

Rapport nr. 4502/107

**HYGIENISERENDE EFFEKT AV GELLYFEED-
PROSESSEN.
BRUK AV MARINT AVSKJÆR I FISKEFÔR**

RAPPORTTITTEL

Hygieniserende effekt av gellyfeed-prosessen. Bruk av marint avskjær til fiskefôr.

RAPPORTNUMMER	4502/107	PROSJEKTNUMMER	4502
UTGIVER	RUBIN	DATO	mars 2003

UTFØRENDE INSTITUSJONER

Veterinærinstituttet, Trondheim

Tungasletta 2
7485 Trondheim

Kontaktperson: Asbjørn Husby (asbjorn.husby@vetinst.no)

SAMMENDRAG OG KONKLUSJONER

I en analyse foretatt av Veterinærinstituttet i 2000 om bruk av avskjær fra villfanget fisk som fôr til oppdrettsfisk, ble det konkludert med at RUBIN-fôret utgjorde en risiko for overføring av flere smittestoffer (bakterier, virus, parasitter). Når det gjaldt Gellyfeed, som er en videreutvikling av RUBIN-fôret og som har en hygienisering i form av pH-økning/reduksjon, ble dette konseptet vurdert å utgjøre en langt mindre risiko uten at man kunne fastslå eksakte grenser for pH (RUBIN-rapport 4701/94). Ut fra dette så man behov for å undersøke overlevelse av smittefarlige organismer i Gellyfeed-prosessen nærmere.

Fra Dyrehelsetilsynets side ble det fokusert på smittestoffer som kan gi alvorlig sykdom på oppdrettsfisk, og RUBIN igangsatte i 2001 et prosjekt for å få dokumentert overlevelse av 4 typer virus (VHS, ILA, IPN og VNN), samt én fiskepatogen bakterie (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*) ved tilsetning av lut til ulike pH-nivåer. I tillegg ønsket man å dokumentere hygieniserende effekt i forhold til EU's kommende regelverk for animalske biprodukter, der det stilles krav til mikrobiologisk standard mht. indikatorbakteriene *Clostridium perfringens*, *Salmonella* og *Enterobacteriaceae*. Hensikten med prosjektet var å få tilstrekkelig grunnlag for å søke om aksept for Gellyfeed-konseptet.

Konklusjonene fra forsøkene var at tilsats av lut til pH 10 førte til inaktivering av *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* og *Cl. perfringens* etter 12 timer. *Enterobacteriaceae* ble inaktivert ved pH 11 etter 12 timer. For *Salmonella* var det varierende resultater, men forsøket tyder på at lutbehandling til pH 11 i 12 timer, og god homogenisering, gir total inaktivering.

IPN-virus viste som ventet høy overlevelse, men over 3 log₁₀-inaktivering ble oppnådd ved pH 11 i 48 timer. For nodavirus ble det oppnådd over 4 log₁₀-inaktivering ved pH 11 i 24 timer. VHS-virus var overraskende motstandsdyktig, men total inaktivering ble oppnådd ved pH 11,2 etter 5 timer. For ILA-virus kan man ikke si noe om overlevelse i slikt materiale, da man ikke greide å påvise virus selv i positive kontroller.

Søknad til Statens Dyrehelsetilsyn om godkjenning av Gellyfeed-prosessen har resultert i en positiv forhåndsuttalelse, og en sier at prosessen etter all sannsynlighet vil bli godkjent etter at det nye EU-regelverket om animalske biprodukter er implementert i løpet av 2003. En legger da til grunn at prosessen innebærer en luttilsats til pH 11,2 og en oppholdstid på 24 timer. Videre at det tilsettes syre til pH lavere enn 5.

Etter implementering av EU-regelverket vil, i hht. Dyrehelsetilsynet, bruk av fiskeavskjær uten hygienisering blir forbudt som fiskefôr.



Veterinærinstituttet
Trondheim

RAPPORT

Hygieniserende effekt av Gellyfeed-prosessen

Asbjørn Husby
Veterinærinstituttet Trondheim

Veterinærinstituttet Trondheim
Tungasletta 2
7485 Trondheim



Innholdsfortegnelse	Side
Forord	3
Sammendrag	4
Innledning/bakgrunn	5
Materialer og metoder	6
Resultater	9
Diskusjon	12
Oppsummering	14
Referanser	15



Forord

Dette prosjektet er i sin helhet finansiert av Stiftelsen RUBIN.

Prosjektleder har vært Asbjørn Husby, Veterinærinstituttet Trondheim.

Jeg vil med dette takke følgende medarbeidere i prosjektet:

- Kirsti Sandnes Sæbø som har stått for de bakteriologiske prøvene ved Veterinærinstituttet Trondheim.
- Birgit Dannevig og Elin Johanne Trettenes ved Veterinærinstituttet Oslo, seksjon for virologi og serologi, for innspill og god hjelp ifm. med gjennomføring av IPNV, nodavirus og ILAV-forsøkene.
- Niels Jørgen Olesen og Nicole Nicolejsen ved Danmarks Veterinærinstitut, Avd. for Fjerkræ, Fisk og Pelsdyr, for innspill og god hjelp i forbindelse med planlegging og gjennomføring av VHSV-forsøkene.
- Øistein Bækken, Gellyfeed AS, for samarbeid, gode forslag og tilbakemeldinger under hele prosjektet.

