

**Państwowy Instytut Weterynaryjny
- Państwowy Instytut Badawczy**

PIWet

Zagrożenia wirusologiczne w żywności

Artur Rzeżutka



Puławy, 11 czerwca 2019 r.

1

Historia wirusologii żywności

1728 r. - znaczenie jako „czynnik powodujący chorobę zakaźną”
/zanim Dmitrij Iwanowski odkrył wirusy w 1892 r./

1914 r. - po raz pierwszy opisano wirusy jako „przenoszone z żywnością”

1956 r. - udokumentowana transmisja pokarmowa HAV na człowieka za pośrednictwem małży

1988 r. - największe ognisko infekcji pokarmowej związane z konsumpcją ostryg zanieczyszczonych HAV

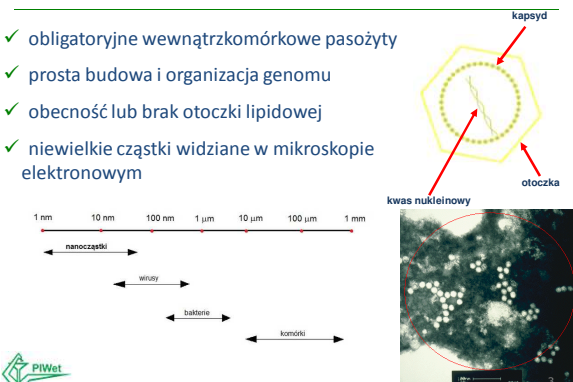
2005 r. - pierwsza krajowa publikacja naukowa nt. możliwości przenoszenia wirusów przez żywność

PIWet

4

Charakterystyka wirusów

- ✓ obligatoryjne wewnątrzkomórkowe pasożyty
- ✓ prosta budowa i organizacja genomu
- ✓ obecność lub brak otoczki lipidowej
- ✓ niewielkie cząstki widziane w mikroskopie elektronowym



1 mm 10 nm 100 nm 1 μm 10 μm 100 μm 1 mm

nanocząstki wirusy bakterie komórki

kapsyd
kwas nukleinowy
otoczka

Autor: prof. N. Cook

PIWet

3

Właściwości wirusów

stabilne w środowisku, odporne na wysychanie

- np. HAV (20 °C, 1 miesiąc)

oporne na działanie niskich i wysokich temperatur

- np. HAV (56 °C, 30 min.)*
- (>85 °C, 1 min.)**
- np. NoV (60 °C, 30 min.)***

oporne na niskie i wysokie pH (3 - 10)†

- np. HAV (pH 1; temp. pok. 5 godz.)
- (pH 1; 38°C, 90 min.)



*Cuthbert. Clin. Microbiol. Rev. 14, 2001; ***Greening, W. Viruses in Foods. 2006
**Nainan i wsp. Clin. Microbiol. Rev. 19, 2006; † Scholz i wsp. J. Gen. Virol. 70, 1989

Zachowanie właściwości zakaźnych HAV w świeżej żywności

koper (4°C, 7 dni) >4 log₁₀

sałata (4°C, 9 dni) <2 log₁₀



Croci i wsp. J. Food. Microbiol. 73, 2002

5

Zachowanie właściwości zakaźnych wirusów w mrożonej żywności

HAV, HRoV

- np. maliny, truskawki (< -22°C; 90 dni*)

MNV-1

- np. cebula, szpinak (< -22°C; 6 miesięcy**)

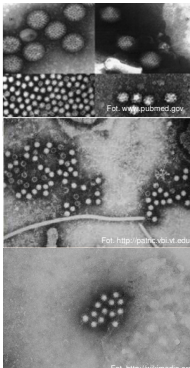


*Butot i wsp. J. Food. Microbiol. 126, 2008
**Baert i wsp. J. Food. Prot. 71, 2008

