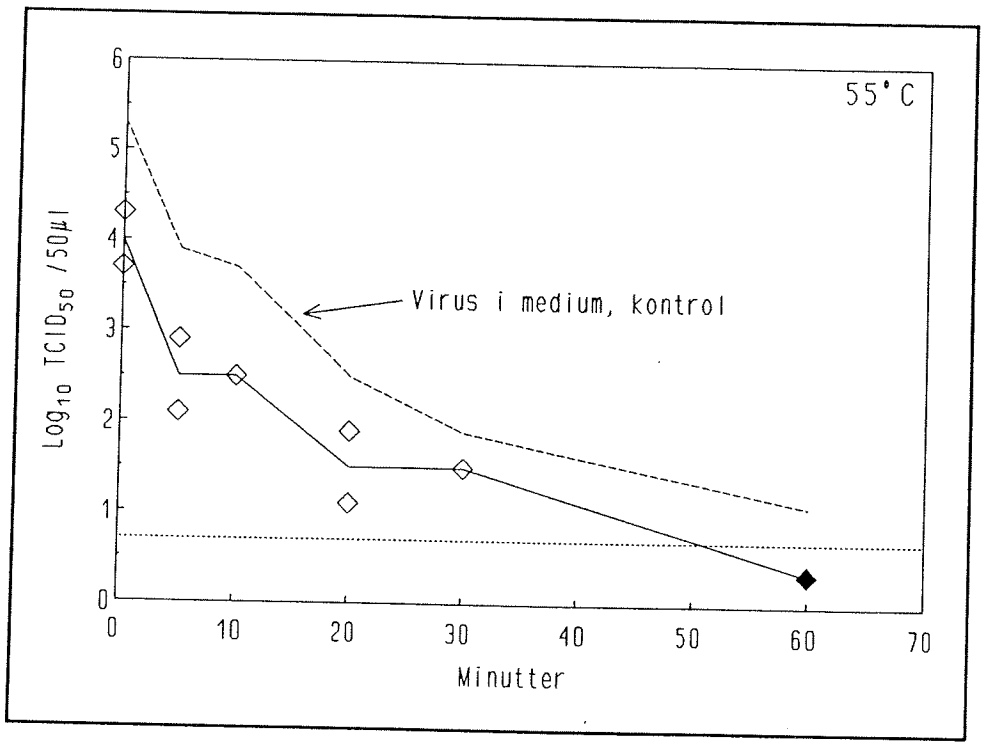
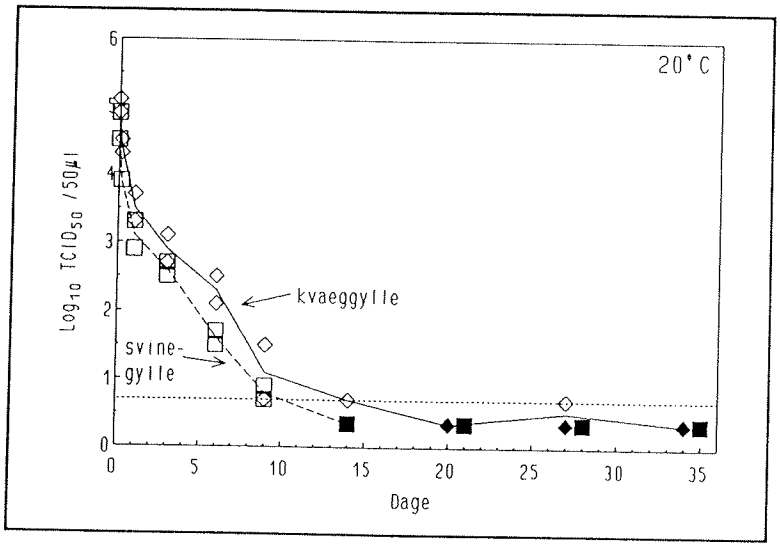
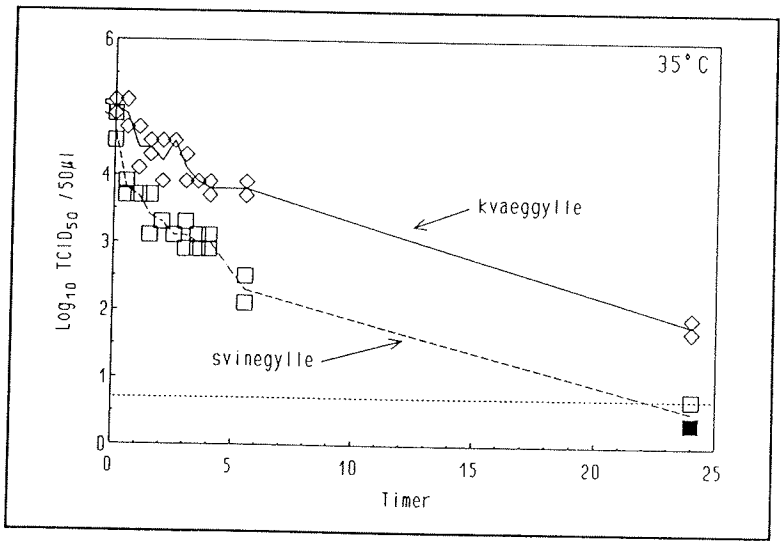


Fig.20. Inaktiveringsforløbet for mund- og klovesyge-virus i svinegylle ved termofil anaerob udrådning. ····· Detektionsgrænse.
◇ Virus påvist i gyllen. ◆ Virus ikke påvist i gyllen.





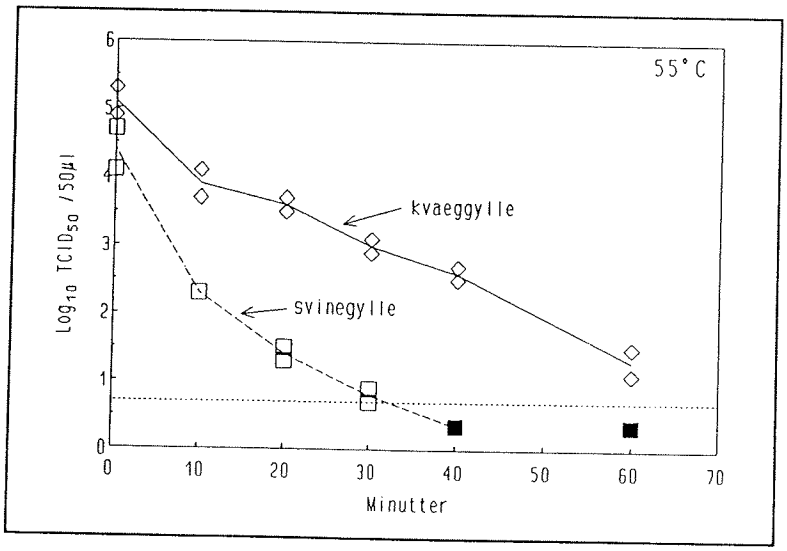
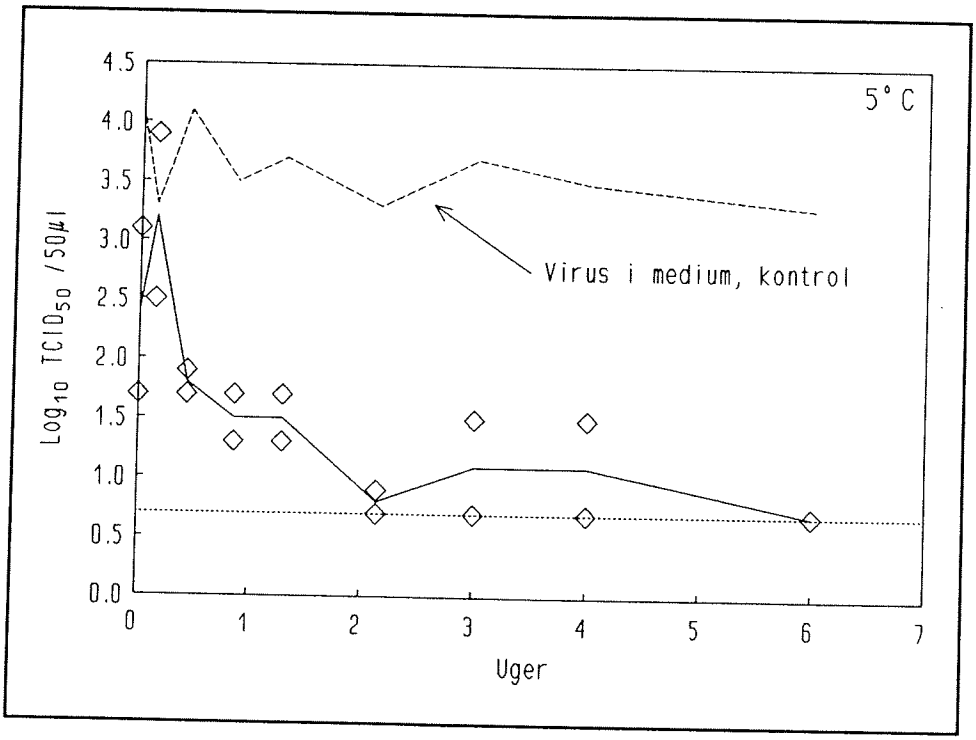