Trondheim, 07.05.03

Asbjørn Husby



Sammendrag

Effekt av lutbehandling på overlevelse av fiskepatogene virus og bakterier, samt et utvalg indikatorbakterier, i en finmalt masse av sild ble undersøkt. VHS-virus, ILA-virus, IPN-virus, nodavirus og *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ble blandet i fiskemassen, og overlevelse ved ulike pH - og holdetidskombinasjoner etter luttilsetning ble undersøkt. På samme måte ble overlevelse av indikatorbakteriene *Clostridium perfringens*, *Salmonella* og *Enterobacteriaceae* undersøkt. Tilsats av lut til pH 10 førte til inaktivering av *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* og *Cl. perfringens* etter 12 timer. *Enterobacteriaceae* ble inaktivert ved pH 11 etter 12 timer. For *Salmonella* var det varierende resultater, men forsøket tyder på at lutbehandling til pH 11 i 12 timer, og god homogenisering gir total inaktivering. IPN-virus viste som ventet høy overlevelse, men over 3 log₁₀-inaktivering ble oppnådd ved pH 11 i 48 timer. For nodavirus ble det oppnådd over 4 log₁₀-inaktivering ved pH 11 i 24 timer. VHS-virus var overraskende motstandsdyktig, men total inaktivering ble oppnådd ved pH 11,2 etter 5 timer. For ILA-virus kan vi ikke si noe om overlevelse i slikt materiale, da vi ikke greide å påvise virus selv i positive kontroller.



Innledning/bakgrunn

Bakgrunnen for dette prosjektet er behovet for hygienisering av avskjær fra villfisk før dette brukes i fôrprodukter til oppdrettsfisk. Stiftelsen Rubin har siden 1991 jobbet med å utvikle et fôrprodukt basert på avskjær fra villfisk. Opprinnelig inneholdt denne prosessen ingen hygieniserende trinn. I forbindelse med Rubin-prosjektet ble det gjort en vurdering av smitterisiko ved bruk av Rubin-fôret, som konkluderte med at det var ingen reell smitterisiko forbundet med bruk av fôret. Statens dyrehelsetilsyn var kritisk til denne vurderingen, og ba derfor om en uttalelse fra Veterinærinstituttet vedrørende smittemessige betraktninger. Denne vurderingen konkluderte med at bruk av ubehandlet avskjær fra villfanget fisk utgjorde en reell fare for smitteoverføring.

Norsk Hydro har med utgangspunkt i Rubin-prosessen utviklet et eget fôrkonsept, GellyFeed. GellyFeed-prosessen skiller seg fra Rubin-prosessen ved at avskjæret under oppmaling tilsettes lut for konservering og hygienisering.

I 2001 ble det igangsatt et prosjekt i regi av Stiftelsen Rubin, med formål å foreta en grundig analyse av risiko for å overføre sykdomsfremkallende smittestoff til oppdrettsfisk ved bruk av villfanget, marin fisk som råstoff til våtfôr. Risikoanalysen omfattet både den opprinnelige Rubin-prosessen og GellyFeed-prosessen. I rapporten fra risikoanalysen (1) vurderes Rubin-fôret å utgjøre en risiko for overføring av flere smittestoffer (bakterier, virus og parasitter) til oppdrettsfisk. Når det gjelder GellyFeed-fôret vurderes risikoen som langt mindre, men for en del smittestoffer er det manglende kunnskap om i hvilken grad disse vil inaktiveres/reduseres ved høy pH.

Fra dyrehelsetilsynets side har det i første omgang vært fokusert på risikoen for overføring av smittestoffer som kan gi alvorlig sykdom på oppdrettsfisk. Basert på de smittehygieniske vurderingene har en ønsket å innhente dokumentasjon på smittereduserende effekt mot fire fiskepatogene virus (viral hemoragisk septikemi-virus (VHS), infeksiøs lakseanemi-virus (ILA), infeksiøs pankreasnekrose-virus (IPN) og nodavirus), samt en fiskepatogen bakterie (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*). I tillegg til dette er det behov for å dokumentere hygieniserende effekt i forhold til EU's regelverk for behandling og bruk av biprodukter til bl.a fôrprodukter. I dette regelverket stilles det krav til en definert mikrobiologisk standard mhp. følgende indikatorbakterier; *Clostridium perfringens*, *Salmonella* og *Enterobacteriaceae*.

Formålet med dette prosjektet har vært å undersøke overlevelse av det ovennevnte utvalg av indikatorbakterier og fiskepatogene virus og bakterier, under tilsetting av lut til en finmalt masse av sild.



Materialer og metoder

Råstoff

Som råstoff ble det benyttet hel, frossen sild. Silda ble tint samme dag som forsøk skulle utføres, og ble finmalt til en homogen masse ved hjelp av foodprocessor. Det ble også benyttet filèt av fersk torsk i deler av forsøket. Filèten ble finmalt i foodprocessor.

Kjemikalier

For justering av pH i prosessen ble det benyttet KOH (50% og 25 %) og HCl (50 % og 25 %).