6

Wirusy przenoszone drogą pokarmową

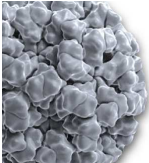
Neotropowe	Enterotropowe
Enterowirusy	Norowirus
Poliowirus	Sapowirus
Parechowirus	Astrowirus
Wirus Nipah	Rotawirus
TBE	Aichiwirus
	Adenowirus
Hepatotropowe	
Wirus zapalenia wątroby typu A	
Wirus zapalenia wątroby typu E	
Pneumotropowe	
Wirus grypy ptaków	
SARS	
MERS	



PIWet

Najczęstsze przyczyny zakażeń pokarmowych w Europie

	2009	2012	2015
1. Salmonella	- 31 %	28,6 %	14,4%
2. Wirusy	- 18,8 %	14,1 %	32,1%
3. Toksyny bakteryjne	- 10,1%	14,5 %	19,2%
4. Campylobacter	- 6 %	9,3 %	3,1%
5.			



The European Union Summary report
Food-borne outbreaks in 2014
Viruses are #1

zrędo: EFSA Community Summary Report, 2009, 2012, 2016

PIWet

Czynniki mające wpływ na występienie zachorowań u ludzi

Stopień zanieczyszczenia środowiska	Właściwości drobnoustroju /zjadliwość/
Jakość sanitarna produktów spożywczych	Wielkość dawki zakaźnej
Przestrzeganie zasad sanitarnych	Wrażliwość/odporność na zakażenie
Edukacja	Sprawność systemu nadzoru /monitoringu żywności

zły ↑ ↓ +
dobry ↓ ↑ -

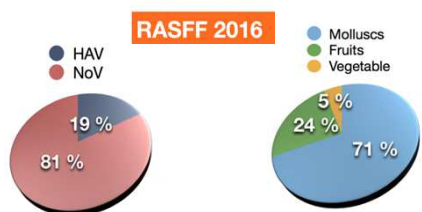
PIWet

Żywność źródłem wirusów

Pochodzenie	Rodzaj	Wirus
roślinne	owoce miękkie warzywa zielone	NoV, HAV, RoV, hAdV, HEV
zwierzęce	mięczaki	NoV, HAV, AiV, AsV, EV, RoV, hAdV, HEV
zwierzęce	mięso dzika, jelenia	HEV
zwierzęce	podroby wieprzowe	HEV



Zagrożenia wirusowe w żywności



Źródła zanieczyszczenia żywności

Etap produkcji pierwotnej

- ✓ zanieczyszczone dłonie
- ✓ woda
- ✓ gleba
- ✓ zwierzęta dziko żyjące



Źródła zanieczyszczenia żywności

Etap przetwórstwa i sprzedaży detalicznej

- ✓ zanieczyszczone dłonie
- ✓ urządzenia i powierzchnie
- ✓ woda



NoV & Epidemiologia zakażeń

- ✓ Szacuje się, że NoV są przyczyną ok. 699 mln zachorowań i 219 000 przypadków śmiertelnych u ludzi na świecie
- ✓ Szczepy GII głównie wykrywane są w przypadkach zakażeń pokarmowych, dominują szczepy GII.4 → GII.17, GII.2

Genogrupa	Liczba genotypów	Genotyp/wariant	Gospodarz
GI	9	GI.1-9; GI.3b	człowiek
GII	19	GII.4a-b GII.1-10; GII.12-17(17); GII.20-22	człowiek, świnia, pies

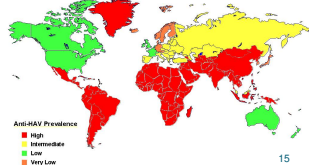
- ✓ Wysoce zakaźne (ID₅₀ 16-1300 kopii genomu)
- ✓ Zakażenia pojawiają się sezonowo, głównie porą zimową
- ✓ Krótko trwająca odporność po zakażeniu



