

Vurdering fra DTU Fødevareinstituttet: Varmeinaktivering af virus i bærprodukter

Vurdering fra DTU Fødevareinstituttet: Varmeinaktivering af virus i bærprodukter

I forbindelse med lovkrav til fødevarevirksomheder om inaktivering af norovirus (NoV) i frosne hindbær ved kogning i 1 min ved 100°C, eller ved anden behandling, der giver tilsvarende effekt, har Fødevarestyrelsen bedt DTU Fødevareinstituttet om dokumenteret viden indenfor hvilke varmeinaktiverings-temperaturer og tider, der har vist sig at reducerer NoV i bærprodukter som juice og tærte.

DTU Fødevareinstituttet
Afdelingen for Fødevaremikrobiologi
Oktober 2012

Anna Charlotte Schultz

LITTERATURSTUDIE

Bær kan blive forurenet med NoV under produktionen, hvis der f.eks. benyttes utilstrækkelig rensede spildevand eller medarbejdere, der er inficeret med NoV. Da bær ofte spises uden forudgående behandling og NoV er hårdføre i miljøet samt meget smitsom i selv lave koncentrationer (10-100 partikler), kan NoV forurenede bær medføre sygdom hos forbrugerne. Infektionsdosis afhænger både af den enkelte NoV genotype¹⁶ samt værtens's modtagelighed af denne¹⁰. Blandt de få studier omhandlende monitorering af NoV i bær, er der påvist NoV i niveauer på 10^1 - 10^5 genom kopier/g bær^{1,3,15}, mens der i prøver af udbrudspartier er påvist 10^1 - 10^3 genom kopier/g bær¹³. Specielt bevares NoV bedst ved frysning, hvorfor det mest har været de frosne produkter, der har givet anledning til sygdomsudbrud med roskildesyge.

Da NoV ikke lader sig kultiverer, har kultiverbare modelvirus som hepatitis A virus i vaccineform (HAV), murine norovirus (MNV) samt feline calicivirus (FCV) været de mest anvendte til studier af varmeinaktivering af NoV i forskellige matricer. Af disse studier fremgår det, at de nævnte modelvirus kan rangordnes efter faldende varmeresistens som følger: HAV > MNV > FCV⁹, mens varmeresistensen af NoV formodes at svare til MNV, om end nogle NoV-genotyper kan være mere resistente end MNV¹¹.

Der er adskillige faktorer der har indflydelse på den varmereducerende effekt af virus i bærprodukter. Nogle af disse faktorer er stabiliteten af den enkelte NoV-type¹¹, kontaminationsniveau, inaktiveringsmetode (blanding, kapilær opvarmning, opvarmning i gryde m.m.) samt komponentsammensætning (flydende, fast, sukkerindhold og pH) i matricen hvori virus befinder sig. Aggregeringer (sammenklumpninger) af virus kan reducere inaktiveringseffektiviteten^{14,17} og koncentrationen af forureningsgraden indenfor et forurenede produkt kan variere indenfor batch'ets enkelte enheder (del-batch og poser)^{8,10}. Sammensætningen af selve fødevareren (f.eks. pH-værdi og indhold af sukker) kan føre til en beskyttende effekt af virus under opbevaring, forarbejdning og behandling⁷. Bær er generelt sure med pH-værdier imellem 2.5 - 3.3, mens sukker indholdet er omkring ~5% (wt/wt)⁷.

De fleste publicerede studier vedr. varmeinaktivering af virus, omhandler flydende matricer som buffere eller cellekulturmedier mens varmeinaktivering af virus i bær er sjældne og kun omhandler purrede produkter af bær med forskellige niveauer af pH og tilsatte ingredienser som f.eks. sukker^{2,6,7}. De fremkomne resultater kan derfor ikke direkte sidestilles med forventet virusinaktivering på hele bær, eller bærprodukter hvori der er tilsat forskellige ingredienser. Derfor bør studier af varmebehandling tilpasses de specifikke karakteristika der gælder for det individuelle produkt, der søges oplysning om^{6,7}. Dette har ført til udvikling af virusprodukt modeller med henblik på at forudsige varmeinaktiveringskinetikken i forskellige virusprodukt kategorier^{4,6,7,18}.