Bakterier

Følgende bakteriestammer ble brukt under forsøket:

<i>Salmonella bongori</i>	CCUG 30042
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Clostridium perfringens</i>	NCTC 8533
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	VI/92/09/1680

Bakteriene ble oppformert i Brain Heart Infusion Broth (BHIB) under konstant røring. *S. bongori* og *E. coli* ble dyrket aerobt ved 37 °C i 18 – 24 timer. *Cl. perfringens* ble dyrket anaerobt ved 37 °C i 14 timer. *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ble dyrket aerobt ved 22 °C i 14 timer. Ved høsting ble det laget en 10-folds fortyningsserie, og 100 µl fra utvalgte fortyninger ble sådd ut på blodskål, for å bestemme antall kolonidannende enheter (CFU/ml) i suspensjonskulturen.

Virus

Følgende virus ble brukt under forsøket:

Infeksiøs pankreasnekrose-virus	IPNV (opprinnelig isolat fra sykdomsutbrudd, oppformert i laks ved smitteforsøk).
Nodavirus	Isolat AHNV 692/9/98, isolat fra sykdomsutbrudd.
Infeksiøs lakseanemi-virus	ILAV, isolat Glesvaer 2/90 (opprinnelig isolat fra sykdomsutbrudd, oppformert i laks ved smitteforsøk).
Viral hemoragisk septikemi-virus	VHSV, isolat DK-3592 B

IPNV ble dyrket i to passasjer på BF-2-celler ved 15 °C, vekstmedium Eagles MEM med 10 % føtalt bovint serum (FBS). Virussuspensjonen ble produsert like før forsøksstart og oppbevart ved 4 °C før og under transport. Nodavirus ble dyrket i 4 passasjer på SSN-1-celler ved 20 °C, vekstmedium Leibovitz L-15 medium med 5 % FBS, virus oppbevart ved – 80 °C før bruk. ILAV ble dyrket i 3 passasjer på SHK-1-celler ved 15 °C, vekstmedium Leibovitz L-15 medium med 5 % FBS, virus oppbevart ved – 80 °C før bruk. VHSV ble dyrket i to passasjer på BF-2-celler ved 15 °C, vekstmedium Eagles MEM med 10 % FBS, virus oppbevart ved – 80°C før bruk.



Forsøks gjennomføring

Det ble gjennomført separate forsøk med de enkelte bakterier og virus. Frossen sild ble tint opp og delt opp i mindre stykker. Hode og halefinne ble kastet, resten av fisken ble finmalt i foodprocessor. I forsøket med torsk ble kun filèten brukt. Etter finmaling ble massen overført til en stomacherpose, og bakterie- eller virus-suspensjon tilsatt til ønsket tetthet. Blandingen ble deretter homogenisert i stomacher. For forsøk med IPNV ble det tilsatt 40 ml virussuspensjon til 200 g oppmalt sild. For forsøk med nodavirus, ILAV og VHSV ble det tilsatt 40 ml virussuspensjon til 120 g oppmalt sild. I bakterieforsøkene ble det tilsatt 2 ml av bakteriesuspensjonen til 300 - 400 g oppmalt sild. Etter homogenisering ble massen fordelt i 4 like store deler. En del ble brukt som positiv kontroll. De tre andre delprøvene ble tilsatt 50 % KOH til pH på hhv. 10, 11 og 12. Prøvene med *E. coli*, *S. bongori* og *Cl. perfringens* ble inkubert ved romtemperatur under forsøket. Prøvene med *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ble inkubert ved 22 °C. Alle virusprøver ble inkubert ved 4 °C. Etter kontakttider på ca. 12, 24 og 48 timer ble en del av massen fra hver delprøve tatt ut og nøytralisert med 50 % HCl. For VHSV ble det i tillegg gjort forsøk med kombinert lut – og syrebehandling. Her ble delprøvene etter forutgående lutbehandling i 24 timer tilsatt 50 % HCl til pH ca. 4. Etter kontaktid på nye 24 timer ble delprøvene nøytralisert med 50 % KOH.

Bakterietetthet/virustiter ble deretter bestemt i de nøytraliserte prøvene.

Bestemmelse av bakterietetthet/virustiter i prøvematerialet

Bakterietetthet ble bestemt ved utsåing på faste medier. Det ble laget 10-folds fortyninger av prøvematerialet, og 100 µl fra egnede fortyninger ble sådd ut. Bakterietetthet ble beregnet som CFU/g (Colony Forming Units), dvs. antall kolonidannende enheter pr. gram materiale.

Salmonella:

Til bestemmelse av *Salmonella* i prøvene ble NMKL-metode 71 (2) benyttet. Dyrking ble gjort på Brilliant Grønn agar (BGA). Metoden er en kvalitativ metode, og resultatet oppgis som påvist / ikke påvist *Salmonella*.

Enterobacteriaceae:

Til bestemmelse av tetthet av *Enterobacteriaceae* i prøvene ble NMKL-metode 144 (3) benyttet.

Cl. perfringens:

Til bestemmelse av tetthet av *Cl. perfringens* i prøvene ble NMKL-metode 95 (4) benyttet.

A. salmonicida subsp. *salmonicida*:

Tetthet av *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* i prøvene ble bestemt ved å så ut 10-folds fortyninger av prøvematerialet på Comassie Blue Agar. Fortynninger ble gjort i saltvannspepton fortynningsvæske (8,5 g NaCl, 1 g pepton, 1000 ml dest. vann). Prøvene ble dyrket ved 22 °C. Avlesning ble gjort etter 48 og 72 timer, og blå kolonier ble telt som *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*.



