

UV-resistente virus

Av Helge Liltved, Christian Vogelsang, Birgit H. Dannevig og Ingebjørg Modahl

Helge Liltved er forskningsleder ved Norsk institutt for vannforskning (NIVA) og Christian Vogelsang er forsker samme sted.

Birgit H. Dannevig og Ingebjørg Modahl er henholdsvis leder og avdelingsingeniør ved seksjon for virologi og serologi ved Veterinærinstituttet

Sammendrag

Vi rapporterer her forsøk som viser at enkelte fiskepatogene virus har rekordhøy toleranse overfor UV-bestråling. Spesielt gjelder dette viruset som forårsaker infeksjøs pankreas nekrose (IPNV) hos laksefisk. I litteraturen er det ikke rapportert om andre fiskepatogene eller humanpatogene virus som har tilsvarende høy UV-resistens. Da UV-inaktivering normalt er knyttet til skader på virusets genom, kan man forvente en sammenheng mellom observert resistens og genomets oppbygning (dobbeltrådet eller enkelttrådet) og størrelse. Det som går igjen er at små virus med dobbeltrådet DNA eller RNA er mest resistente. Da virus synes å bli en økende trussel, både innen drikkevannsforsyning og i akvakultur, er det viktig med effektive virusbarrierer. Dersom målsetningen med framtidige UV-installasjoner er å eliminere alle patogene virus, trengs det en oppjustering av gjeldende dosekrav.

Summary

We here report experiments that reveal extreme UV resistance among some fish pathogenic viruses. This was especially pronounced for the virus responsible for infectious pancreas necrosis (IPNV) in salmonids. The resistance experienced was higher than earlier reported for other fish pathogenic and human pathogenic viruses. Since UV inactivation normally is caused by damages to the viral genome, there is expected to be a correlation between the observed resistance and the genome structure (i.e. double-stranded or single-stranded). A common feature is that small viruses with double-stranded DNA or RNA are likely to be the most resistant viruses to UV light disinfection. Since viruses seem to be an increasing problem in aquaculture and drinking water supply, efficient virus-barriers will be highly valued in the future. The existing dose requirements have to be increased to eliminate UV-resistant viruses.

Bakgrunn

UV-bestråling benyttes i økende grad som hygienisk barriere innen drikkevannsforsyning og i akvakultur-anlegg. Innen drikkevannsforsyning har ny kunnskap om UV-strålers effekt overfor bakteriesporer og parasittcyster gitt metoden fornyet popularitet (Clancy 2000, Liltved 2000a). I akvakultur er UV-bestråling en verdsett metode fordi den er effektiv overfor en rekke fiskepatogene bakterier som tidligere skapte store problemer i settefiskanlegg for laks, og fordi det ikke tilføres kjemikalier eller dannes reaksjonsprodukter som er giftig for oppdrettsorganismene (Liltved 2000b).

Den norske drikkevannsforskriften krever at vannet skal ha en betryggende hygienisk kvalitet, og at det til sammen finnes to hygieniske barrierer, hvorav den ene skal sørge for at drikkevannet blir desinfisert eller behandlet på annen måte for å fjerne, uskadeliggjøre eller drepe smitte-stoffer. UV-bestråling er aktuell som hygienisk barriere. Hvorvidt UV-bestråling er en effektiv barriere overfor alle humanpatogene virus, hersker det usikkerhet om. Environmental Protection Agency i USA (EPA) har gitt ut en oversikt over mikroorganismer som kan representere en helserisiko i drikkevannsforsyningen. Blant disse finnes virus som viser seg å være svært UV-resistente. Dette gjelder spesielt ulike varianter av adenovirus. Adenovirus synes å opptre i større konsentrasjoner enn andre entrovirus, og har blitt påvist i behandlet drikkevann (Lee og Kim 2002).

Ved oppdrett av laksefisk og marin fisk er virusinfeksjoner fortsatt et stort problem, spesielt i de tidlige livs-stadiene (egg, larve, yngel), da det ikke finnes effektive behandlings-metoder eller vaksiner. For desinfeksjon av inntaksvann er det installert svært mange UV-anlegg. Effekten overfor flere fiskepatogene virus er imidlertid tvilsom.