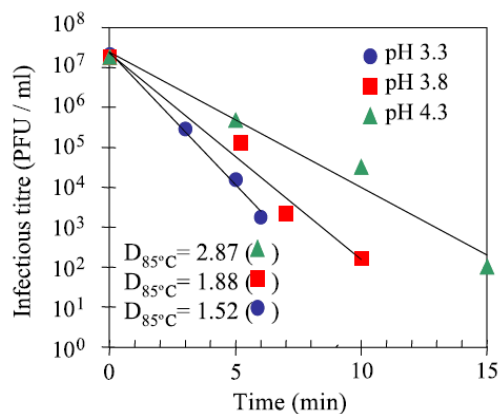
To af disse studier omhandler varme inaktivering af HAV i bærpuré. Det ene med varierende sukkermængde behandlet ved 80-90°C⁶, det andet med varierende pH behandlet ved temperaturer, der minder om pasteurisering⁷. Varmeinaktivering af HAV i syntetiske medier, der simulerer den kemiske sammensætning af jordbærpuré viste, at stigende sukkerkoncentrationer medfører en stigning af den beskyttende effekt af HAV⁶, Tabel 1. Således fandtes 1 log reduktion af HAV i jordbærpuré tilsat sukker (f.eks. 28% (wt/wt)) efter 2 min opvarmning til 80, 85 eller 90°C efterfulgt af en bibeholdelse af de pågældende temperaturer i hhv. 1,22, 0,96 or 0,32 minutter (Tabel 1).

Table 1. Effekten af varmeinaktivering af virus i bær puré.

Virus	Inaktiverings parametre	Bærprodukt	Log reduktion ^a	Reference
HAV	80°C: 1.22 min, 28% sukker	Jordbær puré (1g)	1	6
	8.94 min, 52% sukker		1	
	85°C: 0.96 min, 28% sukker		1	
	4.98 min, 52% sukker		1	
	90°C: 0.32 min, 28% sukker		1	
	3.00 min, 52% sukker		1	
MNV	75°C: 15 sec, 9.2% sukker	Hindbær puré (10 g)	2.81	2

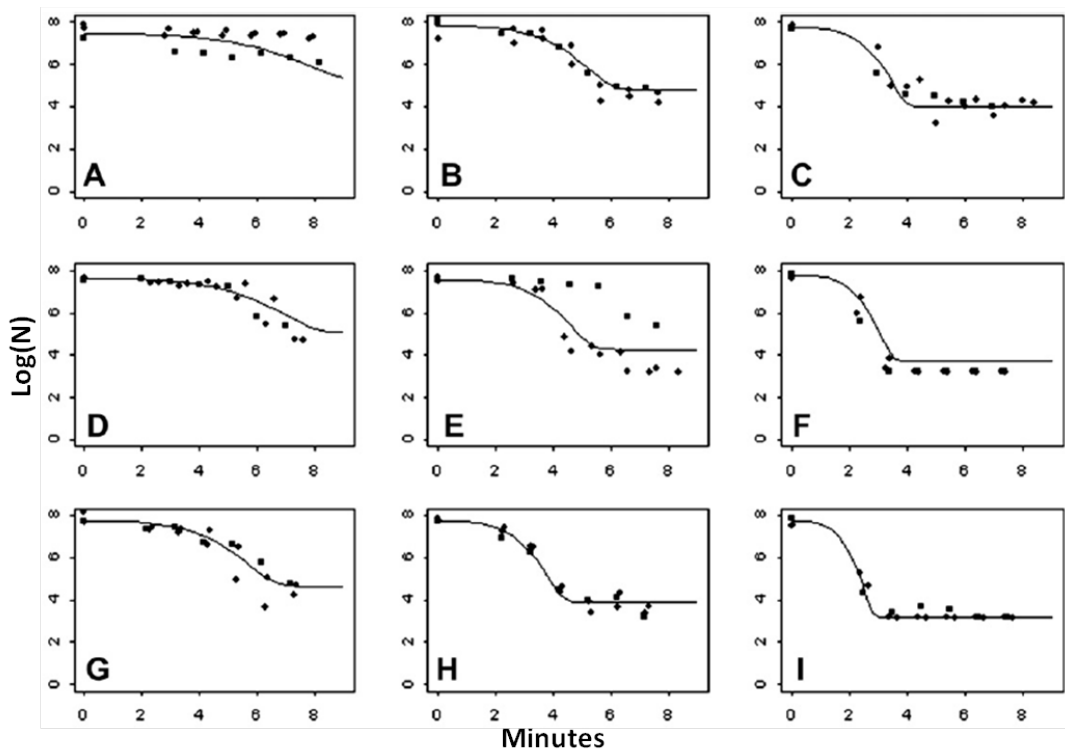
^aLog reduktion af infektiøse virus målt i plaque formende enheder eller 50% tissue culture infectious doses.