Fig.21. Sammenligning af inaktiveringsforløbet for mund- og klovesyge-virus i henholdsvis kvæg- og svinegylle ved anaerob opbevaring/udrådning. Lukkede symboler: Virus ikke påvist i gylle Åbne symboler: Virus påvist i gylle. ····· Detektionsgrænse.



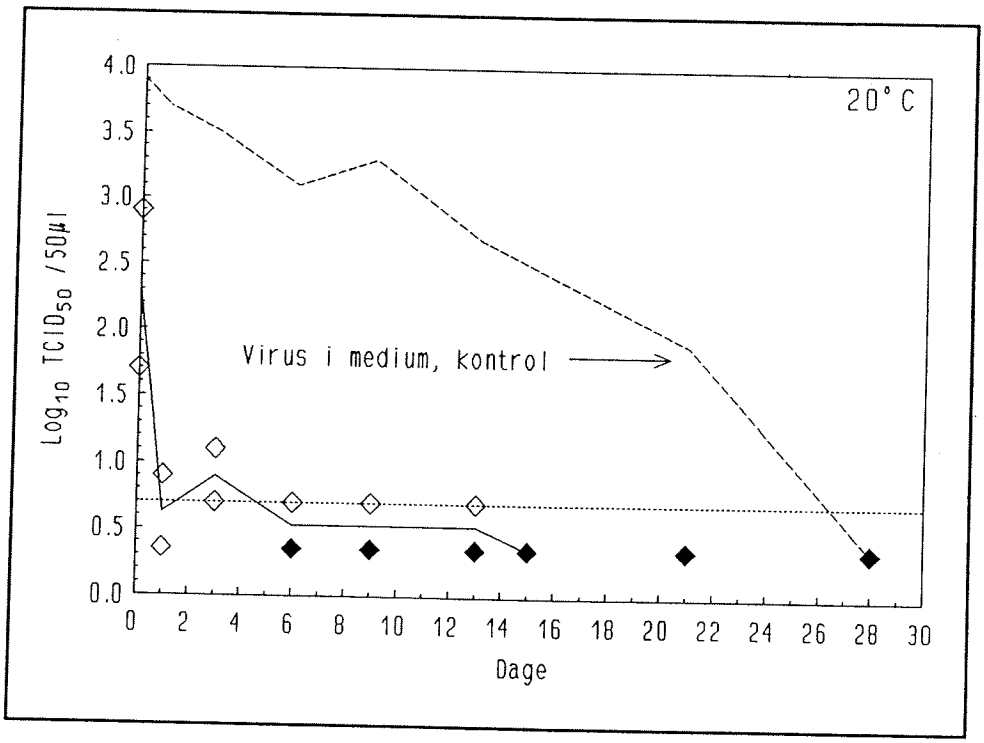
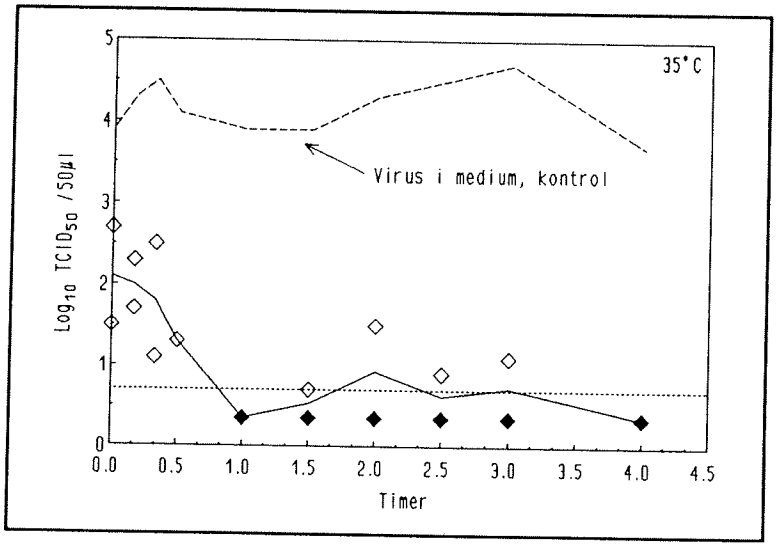
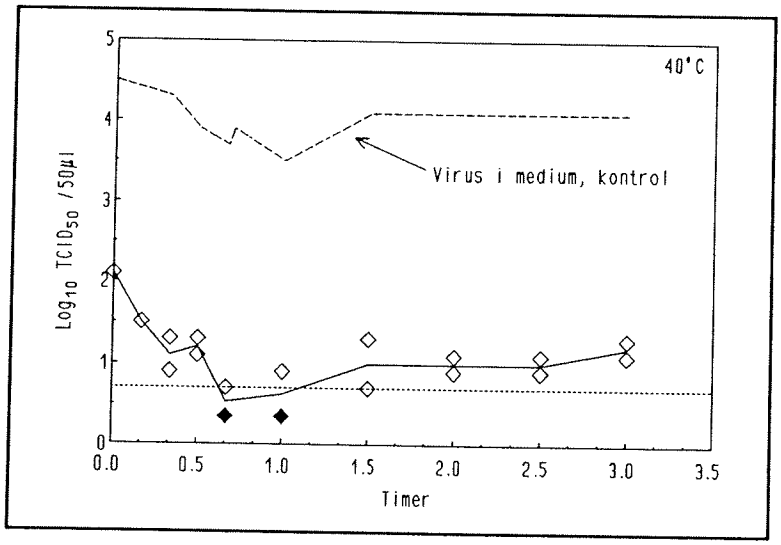


Fig.22. Inaktiveringsforløbet for svinepest-virus i svinegylle ved traditionel opbevaring i gylletank ved henholdsvis vinter- og sommertemperatur.

◇ Virus påvist i gyllen. ◆ Virus ikke påvist i gyllen. ····· Detektionsgrænse.