Virustiter i prøvene ble bestemt ved endepunktstitrering i de respektive cellelinjer dyrket i 96-brønners mikrotiterplater. Prøvematerialet ble fortynnet 1:10 i Eagles MEM med 10 % newborn bovine serum umiddelbart etter nøytralisering, og oppbevart ved 4 °C til siste prøveuttak var ferdig (t = 48), evt. titrert fortløpende. Det fortynnede prøvematerialet ble homogenisert og sentrifugert ved 2500 rpm i 15 min før titrering. 10-folds fortynninger av supernatanten ble tilsatt cellekulturene; 6 parallelle brønner for hver fortynning. Platene ble inkubert ved 15 °C (20 °C for nodavirus) i 7 dager. Metode for identifisering av virusinfiserte cellekulturer er beskrevet for de respektive virus. Virustiter (TCID₅₀/ml) ble beregnet i henhold til Kärber (5). TCID₅₀ (Tissue Culture Infectious Dose) er den fortynningen som gir virusinfeksjon i 50 % av cellekulturene.

IPN-virus:

BF-2 celler ble benyttet for bestemmelse av IPNV-titer. Virusinfiserte cellekulturer ble identifisert ved avlesing av cytopatogen effekt (CPE).

ILA-virus:

SHK-1 celler ble benyttet for bestemmelse av ILAV-titer. Det ble gjort ett forsøk med titrering fortløpende etter prøveuttak. Cellekulturene ble etter inkubering i 7 dager fiksert i 80 % aceton, og virusinfiserte celler identifisert ved immunfluorescenstest (IFAT), som beskrevet av Falk *et al.* (6).

Nodavirus:

SNN-1 celler ble benyttet for bestemmelse av nodavirus-titer. Cellekulturene ble etter inkubering i 7 dager fiksert i 80 % aceton, og virusinfiserte celler identifisert ved immunfluorescenstest (IFAT), som beskrevet av Grove *et al.* (7).

VHS-virus:

BF-2 celler ble benyttet for bestemmelse av VHSV-titer. Prøvene ble titrert fortløpende etter uttak. Virusinfiserte cellekulturer ble identifisert ved avlesing av cytopatogen effekt (CPE). I tilfelle ingen CPE, ble materialet subkultivert, og sluttavlest etter ytterligere 7 dagers inkubering.



Resultater

Overlevelse av bakterier etter luttilsetning

Dyrking av bakterier fra materialet etter luttilsetning viste at de fleste bakteriestammene lot seg inaktivere raskt selv ved moderat høye pH-nivåer. Verken *Cl. perfringens* eller *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ble isolert fra noen av prøvene. Bakterietettheten i utgangsmaterialet var 1×10^5 CFU/g for *Cl. perfringens* og 5×10^8 CFU/g for *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*.

For *Enterobacteriaceae* viste dyrkingen at tettheten i utgangsmaterialet var 1×10^7 CFU/g. For materialet som var tilsatt lut til pH 12 og pH 11 ble det ikke påvist *Enterobacteriaceae* verken etter 10, 24 eller 48 timer (dvs. < 100 CFU/g). For materialet som var tilsatt lut til pH 10 ble det isolert bakterier ved alle prøveuttak. Etter 10 timer var tettheten i materialet 1×10^5 CFU/g, etter 24 timer var tettheten $1,4 \times 10^3$ CFU/g, og ved uttak etter 48 timer var tettheten over 2×10^7 CFU/g.

For *Salmonella* ble det benyttet en kvalitativ metode, og resultatet oppgis derfor som påvist eller ikke påvist *Salmonella* i materialet. Metoden er meget følsom fordi den inneholder to oppformeringstrinn før dyrking. Det er ikke mulig å angi om det har skjedd en reduksjon av *Salmonella* i materialet med denne metoden. Forsøk med *Salmonella* ble gjentatt 5 ganger, blant annet med variert utgangstetthet av *Salmonella*-bakterier. I de første forsøkene ble det benyttet en tetthet på ca. 5×10^8 CFU/g (beregnet fra tettheten av bakteriesuspensjonen). Senere ble denne tettheten redusert gradvis ned til 5×10^3 CFU/g (beregnet tetthet). Resultater fra forsøk med *Salmonella* er vist i tabell 1.

Tabell 1. Overlevelse av *Salmonella* i finmalt fiskemasse etter lutbehandling

Forsøksnr.		1	2	3	4	5
Beregnet utgangstetthet (CFU/g)		5×10^8	$2,5 \times 10^7$	$2,5 \times 10^4$	5×10^3	5×10^3
Utgangsmaterialet		+	+	+	+	+
pH 12	t = 12 timer	+	?	+	nt	nt
	t = 24 timer	+	?	+	+	?
	t = 48 timer	+	?	+	nt	nt
pH 11	t = 12 timer	+	+	?	nt	nt
	t = 24 timer	+	+	?	+	+
	t = 48 timer	+	+	?	nt	nt
pH 10	t = 12 timer	+	+	+	nt	nt
	t = 24 timer	+	+	+	+	+
	t = 48 timer	+	+	+	nt	nt

nt = ikke testet

+ = påvist

? = ikke påvist



Overlevelse av fiskepatogene virus etter luttilsetning

Det ble gjennomført forsøk med fire fiskepatogene virus, to nakne virus (IPNV og nodavirus) og to kappevirus (ILAV og VHSV).

