

Virusriskin vähentäminen elintarviketuotannossa

Satu Salo, VTT Expert Services Oy

Marjaana Rättö, Irina Tsitko ja Hanna Miettinen, VTT

Viruskontaminaation riskinhallintakeinojen kehittäminen ja arvioiminen

Tämän esityksen tulokset kuuluvat Virusten detektio ja hallinta prosessiympäristöissä –tutkimusprojektiin.

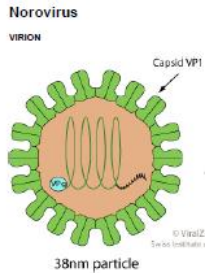
Tavoitteet

- Selvittää erilaisten käsittelyjen vaikutusta virusten tuhoamisessa ja viruskontaminaation ennaltaehkäisyssä
- Tuottaa näyttöä viruksiin tehoavista pesu- ja desinfointiaineista sekä muiden elintarvikkeiden ja veden käsittelyjen vaikutuksista viruksiin

Kohdeorganismi

- 2000-luvulla norovirus on ollut yksi yleisimmistä elintarvike- ja vesivälitteisten epidemioiden aiheuttajista Suomessa
- Kohdeorganismina riskinhallintakeinoja arvioitaessa oli norovirus

Noroviruksen inaktivoitumisen osoittaminen



- Virukset ovat solunsisäisiä loisia jotka pystyvät lisääntymään vain isäntäsolun sisällä
- Viruksen infektiivisyyden osoittaminen vaatii kasvattamisen isäntäsoluissa
- Ihmisen norovirusta ei nyky menetelmillä pystytä kasvattamaan soluviljelmissä
- Noroviruksen inaktivoitumista on tutkittu käyttäen malliviruksia (koiran kalikivirus, kissan kalikivirus, hiiren norovirus)
- Mikään mallivirus ei kuitenkaan ole kaikilta ominaisuuksiltaan ihmisen noroviruksen kaltainen eikä yleispätevää mallivirusta ole olemassa
- Noroviruksen osoittamiseen käytetään viruksen genomien osoittamiseen perustuva PCR-menetelmää joka detektoi myös ei-infektiiviset virukset,
- Väärien positiivisten tulosten eliminoimiseksi on kehitetty esikäsittelymenetelmiä, joilla pyritään poistamaan vahingoittuneista viruspartikkeleista peräisin oleva RNA entsyymaattisesti ennen PCR monistusta
- Projektin kuluessa on osoittautunut että huolimatta entsyymi esikäsittelystä PCR menetelmä aliarvioi desinfiointin vaikutusta

Mallivirusten valinta

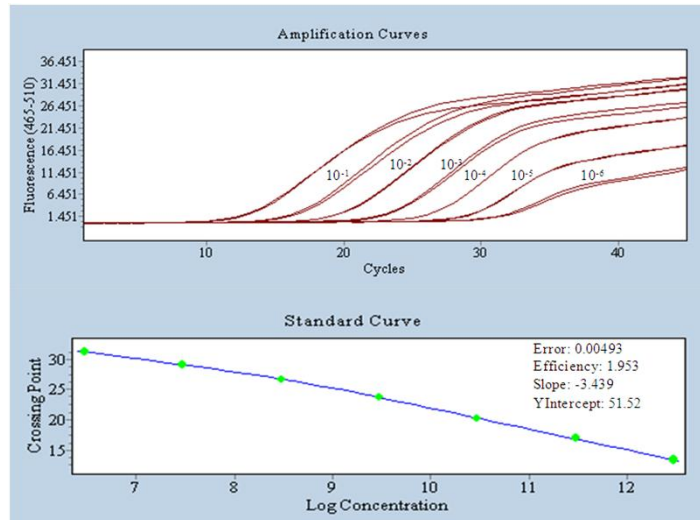
Tässä työssä käytetyt mallivirukset

- Hiiren norovirus (MNV)
 - Läheisesti sukua ihmisen norovirukselle ja kestää hyvin ympäristöolosuhteita
 - Kvantifiointi
 - PCR yhdistettynä entsyymaattiseen esikäsittelyyn
 - Kasvatus soluviljelmässä (HY: pinta-UV)
- MS2 kolifaagi
 - Pieni vaipaton, koostumukseltaan ja muodoltaan norovirusta muistuttava, suoliston olosuhteisiin adaptoitunut virus
 - Yleisesti käytetty mallivirus UV-reaktorien validoinnissa, tutkittaessa virusidien mekanismeja
 - Kvantifiointi *E. coli* -soluissa

Mikrobien luokittelu desinfiointinkestävyyden perusteella (McDonnell 2009).