Omvendt, medfører faldende pH en forøgede varmeinaktivering af HAV i fremstillet puré af hindbær og jordbær^{6,7}, figur 2.



Figur 1. Varmeinaktivering af HAV i jordbærpuré ved forskellig pH.

Ved sammenligning af modelforudsigelserne og eksperimentelt opnåede resultater af varmeinaktiveringsforsøg af HAV i puré af forskellige bærtypen (jordbær, hindbær og blåbær), Figur 2, fandtes overordnet en god overensstemmelse⁷. Studiet viste en omtrentlig inaktivering af HAV i puré af de tre bærtypen på 3 log ved 70°C i 6 min og 4 log ved 75°C i 4 min Figur 2. Opnåelse af de ønskede temperature fandt sted i løbet af de første 2 min, hvorunder også en del af virus reduktionen fandt sted. Det bemærkes i Figur 2, at behandlingstider på 6-8 min ikke i alle tilfælde medfører yderligere drab. Dette betegnes en 'hale-effekt' og kan tænkes at skyldes evt. tilstedeværende aggregater af virus.



Figur 2 Inaktiveringskinetik af HAV i jordbærpuré (pH 3.35) ved 65°C (A), 70°C (B) og 75°C (C), i hindbærpuré (pH 3.05) at 65°C (D), 70°C (E) and 75°C (F), og i blåbærpuré (pH 2.87) ved 65°C (G), 70°C (H) og 75°C (I); eksperimentelle data (symboler, 3 gentagelser) og model forudsigelse (kurve) ⁷.

Et andet studie fandt at MNV i hindbærpuré forvarmet til 75°C, blev reduceret med 2,81 log efter kun 15 sekunders yderligere varmebehandling ved samme temperatur (sukkerindhold, 9.2% (wt/wt))². HAV syntes således at være mere varmeresistent end MNV, men den højere sukkerkoncentration i jordbærpuréen, den indledende opvarmingsperiode på 2 min og en højere inokulum af virus (10^7 PFU/ml HAV kontra 10^5 PFU/ml MNV), kan delvis være årsag til forskellen i inaktivering.

Drabseffekten efter blanchering (skoldning i kogende vand eller dampbad) af friske krydderurter (persille, basilikum, mint og purløg) har vist, at 2,5 min damp-blanchering ved 95°C reducerede antallet af infektiøse HAV (10^6 TCID₅₀) med >3 log, i modsætning til en gennemsnits reduktion på 2 log ved 75°C⁵.