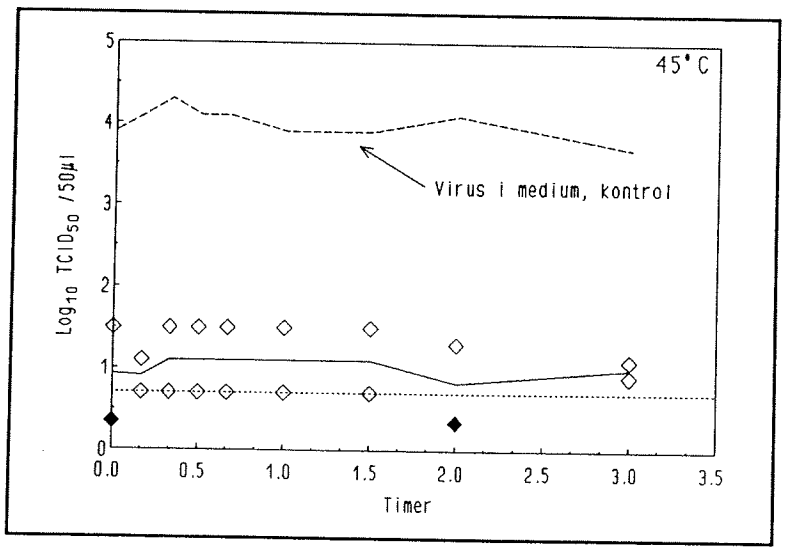
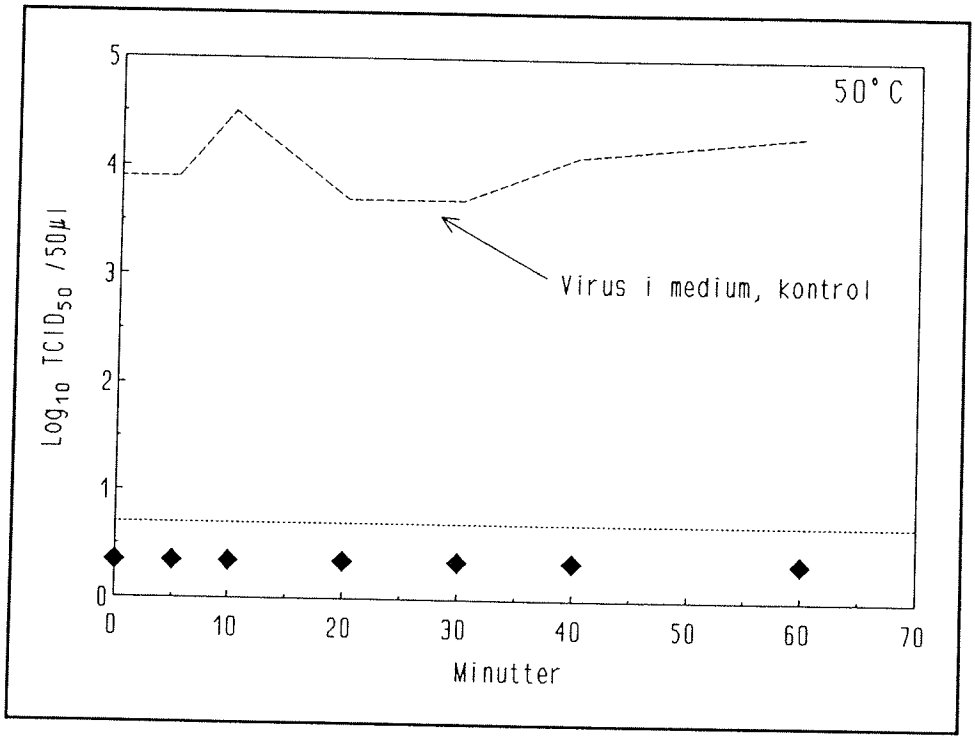


Fig.23. Inaktiveringsforløbet for svinepest-virus i svinegylle ved mesofil anaerob udrådning.
◇ Virus påvist i gyllen. ◆ Virus ikke påvist i gyllen. ····· Detektionsgrænse.



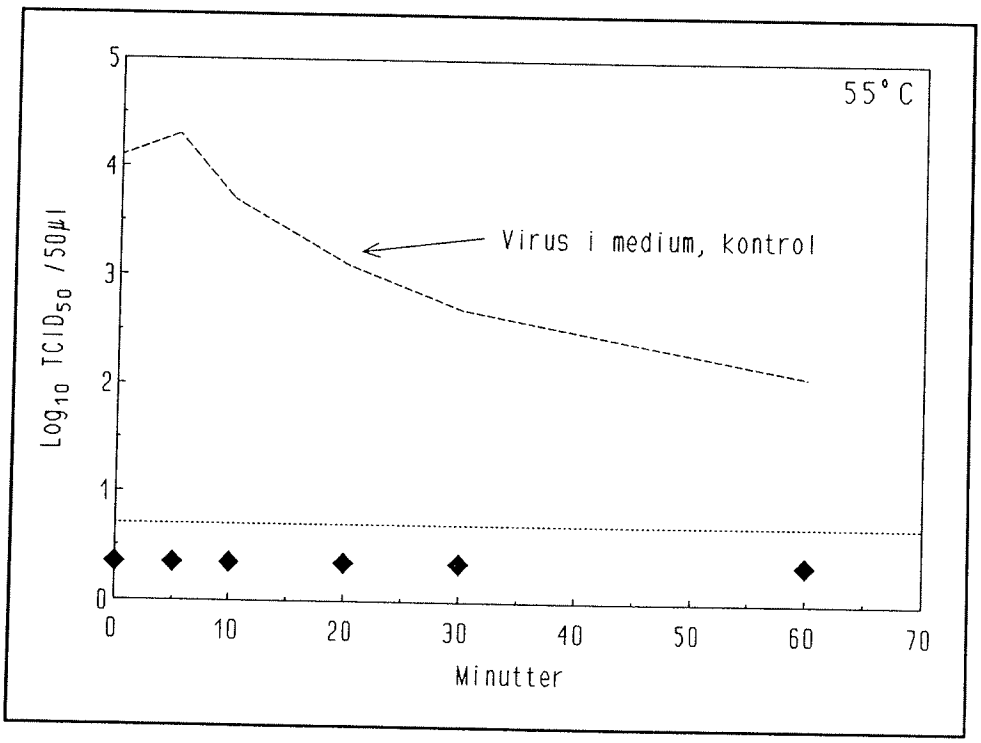
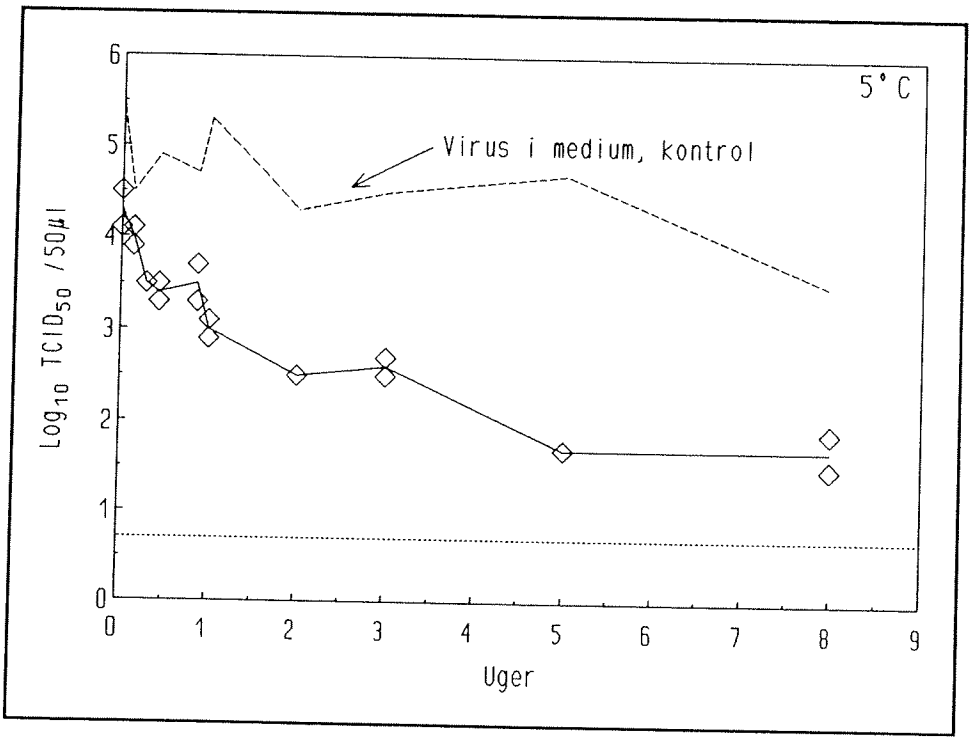


Fig.24. Inaktiveringsforløbet for svinepest-virus i svinegylle ved termofil anaerob udrådning.
◇ Virus påvist i gyllen. ····· Detektionsgrænse. ◆ Virus ikke påvist i gyllen.