Blant fiskepatogene virus er det tidligere vist at viruset som forårsaker infeksiøs pankreas nekrose hos laksefisk (IPNV) er svært resistent mot UV-bestråling (Liltved et al. 1995, Øye og Rimstad 2001). Ellers fore-ligger det sparsomt med publiserte resultater som omhandler dose/respons forsøk med andre fiskevirus. Blant de som skaper størst problemer er nodavirus og viruset som forårsaker infeksiøs lakseanemi (ILA). Noda-virus er forbundet med høy dødelighet i forbindelse med oppdrett av marine fiskearter over hele verden, mens ILAV fortsatt er en trussel for lakseoppdrettere. Viruset fører til store tap, både i settefiskanlegg og i sjøanlegg.

For å framskaffe ny kunnskap om fiskepatogene virus og deres følsomhet overfor UV-bestråling, er det utført dose/respons-forsøk med følgende virus: IPNV, nodavirus og ILAV.

Prosjektet har vært finansiert av Norges forskningsråd gjennom Havbruksprogrammet.

Materialer og metoder

Oppdyrking av virus, samt kvantifi-sering før og etter eksponering for UV, ble utført ved Veterinærinstituttet, Seksjon for virologi og serologi.

Nodavirus ble dyrket i SSN-1 celler (Dannevig et al., 2000), IPNV i BF-2 celler (Lorenzen et al., 1999) og ILAV i SHK-1 celler (Dannevig et al., 1995). Mengde virus (infektiv dose, TCID₅₀) ble bestemt ved endepunktstitrering i de respektive cellekulturene. Ved denne metoden påvises virus enten ved mikroskopering for observasjon av cytopatogen effekt (CPE) eller ved en indirekte immunfluorescens teknikk (IFT).

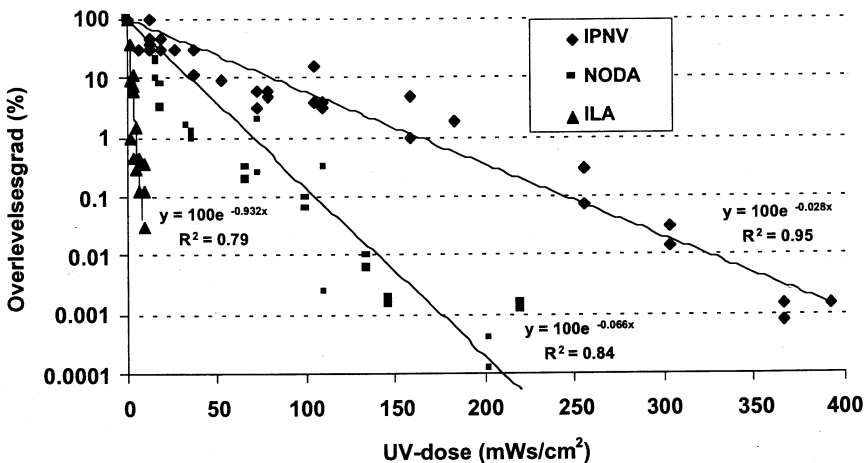
Virussuspensjoner ble bestrålet ved 5°C ved hjelp av en lavtrykks kvikksølvlampe montert i et apparat som gir parallelle stråler (Qualls og Johnson 1983). Virussuspensjoner ble overført til små petriskåler som ble bestrålt under omrøring. UV-intensiteten ved 254 nm ble målt ved væskeoverflaten med et kalibrert radiometer. Gjennomsnittlig intensitet (I) i suspensjonen ble beregnet ved hjelp av likningen:

$$I = I_0(1 - e^{-AL})/AL$$

hvor A er UV-absorbansen pr. cm og L er vanddybden (cm). Absorbansen ved 254 nm ble målt ved hjelp av et spektrofotometer. UV-dosen, som er produktet av gjennomsnittlig intensitet og eksponeringstiden, ble variert ved å variere eksponeringstiden.