Endelig har et gammelt studie fra 1987¹² vist, at for fuldstændig inaktivering af HAV ($\sim 10^5$ PFU) i skaldyr krævedes opnåelse af en intern temperatur af skaldyrrene på 85-90°C og at denne temperatur skulle opretholdes i yderligere 1 min.

VURDEREDE VARMEEFFEKTER PÅ VIRUS I BÆRPRODUKTER

Der findes ingen studier, der undersøger varmeinaktivering af virus på hele bær eller i bærprodukter udsat for kogning ved 100°C i 1 minut. På baggrund af resultaterne fundet i ovenfor nævnte studier vurderer Fødevareinstituttet at HAV og NoV vil inaktiveres med mindst 4 log i forurenede frosne bær efter 1 min kogning ved 100°C, hvilket må forventes tilstrækkeligt i betragtning af de nævnte NoV-niveauer fundet i bær^{1,3,15}.

For produkter hvori hele frosne bær indgår, som f.eks. tærter toppet med frosne bær, må en reduktion af virus på 4 log forventes tilstrækkelig. Ved bagning i ovn kan det dog være svært at opnå en temperatur på 100°C, hvorfor den opnåede virusreduktion under opvarmningstiden frem til en mulig opnåelig temperatur på evt. 85-90°C opretholdt i yderligere 1 min, må anses at kompensere for et evt. reduceret temperaturkrav.

For produkter som f.eks. juice af frosne bær hvor disse holdes optøet en vis tid (formentlig dage til uger) under forarbejdning, distribuering og salg, vil en naturlig reduktion (~1 log) af virus ineffektiviteten forventes at finde sted. Da bærrerne samtidig fortyndes med vand, vil en evt. viruskoncentrationen fortyndes tilsvarende. En lavere virusreduktion (~3 log) må derfor forventes tilstrækkelig til opretholdelse af fødevarerens sikkerhed. Når det er sagt, bør der i inaktiverings temperatur-tids bestemmelsen indtænkes risiko for, at virus udskilt med fæces ofte kan findes i form af aggregeringer, hvorfor klumper af virus kan være ujævnt fordelt i væsken. Desuden bør der tages højde for at varmeinaktivering reduceres ved evt. tilsætning af sukker samt evt. stigning i pH, samt at der ved opvarmning af juicen ved gennemløb i 'kapillærrør' ikke finder en opvarmningstid sted. Dersom endelig nyere studie har vist, at visse NoV-typer kan være mere varme resistente end MNV¹, vil 75°C i 15 sec svarende til 2,81 log reduktion af MNV², nok være utilstrækkelig til at sikre tilpas virusdrab. Det vurderes at mindst 80°C i mindst 20 sec, vil resultere i en mere overbevisende inaktivering af NoV i tilfælde af 'worst-case' kontamineringsniveauer (10⁵ NoV genome copier/g) af bærprøver påvist i det franske studie beskrevet af Baert m.fl.¹.

Afslutningsvis skal det understreges at de ovenstående vurderinger er foretaget på baggrund af den sparsomme litteratur, der findes på området. Fremtidige vurderinger kan ændres i forhold til ny viden opnået fra nye inaktiveringsstudier baseret på virus-produktkategorier mere lig de forespurte.