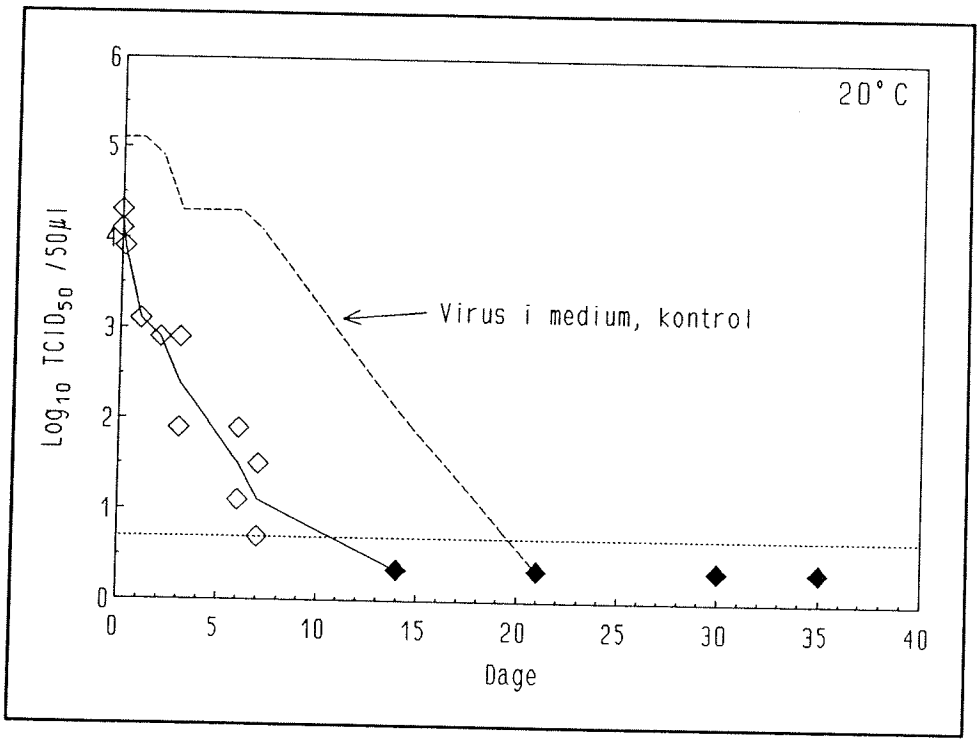
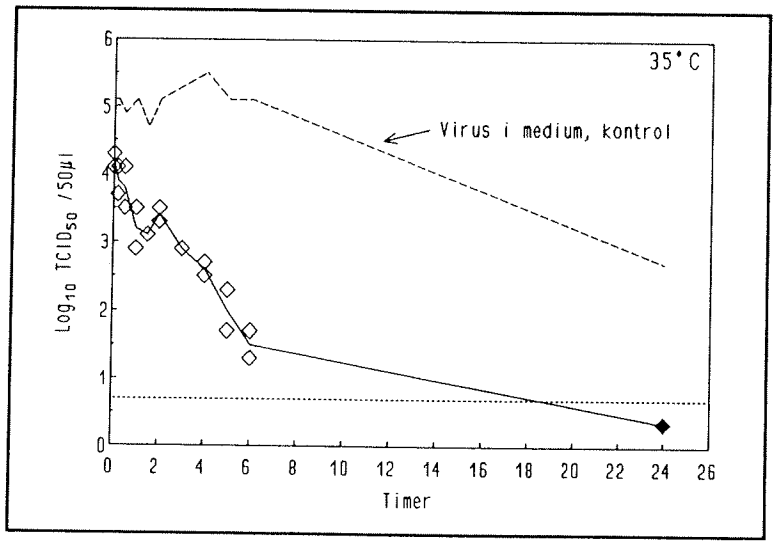
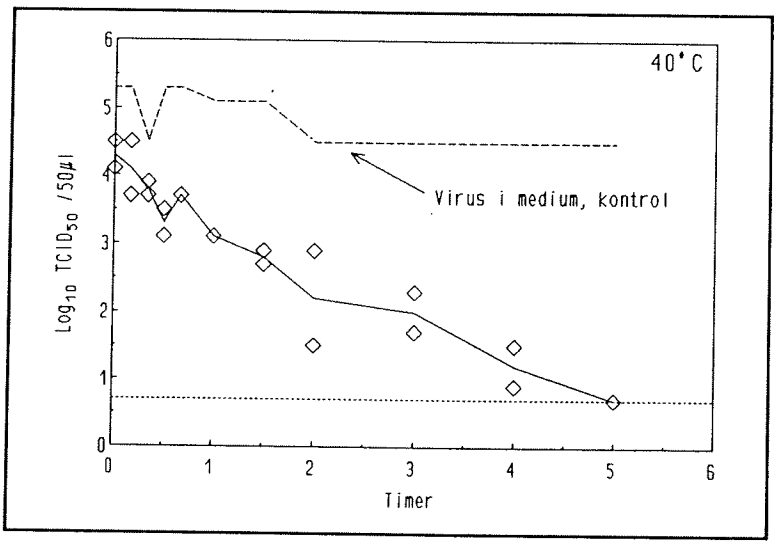


Fig.25. Inaktiveringsforløbet for TGE-virus i svinegylle ved traditionel opbevaring i gylletank ved henholdsvis vinter- og sommertemperatur.

◇ Virus påvist i gyllen. ····· Detektionsgrænse. ◆ Virus ikke påvist i gyllen.





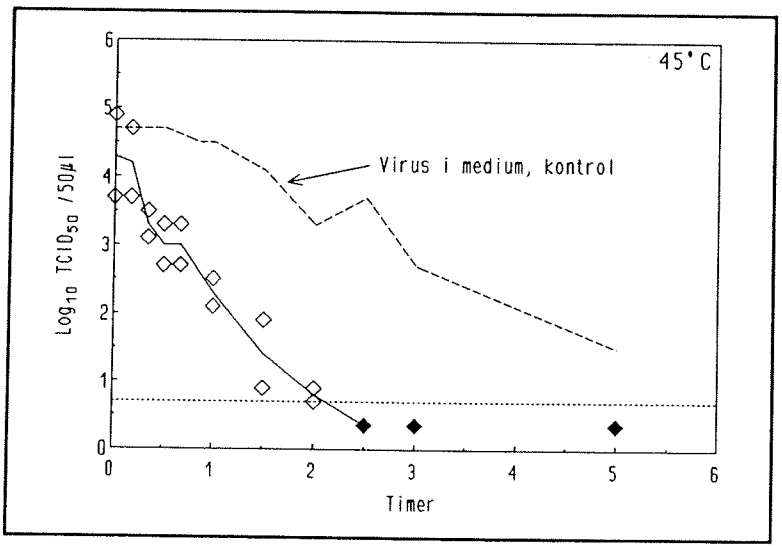
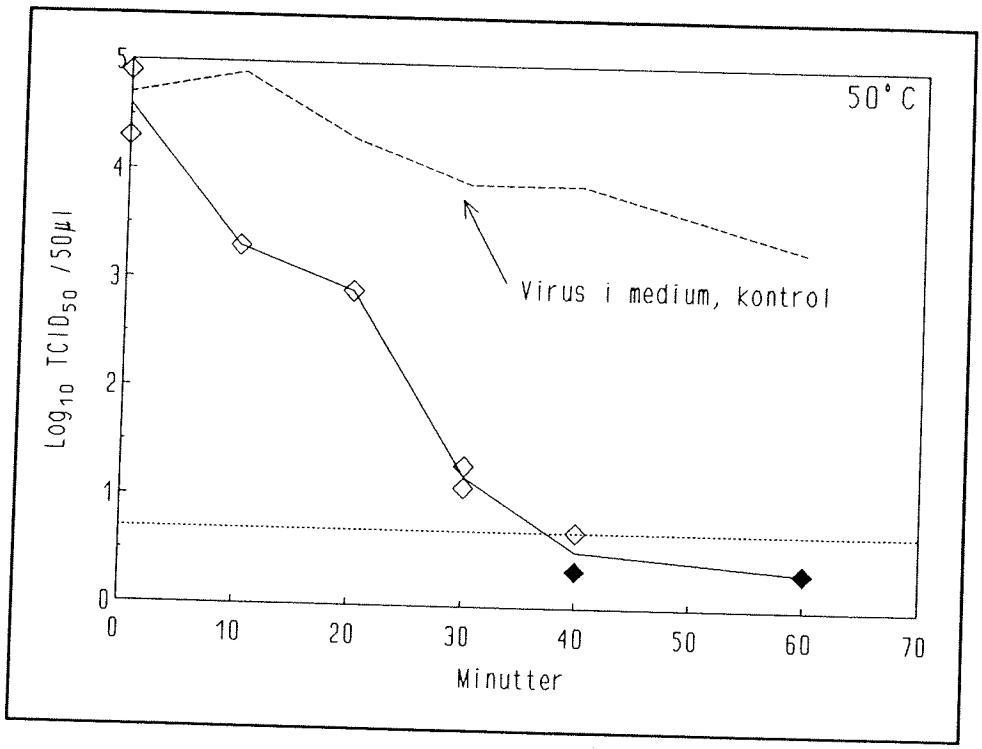


Fig.26. Inaktiveringsforløbet for TGE-virus i svinegylle ved mesofil anaerob udrådning.
◇Virus påvist i gyllen. ····· Detektionsgrænse. ◆Virus ikke påvist i gyllen.