Overlevelse av IPNV :

IPNV-titer (\log_{10} TCID₅₀/ml) i de ulike prøvene er vist i tabell 2. For materialet som var tilsatt lut til pH 12 ble det registrert en titerreduksjon på $\approx 3 \log_{10}$ ved alle prøveuttakene. For materialet som var tilsatt lut til pH 11 ble det registrert en titerreduksjon på 2 – 2,5 \log_{10} etter 24 timers eksponering. Etter 48 timer ved pH 11 ble det registrert en titerreduksjon på $\approx 3 \log_{10}$. Prøver ved pH 10 holdt et stabilt titer i perioden 16 – 48 timer. Ved titrering av prøvematerialet ble det observert toksisk effekt på cellekulturene ved laveste fortykning. Evt. virus ved denne fortykningen ville derfor ikke kunne påvises, og deteksjonsgrensen er derfor beregnet til 2 \log_{10} TCID₅₀/ml.

Tabell 2. IPNV-titer i finmalt fiskemasse etter lutbehandling (\log_{10} TCID₅₀/ml)

Prøve	Tid [timer]			
	t = 0	t = 16	t = 24	t = 48
	IPNV-titer			
Postiv kontroll	5,3	nt	nt	6,0
pH 12	nt	? 2,0	? 2,0	? 2,0
pH 11	nt	4,3	3,5	? 2,0
pH 10	nt	4,0	5,1	4,3

nt = ikke testet

? 2,0 = titer lavere enn deteksjonsgrensen

Overlevelse av nodavirus :

Nodavirus-titer (\log_{10} TCID₅₀/ml) i de ulike prøvene er vist i tabell 3. For materialet som var tilsatt lut til pH 12 ble det registrert en titerreduksjon $\approx 4 \log_{10}$ etter 12 timer. Etter 24 timer ble det ikke detektert virus ved pH 12. For materialet tilsatt lut til pH 11 ble det registrert en titerreduksjon på $\approx 2,5 \log_{10}$ etter 12 timer. Etter 24 timer var titer redusert med $\approx 4 \log_{10}$, og etter 48 timer ble det ikke detektert virus. Prøver ved pH 10 viste en lav titerreduksjon i hele tidsintervallet, og titerverdien var stabil.

Tabell 3. Nodavirus-titer i finmalt fiskemasse etter lutbehandling (\log_{10} TCID₅₀/ml)

Prøve	Tid [timer]			
	t = 0	t = 12	t = 24	t = 48
	Nodavirus-titer			
Positiv kontroll	6,0	nt	nt	6,8
pH 12	nt	? 2,0	? 2,0	? 2,0
pH 11	nt	3,6	? 2,1	? 2,0
pH 10	nt	5,3	5,3	6,0

nt = ikke testet

? 2,0 = titer lavere enn deteksjonsgrensen



Overlevelse av ILAV :

Forsøk med inaktivering av ILAV ble gjentatt 3 ganger, da det viste seg vanskelig å påvise virus også i positive kontroller. Ved det første forsøket ble prøvene nøytralisert og fortynnet 1:10 i Eagles MEM og oppbevart ved 4 °C før prøvene ble sendt inn til titrering. Dette betyr at virus har vært eksponert i fiskemassen i ca. 70 timer før titrering. Ved andre forsøks gjennomføring ble forsøket endret med hensyn på eksponeringstid, slik at alle prøver ble tatt ut innen 10 timer, nøytralisert, fortynnet i Eagles MEM og sendt inn til titrering. Dvs. at virus hadde vært eksponert i fiskemassen i ca. 24 timer før titrering. Ved den siste gjennomføringen ble det benyttet ren fillet av torsk, og alle prøver (med unntak av prøvene etter 24 timer) ble titrert fortløpende etter uttak, nøytralisering og fortynning 1:10 i Eagles MEM. Alle prøver som ble titrert mhp. ILAV var negative, dette gjaldt også positive kontroller, dvs. prøver hvor fiskemassen kun var tilsatt virussuspensjon. Beregninger basert på titer i virussuspensjonen skulle tilsi et titer på ca. $10^{5,4}$ TCID₅₀/ml i utgangsmaterialet.

Overlevelse av VHSV :

Forsøk med inaktivering av VHSV ble modifisert noe etter erfaringene med ILA-forsøket. Blant annet ble det tatt ut flere og hyppigere prøver fra positiv kontroll og det ble tatt ut prøver fra luteksponert materiale allerede etter 1 og 6,5 timer. I dette forsøket ble virussuspensjon tilsatt de enkelte delprøver **etter at** pH var hevet med lut. Alle prøver ble titrert umiddelbart etter prøveuttak, nøytralisering og fortynning 1:10 i Eagles MEM. Tabell 4 viser VHSV-titer (\log_{10} TCID₅₀/ml) i de ulike prøvene. For materialet som var tilsatt lut til pH 12 ble det ikke detektert virus ved noen av prøveuttakene. For materialet tilsatt lut til pH 11 og pH 10 ble det kun registrert en lav titerreduksjon, og titer i disse prøvene var stabil gjennom hele eksponeringstiden.