Resultater og diskusjon

Figur 1 viser prosentvis inaktivering som funksjon av økende UV-dose for de tre ulike virusene benyttet i forsøkene. Tabell 1 angir UV-doser for ulike inaktiveringsgrader. Dosene i tabell 1 ble interpolert fra lineære regresjonslinjer for de respektive virus. En variansanalyse viste at det er en signifikant forskjell mellom inaktiveringshastighetene for de tre virusene.



Figur 1. Overlevelsesgrad (%) som funksjon av UV-dose for IPN-, noda- og ILA-virus.

Tabell 1. Nødvendige doser for 90, 99 og 99,9% inaktivering av IPN-, noda- og ILA-virus.

Virus	Nødvendig dose for inaktivering av virus med UV-lys (254 nm)		
	90,0%	99,0%	99,9%
IPNV	82	165	247
nodavirus	35	70	105
ILAV	2,5	5,0	7,5

UV-dosene som trengs for inaktivering av IPNV og nodavirus er ekstremt høye sammenliknet med nødvendige doser for inaktivering av andre kjente virus. Blant humanpatogene virus, hvor det er gjort en rekke studier med ulike virus, er det bare et fåtall som har en UV-resistens i nærheten av IPNV. Det er blitt vist at rotavirus og reovirus har relativt høy UV-resistens, henholdsvis 42 og 45 mWs/cm² for 99,9% inaktivering (Batigelli et al. 1993, Harris et al. 1987). Coliphage MS-2 har også vist seg å være relativt resistent mot UV-bestråling (Meng og Gerba 1996). Flere undersøkelser tyder imidlertid på at adenovirus er blant de mest resistente humanpatogene virus. Meng og Gerba (1996) benyttet adenovirus 40 og adenovirus 41 fra American Type Culture Collection (ATCC), og fant nødvendig dose for 99,9% inaktivering av de to virusene å være henholdsvis 92,7 og 82,4 mWs/cm². I senere forsøk med adenovirus type 2 (ATCC) var det nødvendig å heve dosen til 119 mWs/cm² for tilsvarende inaktiveringsgrad (Gerba et al. 2002). Som tallene antyder er det relativt store variasjoner i dosekrav mellom ulike typer av samme virus.

Det er ikke noe entydig svar på hva

som gjør noen virus mer UV-resistente enn andre, men ettersom UV-inaktiveringen normalt er blitt knyttet til dannelsen av fotoprodukter i virusets genom (dannelse av pyrimidin dimere), er det forventet å finne en sammenheng mellom den observerte resistensen og genomets karaktertrekk. Både størrelse på genomet og genomets oppbygging (dobbeltrådig eller enkeltrådig) ser ut til å ha betydning. Det som går igjen er at små virus med dobbeltrådig DNA eller RNA er relativt mer resistente enn andre. Gerba *et al.* (2002) konkluderte med at virus med dobbeltrådet DNA trolig er de mest resistente overfor UV-bestråling. Resultatene fra vår undersøkelse har imidlertid gitt indikasjoner på at virus med dobbeltrådet RNA (IPNV) har enda høyere UV-resistens. I litteraturen er det ikke funnet virus med tilsvarende høy UV-toleranse.

I tillegg til genomets karaktertrekk, kan også andre forhold spille inn når det gjelder UV-resistens. Det er vist at enzymer som finnes i levende celler, og også i de cellene (cellelinjene) som benyttes for å kvantifisere virus etter UV-bestråling, kan reparere UV-indusert DNA og RNA skade i virus. Tilstedeværelse og tilgjengelighet av

slike reparasjonsenzymmer kan dermed påvirke resultatet. Noen cellelinjer har større utvalg av reparasjonsenzymmer enn andre, noe som kan medføre økt overlevelse (Day 1993).