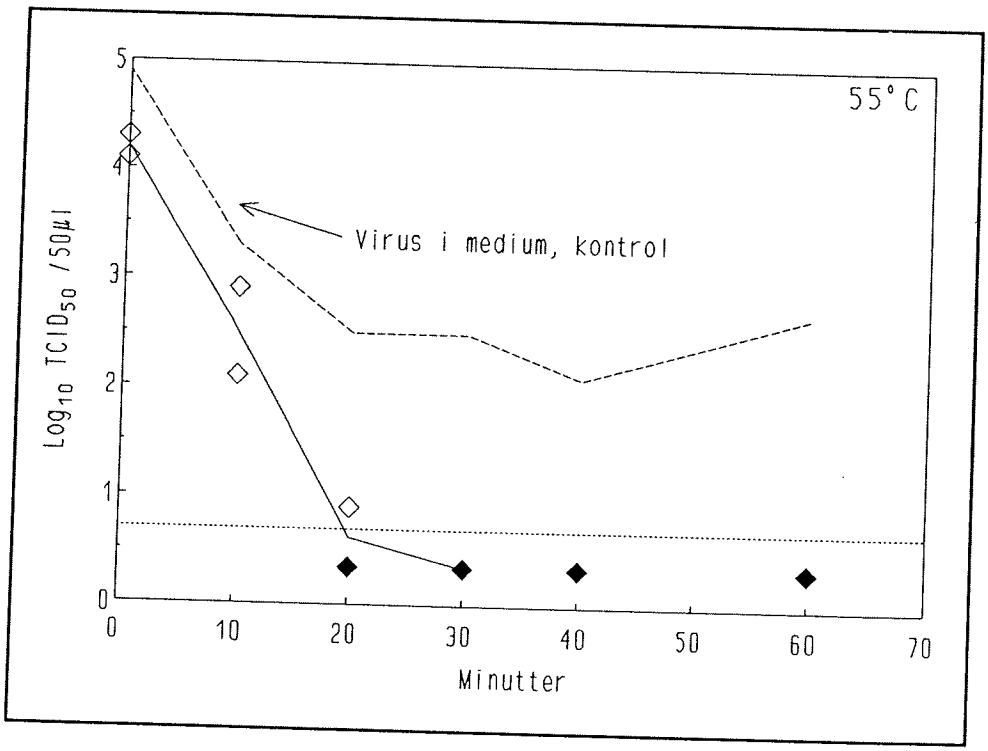
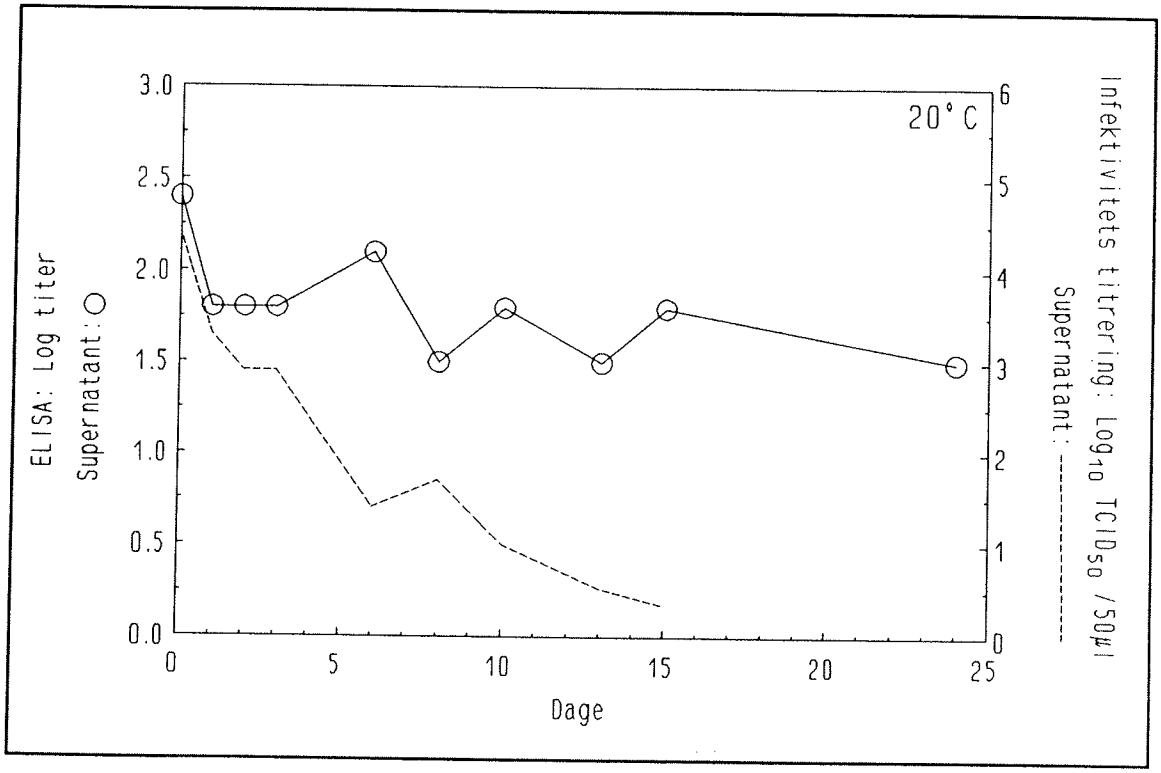


Fig.27. Inaktiveringsforløbet for TGE-virus i svinegylle ved termofil anaerob udrådning.
◇ Virus påvist i gyllen. ····· Detektionsgrænse. ◆ Virus ikke påvist i gyllen.