Tabell 4. VHSV-titer i finmalt fiskemasse etter lutbehandling (\log_{10} TCID₅₀/ml)

Prøve	Tid [timer]				
	t = 0	t = 1	t = 6,5	t = 24	t = 48
	VHSV-titer				
Positiv kontroll	5,7	5,9	5,4	5,3	5,6
pH 12	nt	? 2,2	? 2,2	? 2,2	? 2,2
pH 11	nt	4,2	4,1	4,8	4,4
pH 10	nt	3,4	3,9	4,3	3,8

nt = ikke testet

? 2,2 = titer lavere enn deteksjonsgrensen

Forsøket med VHSV ble senere gjentatt med enkelte endringer. Basert på resultatene fra første gjennomføring ble virussuspensjonen nå tilsatt fiskemassen **før** pH ble hevet med lut. Dvs. på samme måte som forsøkene med de andre virusene. Det ble benyttet 5 prøvepunkter i intervallet pH 11 – 12 (pH 11 – 11,2 – 11,5 – 11,7 og 12). For de tre delprøvene med lavest pH ble det etter 24 timers kontaktid tilsatt syre til pH ca. 4 og eksponering for denne pH-verdien i nye 24 timer. I tillegg ble det gjort forsøk med kun syrebehandling til pH 4 i 24 timer. Ved den siste gjennomføringen ble det ikke detektert virus i noen av prøveuttakene, verken i lut – eller syrebehandlede prøver, eller i prøver med kombinert behandling. VHSV-titer i positiv kontroll var $10^{5,1}$ – $10^{7,9}$ TCID₅₀/ml i tidsintervallet 0 – 48 timer, med høyeste titerverdi ved forsøksslutt.



Diskusjon

Forsøkene har vist at det oppnås høy inaktivering av alle bakterier ved tilsats av 50 % KOH til pH 11 til en finmalt masse av sild. For *Salmonella* kan vi ikke si noe om inaktiveringsgraden, da metoden for påvisning kun er kvalitativ. Resultatene fra *Salmonella*-forsøket må trolig ses på bakgrunn av at metoden som benyttes er svært sensitiv, slik at tilstedeværelse av kun et fåtall *Salmonella*-bakterier i materialet vil gi positiv prøve. Det er sannsynlig at det har skjedd en høy inaktivering av *Salmonella*-bakterier, men at et fåtall overlevende eller subletalt skadde bakterier, har ført til påvisning selv i materiale med høy pH. De varierende resultatene mellom de ulike gjentakene av *Salmonella*-forsøket kan forklares ved utilstrekkelig homogenisering. Materialet og lut ble blandet i stomacherpose ved hjelp av stomacher. Ved innblanding av lut fikk materialet en fast konsistens, og jo mer lut som ble tilsatt, jo fastere ble massen. Denne faste massen var vanskelig å homogenisere, og det er sannsynlig at det kan ha vært soner i materialet med for lav pH til at *Salmonella*-bakteriene har blitt inaktivert. Overlevende *Salmonella*-bakterier i slike soner vil gi påvisning i prøvematerialet, selv om det kan ha skjedd en høy inaktivering i den totale massen. I de gjentakene hvor vi har delprøver der det ikke er påvist *Salmonella*, kan dette tyde på at vi har oppnådd en god innblanding av lut, og dermed en homogen pH i hele materialet. Dersom vi tar i betraktning at homogeniseringen synes viktig for inaktiveringen, tyder resultatene på at luttilsetning til pH 11 er tilstrekkelig for total inaktivering av *Salmonella*. Mignotte-Cadiergues *et al.* (8) oppgir at tilsetning av kalsiumoksid (CaO) til pH 10 i 24 timer fører til eliminering av *Salmonella* i tørt slam. I flytende slam oppnås eliminering ved pH 10,7 etter 24 timer.

Resultatene fra forsøket med *Cl. perfringens* må vurderes ut fra om vi har hatt *Clostridium*-sporer eller vegetative bakterier tilstede i materiale. Det er vanskelig å si om de oppdyrkede clostridiene har dannet sporer under og etter innblanding i fiskemassen. Sporeformen av bakterien er langt mer hardfør enn den vegetative formen, og det kan stilles spørsmål om et høyt antall sporer i massen vil la seg inaktivere ved de laveste pH-verdiene vi har benyttet. Våre resultater viser at vi ikke har påvist *Cl. perfringens* i materialet etter luttilsetning, selv ikke ved pH 10, noe som kan skyldes at bakterien hovedsakelig har vært i sin vegetative form.

En interessant observasjon fra bakterieforsøkene er at tidsfaktoren, dvs. eksponeringstiden, ser ut til å være av underordnet betydning for inaktiveringen, i alle fall med de tidsintervaller og pH-nivåer som er benyttet her. Resultatene viser at dersom en oppnår total inaktivering, så inntreffer dette allerede etter første prøveuttak ved 10-12 timer. For de pH-nivåer hvor en fortsatt påviser bakterier i materialet, ser det ikke ut til at en lengre eksponeringstid gir noen ytterligere inaktivering. Dersom en hadde tatt ut prøver til dyrking i perioden mellom 0 – 10 timer, er det imidlertid mulig at en hadde observert en slik tidsavhengig effekt.

Forsøket med IPNV viste som ventet en høy overlevelse selv ved høye pH-verdier. Tilsetning av lut til pH 10 vil ha liten effekt på reduksjon av IPNV i materialet. Ved pH 11 oppnås en bedre effekt, med opptil 2,5 log₁₀-reduksjon etter 24 timer, og ? 3 log₁₀-reduksjon etter 48 timer. Ved pH 12 oppnås ? 3 log₁₀-reduksjon allerede etter 16 timer. Dette er i overensstemmelse med tidligere studier (Vestergård Jørgensen (9), Ahne (10) og Fløgstad *et al.* (11)).