	Mikrobi	Esimerkkejä
Suuri resistenssi ↑ Pieni resistenssi	Bakteeri-itiöt	Bacillus spp., Clostridium spp.
	Mykobakteerit	Mycobacterium tuberculosis
	Pienet vaipattomat virukset	Norovirus, poliovirus, MS2
	Sieni-itiöt	Aspergillus spp. Penicillium spp.
	Gram-negatiiviset bakteerit	Pseudomonas spp., Escherichia coli
	Vegatatiiviset sienet	Aspergillus spp., Candida spp.
	Suuret vaipattomat virukset	Adenovirus, rotavirus
	Gram-positiiviset bakteerit	Staphylococcus spp.
	Vaipalliset virukset	HIV, hepatitis B

Standardikäyrä hiiren noroviruksen RNA:n määrittämisestä PCR-menetelmällä



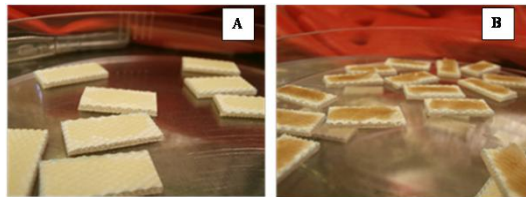
Desinfointiaineiden virusidinen teho pinnoilla

Desinfointiaine	Aktiiviuineen pitoisuus/käsittelyaika	Log ₁₀ vähenemä teräspinnalla		Käytetty mallivirus/kvantifointi
		Puhdas pinta	Likainen pinta	
Hypokloriitti-pohjainen	1000 ppm akt kloori/15 min	2,7	1,4	Hiiren norovirus/PCR+RNAasi
Kaliumpersulfaattipohjainen	0,6%/10 min	2,8	1,4	Hiiren norovirus/PCR+RNAasi
Etanoli	70%/15 min	2,4	0	Hiiren norovirus/PCR+RNAaasi
Peretikkahappopohjainen	0,15 % /30 min	0,9	0,3	Hiiren norovirus/PCR+RNAaasi
		2	0	MS2/PCR+RNAasi
		3,8	0,4	MS2/infektivitteittititrus

- Virusidisen tehokkuuden kriteeriksi esitetty 3-4 log₁₀ (Maillard *et al.* 2013)
- Tutkituista desinfointiaineista tehokkaimpia olivat hypokloriittipohjainen ja kaliumpersulfaattipohjainen aine, jotka vähensivät hiiren noroviruksen määrää puhtaalla teräspinnalla lähes 3 log yksikköä PCR-kvantifioinnin mukaan
- Orgaaninen lika heikensi kaikkien tutkittujen desinfointiaineiden tehoa selvästi

Vaahtopesut

- Emäksinen desinfiioiva hypokloriittia sisältävä vaahtopesuaine inaktivoi malliviruksen puhtaalla pinnalla mutta voimakkaasti likaisella pinnalla vaikutusta ei todettu
- Vaahtopesu (esihuuhtelu 55°C vedellä, vaahtotus, huuhtelu 55°C vedellä) poisti mallivirusta (MS2) sekä puhtailta että likaisilta pinnoilta
- Virus peseytyi tehokkaammin maitoliialla liatulta kuin makkaraliialla liatulta pinnalta
- Ero ilmeisesti riippui siitä kuinka hyvin virussuspensio läpäisi likakerroksen
 ⇒ desinfiointi pesun jälkeen tarpeen