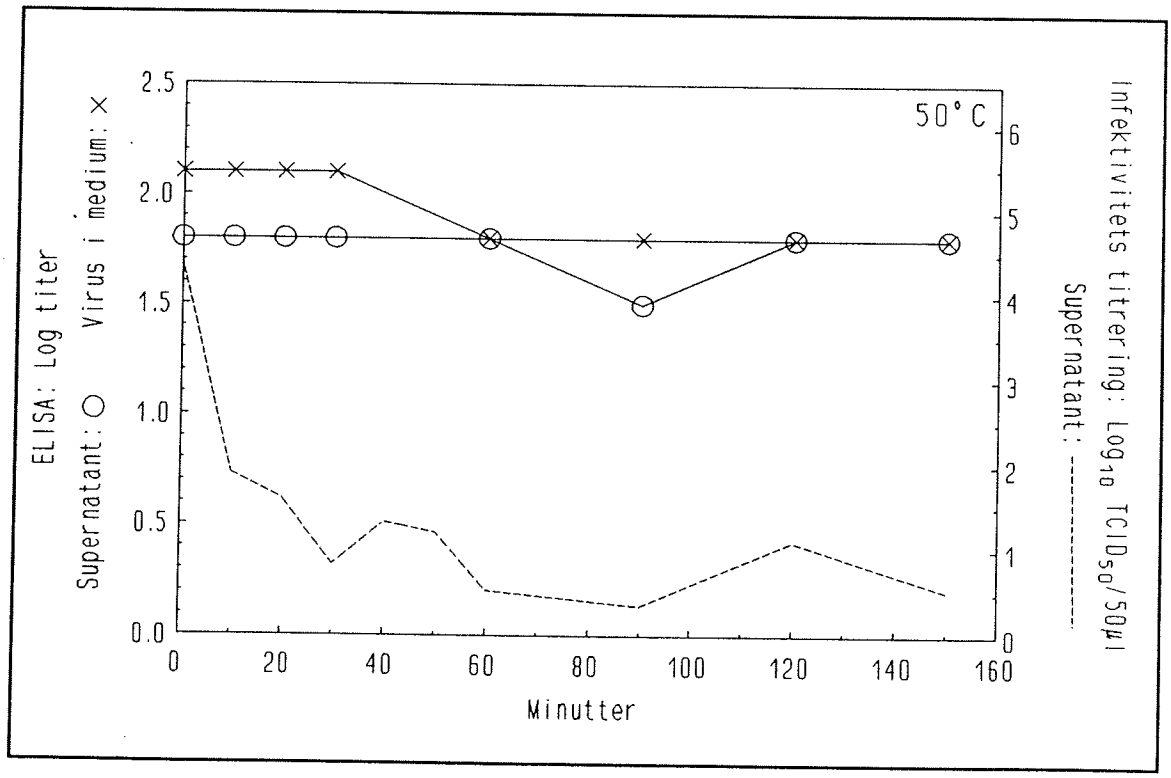
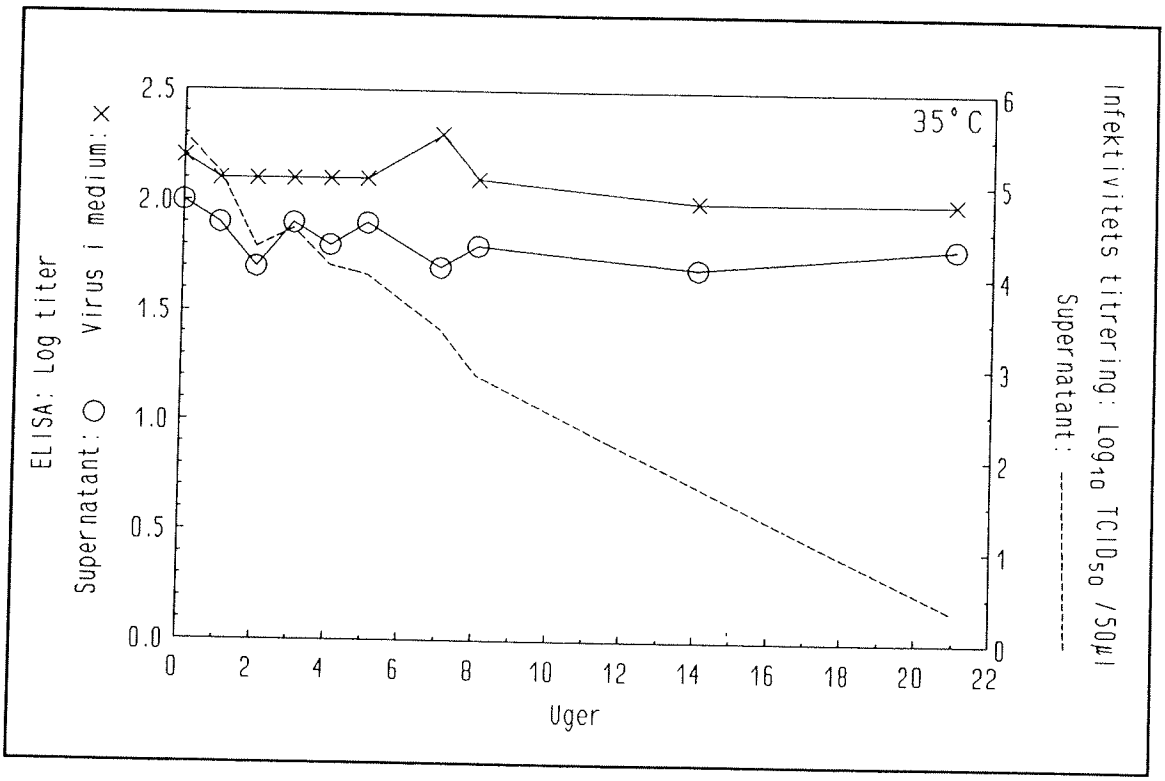


Fig.28. Bestemmelse af SI-virus antigen mængden i svinegylle (supernatant) og i "Virus i medium", kontrol ved anvendelse af ELISA. "Virus i medium", kontrol kun undersøgt ved 50°C. Inaktiveringsforløbet for SI-virus i svinegylle (supernatant).



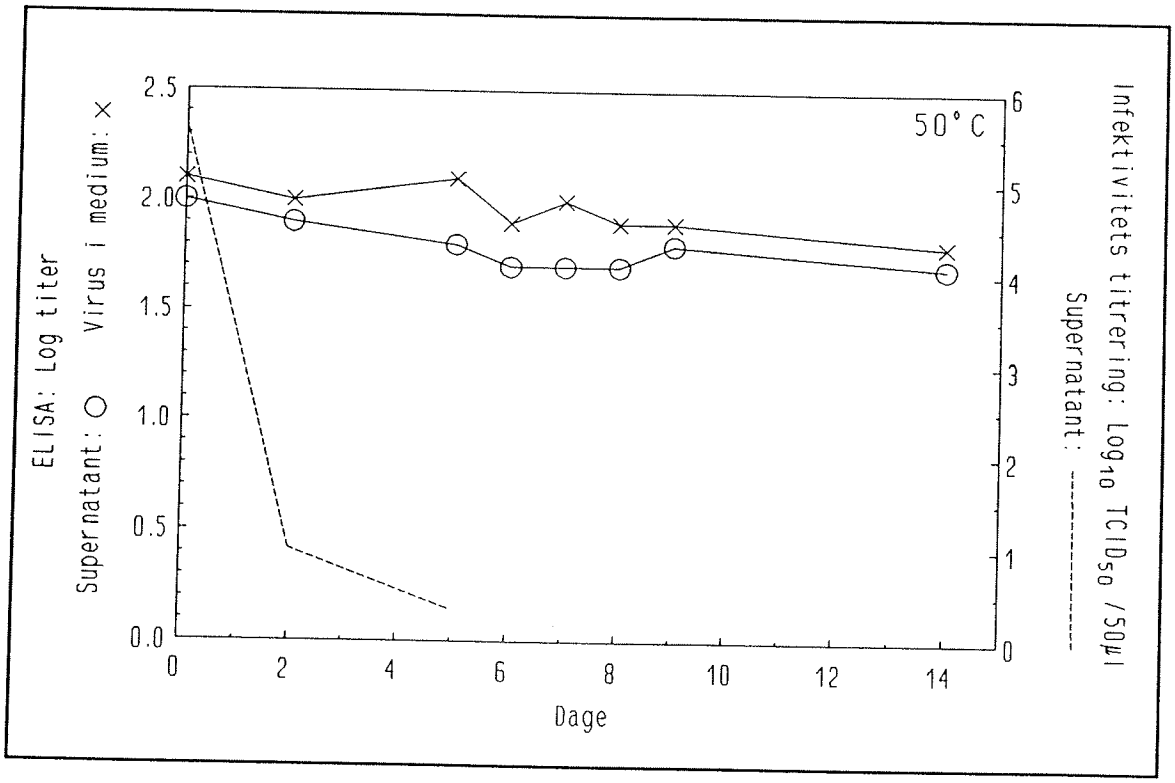


Fig.29. Bestemmelse af PPV antigen mængden i svinegylle (supernatant) og i "Virus i medium", kontrol ved anvendelse af ELISA.
Inaktiveringsforløbet for PPV i svinegylle (supernatant).