Forsøket med nodavirus viste overlevelse på linje med IPNV. Også for dette viruset vil tilsats av lut til pH 10 ha liten/ingen effekt på titerreduksjonen. Det oppnås ? 4 log₁₀-reduksjon etter 24 timer ved pH 11 og total inaktivering etter 48 timer ved samme pH. Ved pH 12 oppnås ? 4 log₁₀-reduksjon allerede etter 12 timer, og total inaktivering etter 24 timer. Disse resultatene



er i overensstemmelse med tidligere studier (Arimoto *et al.* (12), Frerichs *et al.* (13), Peducasse *et al.* (14)).

Ut fra forsøkene med ILAV er det vanskelig å angi noe om følsomhet for de ulike pH-verdiene, da vi ikke har greid å påvise ILAV selv i positivkontrollene. Problemet med ILAV-forsøk er at en med de cellekulturer en har til rådighet for dyrking av viruset ikke oppnår høyt nok titer i virussuspensjonen. I våre forsøk har titer i virussuspensjonen vært ca. 10^6 TCID₅₀/ml. Ved fortykning i fiskemasse blir beregnet titer ca. $10^{5,4}$ TCID₅₀/ml. Siden deteksjonsgrensen ved titreringen var ca. 10^2 TCID₅₀/ml har vi et smalt intervall å jobbe innenfor. Det betyr at det skal svært lite til før virustiter i materialet er under deteksjonsgrensen. Våre resultater kan skyldes at viruset er følsomt for cellekomponenter (for eksempel enzymer) fra fisken, som blir frigjort under oppmaling. En enzymatisk inaktivering kan derfor ha skjedd innenfor det tidsintervall som har gått fra viruset tilsettes fiskemassen til det titreres på cellekultur. For å forsøke å redusere evt. påvirkning av virus fra bl.a. enzymer i fordøyelsessystemet, ble det gjort et forsøk der virus ble blandet med oppmalt filèt av torsk. Selv om prøvene her ble titrert umiddelbart etter uttak, var alle prøver negative mhp. ILA, også positivkontrollen. En annen forklaring til ILAV-resultatene kan være at virus har aggregert med partikler i homogenatet (fiskemassen fortennet i Eagles MEM). En slik aggregering vil gi et lavere titer enn det teoretisk beregnede titer, fordi en fortykker aggregerte viruspartikler (viruspartikler som er klumpet sammen) i stedet for enkeltvirus. I tillegg vil virus som er partikkelbundet bli utfelt med partiklene under sentrifugering, slik at titer i suspensjonen blir lavere. Tidligere forsøk med ILA-virus viser at infektiviteten reduseres med over 90 % ved pH 11 i 30 minutter (Falk *et al.* (15)). Forsøk med lutbehandling av et homogenat av infektivt materiale, viser at infektiviteten reduseres ved pH 11,5 i 24 timer, og at all infektivitet er borte ved pH 11,5 i 48 timer (Torgersen (16)). Torgersens resultater er basert på smitteforsøk, og det er ikke mulig å angi reduksjonsgrad, da en ikke kjenner titer i homogenatet.

Det første forsøket med VHSV viste en høy overlevelse selv ved høye pH-verdier. Tilsetning av lut til pH 10 og pH 11 viste kun en marginal effekt på reduksjon av VHSV. Ved pH 12 ble det ikke detektert virus ved noen av eksponeringstidene.

I det andre forsøket med VHSV ble det ikke detektert virus i noen av prøvene. Det var vanskelig å justere pH i fiskemassen nøyaktig i intervallet pH 11–12. pH-målinger av delprøvene i løpet av eksponeringstiden viste at pH-verdiene varierte noe. For de to delprøvene med lavest pH ble det målt en pH på litt i overkant av 11,2 i løpet av eksponeringstiden, resten av prøvene hadde en pH på over 11,5. Sammenlikning mellom første og andre gjentak er vanskelig, da det ikke er noen felles pH-verdier bortsett fra pH 12. At forskjellen i virusoverlevelse mellom pH 11 og 11,2 skal være så dramatisk som resultatene tyder på her, er vanskelig å forklare. En mulig årsak kan være at ved første forsøk ble virus blandet inn i fiskemassen etter at pH var justert med lut. I siste forsøk ble virus blandet inn i fiskemassen før tilsats av lut. Om denne rekkefølgen er av så stor betydning kan vi ikke si noe om på bakgrunn av kun to gjentak. Det siste forsøket kan også tyde på at syrebehandling ved lav pH er effektivt mot VHSV. Imidlertid er resultatgrunnlaget i dette forsøket for tynt til å si noe om overlevelsen ved lav pH. pH i den syrebehandlede prøven var ca. 3,6 like etter syreinnblanding, og etter 24 timer ble pH målt til ca. 4,6.