Projektin havainnot

- Erityyppiset liat suojaavat virusta pesuilta ja desinfiointeilta
- Ihmisen noroviruksen tuhoutumista eri kemikaaleilla on hankala tutkia
 - Kemikaalit häiritsevät PCR-ajoja
 - Noroviruksen kohdistuvien riskinhallintakeinojen kehittämistä ja arviointia on vaikeuttaa se, että ihmisen norovirusta ei pystytä kasvattamaan soluviljelmässä. joten viruksen kykyä infektoida isäntäsolu ei voida osoittaa.
 - Noroviruksen osoittamiseen yleisesti käytetty viruksen genomien osoittamiseen perustuvaa RT-PCR-menetelmä antaa positiivisen tuloksen vaikka virus ei olisi enää infektiivinen
 - Mallivirusten avulla saadaan suuntaa-antavaa tietoa norovirusten tuhoutumisesta
 - Entsyymäattisen esikäsittelyn yhdistämisen virusten RT-PCR detektiin vähentävän vääriä positiivisia tuloksia. Soluviljelytulosten perusteella voitiin kuitenkin päätellä, että entsyymikäsittely-PCR-testillä saatu tulos aliarvioi virusten inaktivoitumista.

Virusten UV-inaktiointi pinoilla

- Puhtaalla pinnalla UV-annos 220 mJ/cm² vähensi MS2 kolifaagin määrää noin 3 log yksikköä
- Hiiren norovirus oli selvästi herkempi kuin MS2
- Annos 200 mJ/cm² valittiin tavoitearvoksi pintojen UV-käsittelyssä
- UV-annos 200 mJ/cm² saavutetaan noin yhden tunnin UV-käsittelyllä suoraan kattoon sijoitetun lampun alapuolella, 1,5-2 m etäisyydellä lampusta olevalla pinnalla

MS2 ja hiiren norovirus: UV-annoksella 220 mJ/cm² saavutettu log₁₀ vähenemä puhtaalla teräspinnalla

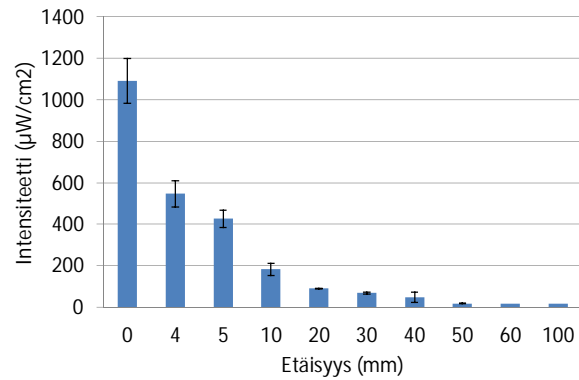
Kvantifiointi	MS2	MNV
titraus	3 log ₁₀	
PCR	1,2 log ₁₀	3 log ₁₀

UV-inaktiointi vedessä

- Virukset inaktivoituivat veden UV-käsittelyssä huomattavasti huonommin kuin referenssibakteeri (*E. coli*)
- 40 mJ/cm² UV-annos inaktivoi tutkittuja viruksia 1-3 log yksikköä määritettynä PCR-menetelmällä
- PCR ja titrausmenetelmien tulosten vertailu MS2:lla osoitti virusten inaktivoituvan huomattavasti enemmän kuin PCR-menetelmällä todettiin
- Virusten ja erityisesti ihmisen noroviruksen aglomeroituminen vedessä aiheutti suurta hajontaa koetuloiksiin
- Myös käytännön elämässä norovirus todennäköisesti esiintyy suurina aglomeraatteina
 - Aglomeraatit suojaat sisään jääviä viruksia UV-käsittelyssä, joten viruksen täydellinen inaktiointi UV-käsittelyssä on vaikeaa

Väliaineen paksuuden vaikutus UV-valon intensiteettiin

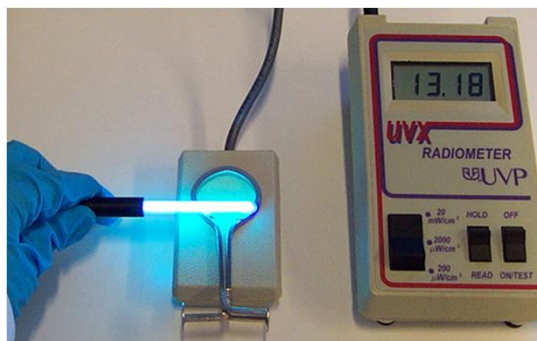
- Intensiteetin muutos mittausetäisyyden kasvaessa vedessä