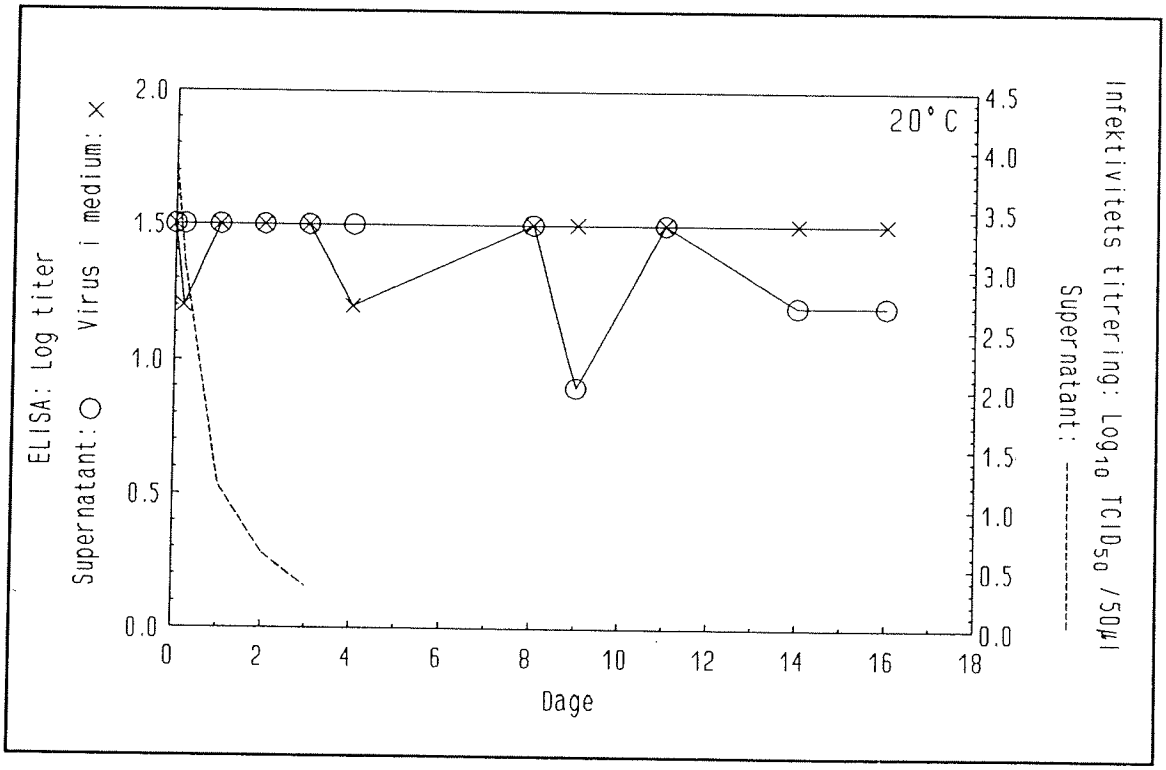
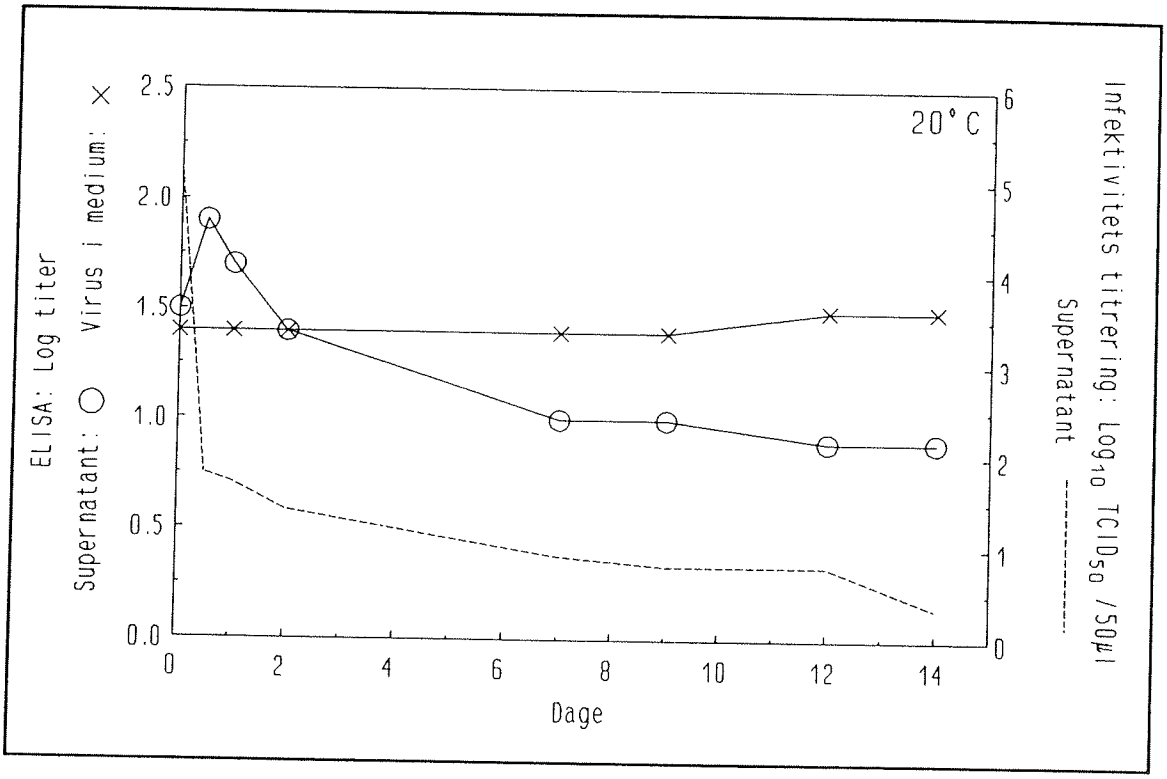


Fig.30. Bestemmelse af BVD-virus antigen mængden i kvægegylle (supernatant) og i "Virus i medium", kontrol ved anvendelse af ELISA.
Inaktiveringsforløbet for BVD-virus i kvæggylle (supernatant).