Disse resultatene tyder på at VHSV har en overlevelse ved høye pH-verdier som er sammenliknbart med IPNV og VNNV. Dette er overraskende, siden nakne virus (som IPNV og VNNV) tradisjonelt er mer motstandsdyktig mot kjemiske og fysiske påvirkninger enn kappevirus (som ILAV og VHSV). Det finnes få publiserte forsøk med inaktivering av VHSV ved høy pH. Ahne (10) oppgir at 2 % NaOH gir total inaktivering av VHSV innen 5 minutter. Løsningens pH ved denne doseringen er oppgitt til pH 11,85 – 11,90. Vestergård Jørgensen (9) oppgir at pH 12,2 gir minst 3 log₁₀-inaktivering etter 2 timer. Det er ikke funnet publiserte forsøk som viser følsomhet i pH-intervallet 10 – 11,5 og ved lengre eksponeringstider. Når det gjelder overlevelse ved lav pH oppgir Ahne (10) at VHSV inaktiveres ved pH 3 etter 3 timer. VHSV er dermed mindre motstandsdyktig mot lave pH-verdier enn IPNV og VNNV. En kombinert behandling med luttilsetning til pH over 11 og deretter syrebehandling til pH rundt 4 kan derfor være effektivt mot VHSV.

Oppsummering

Heving av pH ved tilsats av lut til finmalt fiskemasse ser ut til å kunne gi en effektiv hygienisering av materialet. Forsøket har vist at fiskepatogene virus og bakterier vil inaktiveres ved pH litt over 11. For IPN-virus oppnås ? 3 log₁₀-inaktivering etter 48 timer og for nodavirus oppnås ? 4 log₁₀-inaktivering etter 24 timer. For VHS-virus oppnås total inaktivering etter få timer ved pH 11,2. For indikatorbakteriene oppnås en høy inaktivering ved pH 11 etter 12 timer. For å sikre god effekt av behandlingen er det viktig at lut og materialet blandes godt, slik at det ikke dannes soner i massen med for lav pH.

Evt. oppfølging av forsøket bør konsentreres om ILA-virus og VHS-virus, både med tanke på effekt av høye pH-verdier, men også effekten av moderat lave pH-verdier. Ytterligere forsøk med *Salmonella* med tanke på å oppnå repeterbare resultater bør også gjennomføres.



Referanser

1. Brun, E. 2001. Smittehygienisk vurdering av fôr basert på villfanga fisk til oppdrettsfisk. Veterinærinstituttet, Rubinrapport nr. 4701/94.
2. NMKL-metode nr. 71, 4. utg., 1991: *Salmonella*-bakterier. Påvisning i næringsmidler.
3. NMKL-metode nr. 144, 2. utg., 2000: *Enterobacteriaceae*. Bestemmelse i næringsmidler og fôr.
4. NMKL-metode nr. 95, 3. utg., 1997: *Clostridium perfringens*. Bestemmelse i næringsmidler.
5. Kärber, G. 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. ARCH. EXP. PATHOL. PHARMAKOL. 162, s. 480 – 483.
6. Falk, K., Namork, E. og Dannevig, B.H. 1998. Characterization and applications of a monoclonal antibody to infectious salmon anaemia virus. DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS 34, s. 77 – 85.
7. Grove, S., Johansen, R., Dannevig, B.H., Reitan, L.J. og Ranheim, T. 2003. Experimental infection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* with nodavirus: tissue distribution and immune response. DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS 53, s. 211 – 221.
8. Mignotte-Cadiergues, B., Maul, A., Huyard, A., Capizzi, S. og Schwartzbrod, L. 2001. The effect of liming on the microbiological quality of urban sludge. WATER SCIENCE AND TECHNOLOGY 43, s. 195 – 200.
9. Vestergård Jørgensen, PE. 1974. A study of viral diseases in Danish rainbow trout, their diagnosis and control. Thesis. AS Carl Fr. Mortensen, Bülowsvej 5 C, 1870 København V.
10. Ahne, W. 1982. Vergleichende Untersuchungen über die Stabilität von vier fischpathogenen Viren (VHSV, PFR, SVCV, IPNV). ZBL. VET. MED. B 29, s. 457 – 476.
11. Fløgstad, H., Torgersen, Y., Schei, I. og Røttereng, PJ. 1991. Desinfeksjon av blodvann fra fiskeslakterier. SINTEF-rapport STF60 A91096, 101 sider.
12. Arimoto, M., Sato, J., Maruyama, K., Mimura, G. og Furusawa, I. 1996. Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). AQUACULTURE 143, s. 15 – 22.
13. Frerichs, GN., Tweedie, A., Starkey, WG. og Richards, RH. 2000. Temperature, pH and electrolyte sensitivity, and heat, UV and disinfectant inactivation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) neuropathy nodavirus. AQUACULTURE 185, s. 13 – 24.



14. Peducasse, S., Castric, J. og Baudin Laurencin F. Physical and chemical inactivation of sea bass nodavirus on SSN-1 cell line. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments – Laboratoire de Pathologie des Animaux Aquatiques, 29280 Plouzane, France.
15. Falk, K., Namork, E., Rimstad, E., Mjaaland, S. og Dannevig, BH. 1997. Characterization of Infectious Salmon Anemia Virus, an Orthomyxo-Like Virus Isolated from Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). JOURNAL OF VIROLOGY 71, s. 9016 – 9023.
16. Torgersen, Y. 1997. Physical and chemical inactivation of the infectious salmon anaemia (ISA) virus. Workshop on Infectious Salmon Anaemia. St. Andrews, New Brunswick, 26. November, s. 44 – 53.