14

HAV & Epidemiologia zakażeń

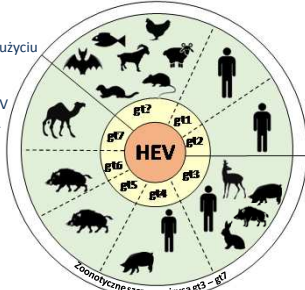
- ✓ Częstość zachorowań na WZW typu A w Europie wynosi od 0,55 – 1,5 przypadków na 100 000 mieszkańców
- ✓ Wysoce zakaźny /10-100 ID₅₀/
- ✓ Jeden serotyp, sześć genotypów, szczepy o subgenotypie IA dominują na świecie
- ✓ Po przechorowaniu nabywa się długotrwałą odporność



15

Hepewirusy - fakty i mity

- > **1978 r.** – pierwsze przypadki zachorowań na wirusowe zapalenie wątroby typu nie-A i nie-B w Indiach
- > **1983 r.** – identyfikacja wirusa przy użyciu mikroskopii elektronicznej
- > **1997 r.** – pierwsza identyfikacja HEV u zwierząt (świnie) w USA
- > **2003 r.** – przypadek transmisji HEV na człowieka po spożyciu żywności pochodzenia zwierzęcego

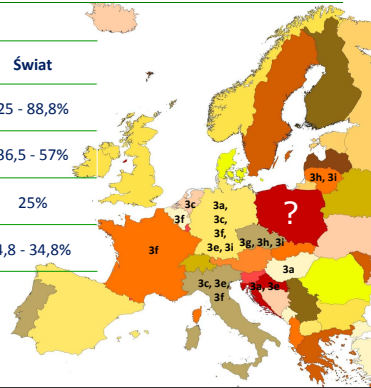


źródło: Syed i wsp., Microb. Path. 2018

16

Seroprewalencja zakażeń HEV u zwierząt

Gatunek	Europa	Świat
	68,6 - 98%	25 - 88,8%
	3,4% (2,2%)	36,5 - 57%
	29,9 - 42,7%	25%
	10,4%	4,8 - 34,8%



Występowanie HEV w łańcuchu żywnościowym

Produkcja pierwotna
/seroprewalencja/
trzoda chlewna: 25 - 98%

Przetwórstwo
/obecność wirusowego RNA/
wątroba: 0,28 - 31,0%
krew: 1,20 - 66,6%

Sprzedaż detaliczna
/obecność wirusowego RNA/
wyroby mięsne: 2,5 - 10%
wyroby podrobowe: 22,2 - 58,3%

Ubój
/obecność wirusowego RNA/
tuczniaki od 22 - 44 tyg: 8%

Źródło: Pavio i wsp., 2010; Di Bartolo i wsp., 2012; Boxman i wsp., 2017; Geng i wsp., 2019; Xao i wsp., 2018; Said i wsp., 2013



HEV w żywności – fakty czy mity

✓ U ludzi notuje się rocznie ok. 20 mln zakażeń, 3 mln przypadków ostrego zapalenia wątroby i 57 000 zgonów*

*Said i wsp. Epidemiol. Infect. 2013

The image shows two news articles. The left one is from BBC News, dated 20 November 2014, with the headline 'One in 10 sausages 'carries risk of hepatitis E virus''. The right one is from ChronicleLive, with the headline 'UK SUPERMARKET MAY HAVE INFECTED THOUSANDS WITH HEPATITIS E VIRUS FROM SAUSAGES'. Both articles include photos of sausages and workers in a kitchen.

19

Żywność pochodzenia zwierzęcego a ryzyko zakażenia HEV

Minimalne kryteria obróbki (UK)*

✓ wyroby z wieprzowiny /wędliny podrobowe/ → 70 °C, 2 min.
/temp. wewnątrz wyrobu/

Metody obróbki cieplnej (przepisy krajowe)

✓ mięso i produkty mięsne → min. 70-80 °C /temp. wewnątrz mięsa/
/pochodzące z obszarów podlegających ograniczeniom, nakazom lub zakazom/