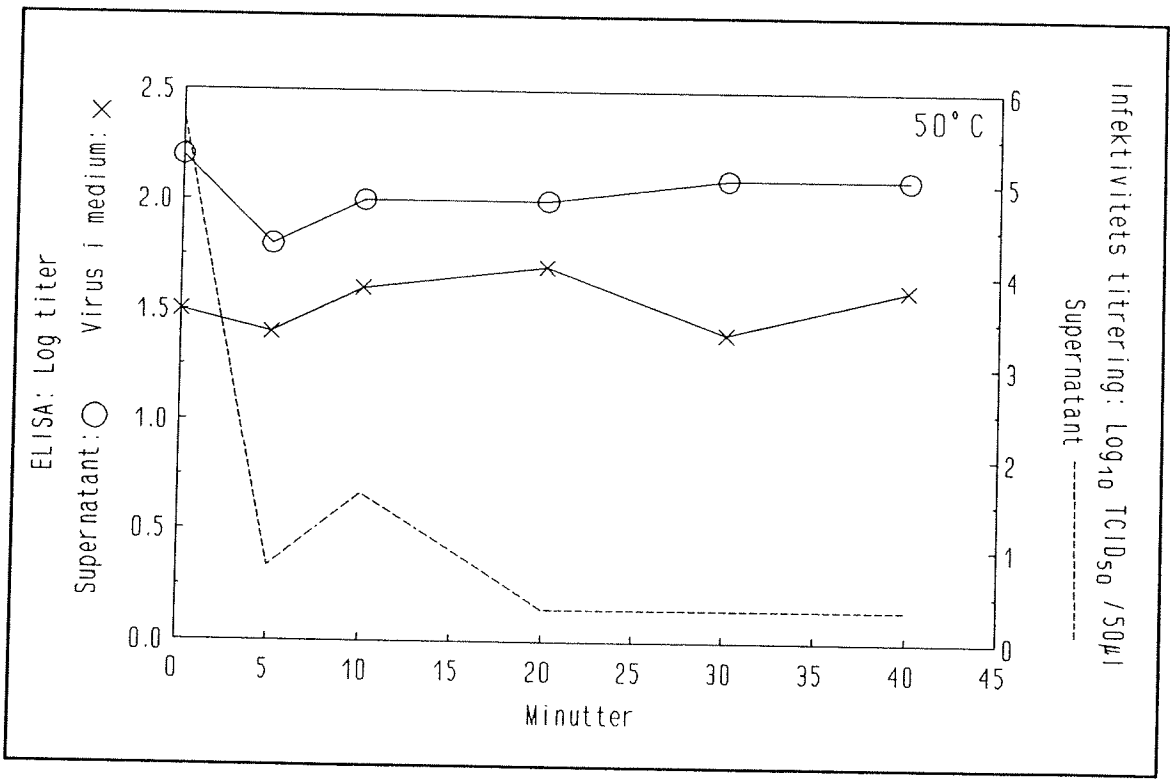
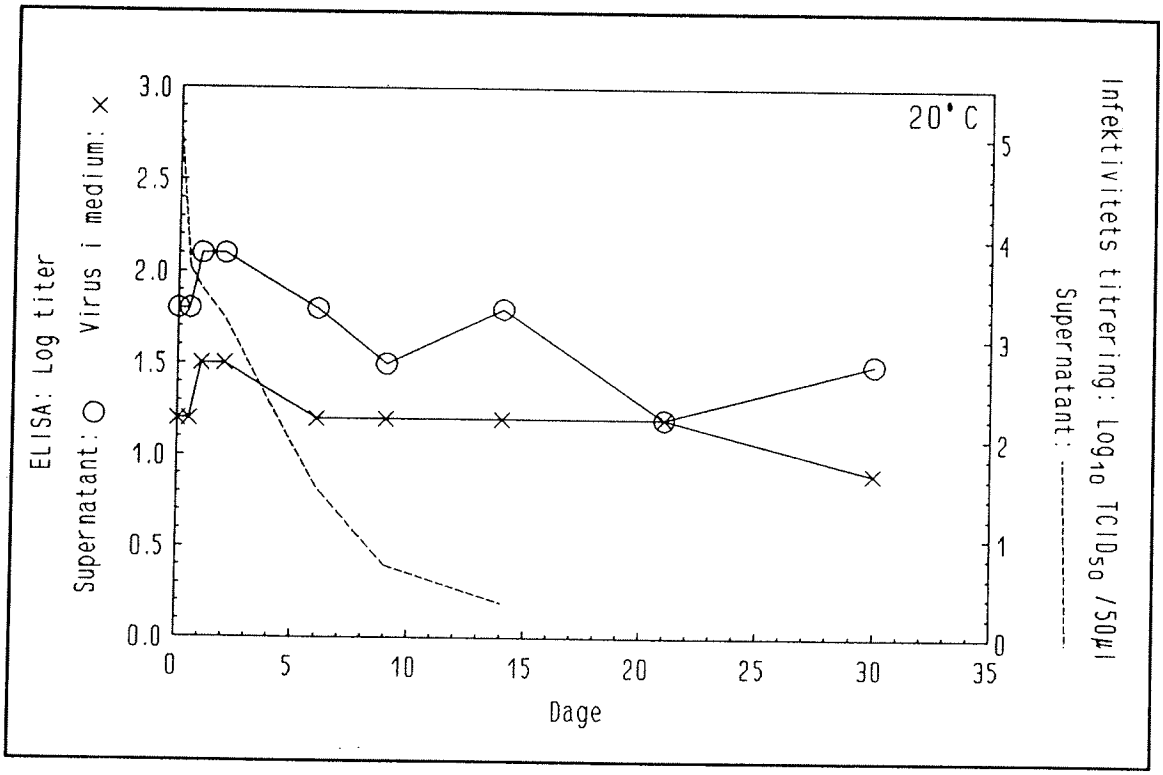


Fig.31. Bestemmelse af Auj.virus antigen mængden i svinegylle (supernatant) og i "Virus i medium", kontrol ved anvendelse af ELISA.
Inaktiveringsforløbet for Auj.virus i svinegylle (supernatant).



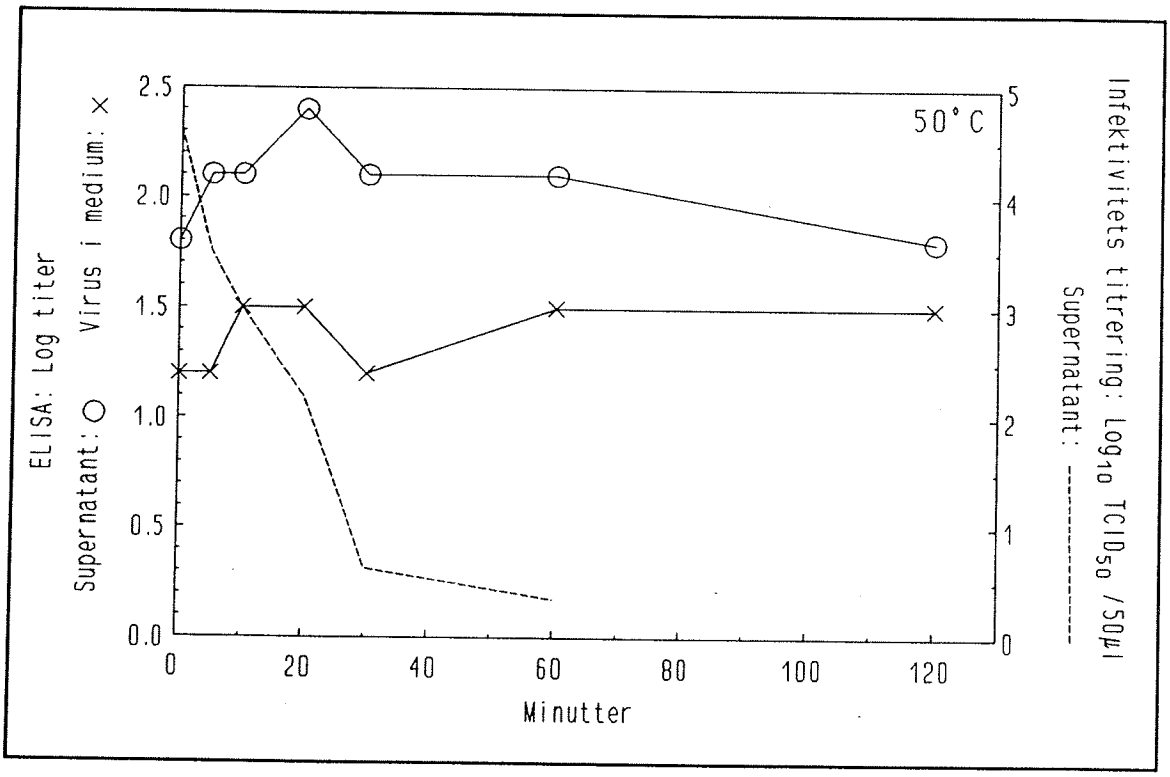


Fig.32. Bestemmelse af MKS-virus antigen mængden i svinegylle (supernatant) og i "Virus i medium", kontrol ved anvendelse af ELISA.
Inaktiveringsforløbet for MKS-virus i svinegylle (supernatant).

ORDLISTE

Auj.-virus: Aujeszky-virus

BVD-virus: Bovin virusdiarre-virus

CPE: Cytopathic effect, cytopatisk forandring. Celleforandringer i cellekulturer som er synlige ved direkte mikroskopering.

ELISA: "Enzyme-linked immunosorbent assay" Enzymfarvningsteknik til påvisning af virusantigen i både infektivt og inaktiveret virus. Metoden anvendes også til påvisning af antistoffer.

IBR-virus: Infektiøs bovin rhinotracheitis-virus

ID_{50}: Infektionsdosis på 50% grundlag

Infektionsdosis: Den mindste mængde infektiøst materiale, som er i stand til at fremkalde en karakteristisk forandring i et biologisk materiale. For at komme frem til en infektionsdosis, må man fremstille en fortyndingsrække af det infektiøse materiale (virussuspensionen) og pode et antal enheder (dyr, æg eller cellekulturer) med et bestemt rumfang af hver fortynding. Af hensyn til bedst mulig reproducerbarhed arbejder man i reglen på grundlag af 50% værdier, altså den mængde der giver forandring i 50% af det podede materiale. En infektionsdosis er altså en praktisk måleenhed, der afhænger både af virus og påvisningsmetode.

Sidste side