Etäisyys (mm)	4	5	10	20	40	100
Tehosta jäljellä (%)	50,2	39,2	16,9	8,4	4,5	1,7

Ihmisen noroviruksen inaktivointi vedestä

- Ihmisen norovirus inaktivoitui puhtaassa vesijohtovedessä kohtalaisesti UV-käsittelyssä, mutta ongelmia aiheutti virusten aglomeroituminen, jolloin UV-valo ei päässyt vaikuttamaan aglomeraattikasan sisällä oleviin viruksiin. Ulosteperäinen virussaastutus vedessä on aglomeroitumisesta johtuen hankalasti inaktivoitavissa UV- valolla.



Johtopäätöksiä

- Pesu- ja desinfektiokeissa osoitettiin että hypokloriittipohjainen (1000 ppm akt. kloori) ja persulfaattipohjainen desinfiointiaine vähensivät hiiren noroviruksen määrää puhtaalla pinnalla 2-3 log₁₀ PCR menetelmällä mitattuna, mutta likaisella pinnalla kaikkien tutkittujen desinfiointiaineiden teho heikkeni huomattavasti.
- Desinfiointiaine oli tehokas käytettyä mallivirusta vastaan puhtaassa vedessä ja puhtaalla pinnalla, mutta voimakkaasti likaantuneella pinnalla vaahtopesuaineella ei ollut vaikutusta infektiivisen viruksen määrään.
- Vaahtopesun, johon kuului pintojen esihuuhtelu ja jälkihuuhdelu lämpimällä vedellä, poisti tehokkaasti viruksia sekä puhtailta että likaisilta pinnoilta sekä huoneenlämpötilassa että kylmähuone-olosuhteissa.

Vertailu kansainvälisiin norovirustartuntojen ehkäisyohjeisiin

- Riittävä käsihygienia
 - Yleisissä ohjeissa neuvotaan pesemään ensin kädet huolella vedellä ja saippualla ja lisäksi voidaan käyttää alkoholipohjaisia käsien desinfiointiaineita. **Desinfiointiaineita ei saa käyttää korvaamaan saippuapesua.** Projektimme tutkimuksia ei tehty käsienpesulle, mutta pintatutkimusten tuloksissa orgaaninen lika selvästi heikensi ja yleensä jopa poisti kokonaan desinfiointiaineen virusidisen tehon. Pestyn pinnan desinfiointi sitä vastoin toimi pinnalle jääneitä viruksia vastaan.
- Kontaminoituneen pinnan puhdistus ja desinfiointi
 - Noroviruspotilaan oksennuksia neuvotaan välittömästi puhdistamaan ja desinfiointiin käyttämällä esimerkiksi kloorivalkaisuliuosta, jonka pitoisuus on 1000-5000 ppm. Projektimme desinfiointikokeissa osoitettiin, että hypokloriittipohjainen (1000 ppm akt. kloori) ja persulfaattipohjainen desinfiointiaine vähensivät hiiren noroviruksen määrää puhtaalla pinnalla 2-3 log₁₀ PCR menetelmällä mitattuna, mutta likaisella pinnalla kaikkien tutkittujen desinfiointiaineiden teho heikkeni huomattavasti.



**VTT luo teknologiasta
liiketoimintaa**

The image features a dark blue background with a grid of binary code (0s and 1s) that recedes into the distance, creating a sense of depth. In the upper left, the VTT logo is displayed in white. Below the logo, a horizontal row of six circular images illustrates different aspects of VTT's work: 1) A circular graphic with binary code and a central light source. 2) A woman in a lab coat working with a piece of white material. 3) A man in a lab coat and safety glasses holding a pink multi-well plate. 4) A man in a lab coat working with laboratory equipment. 5) A man in a blue uniform and white hard hat working at a workstation. 6) A small globe with a green plant growing out of it, symbolizing sustainability or environmental technology.