I Vannbehandlingsforskriften som gjelder for desinfeksjon av vann i oppdrettsanlegg, er det stilt krav til godkjente metoder for desinfeksjon av vann i oppdrettsanlegg. UV-bestråling er en godkjent metode, og det er sagt at inntaksvann skal bestråles med en dose på minimum 25 mWs/cm². Som det framgår av tabell 1, er en slik dose adekvat for ILAV, men ikke for IPNV og nodavirus. I praksis vil dette si at dagens UV-anlegg ikke fungerer som en barriere mot disse virusene, og at det må til en kraftig oppjustering av dosene dersom anleggene skal være effektive virusbarrierer.

Da virus synes å bli en økende trussel, både innen drikkevannsforsyning og i akvakultur, er det viktig med effektive virusbarrierer. Dersom målsetningen med framtidige UV-installasjoner er å eliminere UV-resistente virus, trengs det oppjusteringer av gjeldende dosekrav. Innen drikkevann ser det ut til at EPA tar konsekvensen av dette. I et utkast til nye amerikanske retningslinjer foreslås en dose på 143 mWs/cm² for å ta høyde for UV-resistente virus (EPA 2003).

Referanser

Battigelli D.A., Sobsey M.D. and Lobe D.C. 1993. The inactivation of hepatitis A and other model viruses by UV irradiation. *Wat. Sci. Technol.* 27, 339-342.

Clancy J. L. 2000. UV rises to the *Cryptosporidium* challenge. *Water21*, oktober 2000, 14-16.

Day R.S. 1993. Deoxyguanosine reverses inhibition by hydroxyurea of repair of UV-irradiated adenovirus 5. *Mutat. Res.* 293, 215-297.

Dannevig, B.H., Falk, K. & Namork, E. 1995. Isolation of the causal virus of infectious salmon anaemia (ISA) in a long-term cell line from Atlantic salmon head kidney. *Journal of General Virology* 76, 1353-1359.

Dannevig, B.H., Nilsen, R., Modahl, I., Jankowska, M., Taksdal, T. & Press, C. McL. 2000. Isolation in cell culture of nodavirus from farmed Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* in Norway. *Diseases of Aquatic Organisms* 43, 183-189.

EPA 2003. Ultraviolet disinfection guidance manual. United States Environmental Protection Agency 815-D-07-007, June 2003, Draft.

Gerba C.P., Gramos D.M. and Nwachuku N. 2002. Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5167-5169.

- Harris G.D., Adams V.D., Sorensen D.L. and Curtis M.S. 1987. Ultra-violet inactivation of selected bacteria and viruses with photoreactivation of the bacteria. *Wat. Res.* 21, 687-692.
- Lee S.H. and Kim S.J. 2002. Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. *Wat. Res.* 36, 248-256.
- Lorenzen, E., Carstensen, B., Olesen, N.J. 1999. Inter-laboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VHSV, IHNV and IPNV. *Diseases of Aquatic organisms*, 37, 81-88.
- Liltved H., Hektoen H. and Efraimsson H. 1995. Inactivation of bacterial and viral fish pathogens by ozonation or UV irradiation in water of different salinity. *Aquacultural Engineering*, 14, 107-122.
- Liltved H. 2000a. Ny internasjonal interesse for UV-bestråling som metode for inaktivering av Cryptosporidium. *VANN* 35, 337-342.
- Liltved H. 2000b. Disinfection of water in aquaculture: Factors influencing the physical and chemical inactivation of microorganisms. Dr.scient. avhandling, Universitetet i Tromsø.
- Meng Q. and Gerba C.P. 1996. Comparative inactivation of enteric adenoviruses, polioviruses and coliphages by ultraviolet irradiation. *Wat. Res.* 30, 2665-2668.
- Qualls R.G. and Johnson J.D. 1983. Bioassay and dose measurement in UV disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 872-877.
- Øye A.K. and Rimstad E. 2001. Inactivation of infectious salmon anaemia virus, viral haemorrhagic septicaemia virus and infectious pancreatic necrosis virus in water using UVC irradiation. *Diseases of Aquatic Organisms*, 48, 1-5