Referencer

1. Baert, L., K. Mattison, F. Loisy-Hamon, J. Harlow, A. Martyres, B. Lebeau, A. Stals, E. Van Collie, L. Herman, and M. Uyttendaele. 2011. Review: Norovirus prevalence in Belgian, Canadian and French fresh produce: A threat to human health? *Int. J. Food Microbiol.* 151:261-269.
2. Baert, L., M. Uyttendaele, E. Van Collie, and J. Debevere. 2008. The reduction of murine norovirus 1, B. fragilis HSP40 infecting phage B40-8 and E. coli after a mild thermal pasteurization process of raspberry puree. *Food Microbiol.* 25:871-874.
3. Brassard, J., M. J. Gagne, M. Genereux, and C. Cote. 2012. Detection of Human Foodborne and Zoonotic Viruses on Irrigated, Field-Grown Strawberries. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:3763-3766.
4. Buckow, R., S. Isbarn, D. Knorr, V. Heinz, and A. Lehmacher. 2008. Predictive model for inactivation of feline calicivirus, a norovirus surrogate, by heat and high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:1030-1038.
5. Butot, S., T. Putallaz, R. Amoroso, and G. Sanchez. 2009. Inactivation of enteric viruses in minimally processed berries and herbs. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:4155-4161.
6. Deboosere, N., O. Legeay, Y. Caudrelier, and M. Lange. 2004. Modelling effect of physical and chemical parameters on heat inactivation kinetics of hepatitis A virus in a fruit model system. *Int. J. Food Microbiol.* 93:73-85.
7. Deboosere, N., A. Pinon, A. Delobel, S. Temmam, T. Morin, G. Merle, S. Blaise-Boisseau, S. Perelle, and M. Vialette. 2010. A predictive microbiology approach for thermal inactivation of Hepatitis A virus in acidified berries. *Food Microbiol.* 27:962-967.
8. Falkenhorst, G., L. Krusell, M. Lisby, S. B. Madsen, B. Bottiger, and K. Molbak. 2005. Imported frozen raspberries cause a series of norovirus outbreaks in Denmark, 2005. *Euro Surveill.* 10:E050922.
9. Gibson, K. E. and K. J. Schwab. 2011. Thermal Inactivation of Human Norovirus Surrogates. *Food Environ. Virol.* 3:74-77.
10. Koopmans, M. and E. Duizer. 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int. J. Food Microbiol.* 90:23-41.
11. Li, D., L. Baert, M. Xia, W. Zhong, E. Van Collie, X. Jiang, and M. Uyttendaele. 2012. Evaluation of methods measuring the capsid integrity and/or functions of noroviruses by heat inactivation. *J. Virol. Methods.* 181:1-5.
12. Millard, J., H. Appleton, and J. V. Parry. 1987. Studies on heat inactivation of hepatitis A virus with special reference to shellfish. Part 1. Procedures for infection and recovery of virus from laboratory-maintained cockles. *Epidemiol. Infect.* 98:397-414.
13. Schultz, A. 2012. Ph.D. thesis. Detection and inactivation of noroviruses in raspberries, p. 77-103. Faculty of Health and Medical Science, University of Copenhagen and The national Food Institute, Technical University of Denmark, SL Grafik, Frederiksberg C, Denmark (www.slgrafik.dk).
14. Shin, G. A. and M. D. Sobsey. 2008. Inactivation of norovirus by chlorine disinfection of water. *Water Res.* 42:4562-4568.
15. Stals, A., L. Baert, V. Jasson, E. Van Collie, and M. Uyttendaele. 2011. Screening of fruit products for norovirus and the difficulty of interpreting positive PCR results. *J. Food Protect.* 74:425-431.
16. Teunis, P. F., C. L. Moe, P. Liu, S. E. Miller, L. Lindesmith, R. S. Baric, J. Le Pendu, and R. L. Calderon. 2008. Norwalk virus: how infectious is it? *J. Med. Virol.* 80:1468-1476.
17. Thurston-Enriquez, J. A., C. N. Haas, J. Jacangelo, and C. P. Gerba. 2003. Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3979-3985.
18. Topping, J. R., H. Schnerr, J. Haines, M. Scott, M. J. Carter, M. M. Willcocks, K. Bellamy, D. W. Brown, J. J. Gray, C. I. Gallimore, and A. I. Knight. 2009. Temperature inactivation of Feline calicivirus vaccine strain FCV F-9 in comparison with human noroviruses using an RNA exposure assay and reverse transcribed quantitative real-time polymerase chain reaction-A novel method for predicting virus infectivity. *J. Virol. Methods.* 156:89-95.