Inaktywacja wirusa

mięso wieprzowe → 71 °C, 20 min. /temp. wewnątrz bloku/



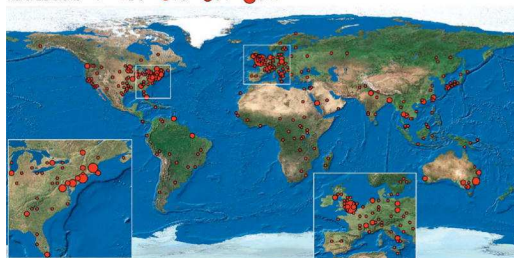
*Said i wsp. Epidemiol. Infect. 2013

20

Pojawianie się nowych chorób zakaźnych u ludzi na świecie (1940-2004)

✓ 60,3% ognisk chorób zakaźnych dotyczyło zoonoz (54,3% zoonozy bakteryjne)

No. of EID events *1 ● 2-3 ● 4-5 ● 6-7 ● 8-11



źródło: Jones i wsp. Nature 2008

21

Wirusowe zoonozy pokarmowe związane ze zwierzętami dziko żyjącymi

<i>Ortomyxoviridae</i>	wirus SARS wirus MERS
<i>Paramyxoviridae</i>	wirus Nipah
<i>Filoviridae</i>	wirus Ebola wirus Marburg



World Health Organization

Global Alert and Response (GAR)

Country activities | Outbreak news | Resources | Media centre

News - [Epidemiological and capacity - Global Alert and Response \(GAR\)](#) + [Outbreaks covered by IHR](#) + [Search using WHO infection](#)

Health topics

Publications

Nipah Virus (NV) Infection

Nipah virus (NV) infection is a newly emerging zoonosis that causes severe disease in both animals and humans. The natural host of the virus are fruit bats of the *Pteropus* family, Pteropus genus.

Alert & Response Operations

NV was first identified during an outbreak of disease that took place in Kampung Sungai Nipah, Malaysia in 1998. On this occasion, pig was the intermediate host; however, subsequent NV outbreaks, there were no intermediate hosts. In Bangladesh in 2004, humans became infected with NV as a result of consuming date palm sap that had been contaminated by infected fruit bats.

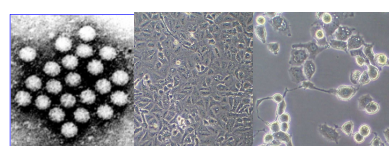
22



Wykrywanie wirusów w żywności

Metody:

- ✓ **Bezpośrednia detekcja**
/mikroskopia elektronowa, hodowle komórkowe, wykrywanie kwasów nukleinowych/
- ✓ **Pośrednia detekcja**
/testy immunofluorescencyjne/



23

Metody wykrywania wirusów w żywności

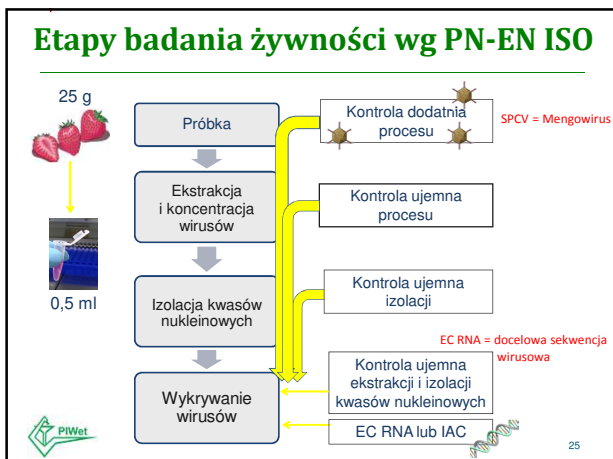
Pochodzenie	Rodzaj	Wirus	Metoda /standard/
roślinne	owoce miękkie, warzywa zielone	NoV, HAV, RoV, HEV	PN-EN ISO 15216-1:2017
zwierzęce	mięsa	NoV, HAV, RoV, HEV, EV	PN-EN ISO 15216-1:2017
	mięso dzika	HEV	
	wyroby wieprzowe, podroby	HEV	brak
	mleko krowie	TBEV	brak

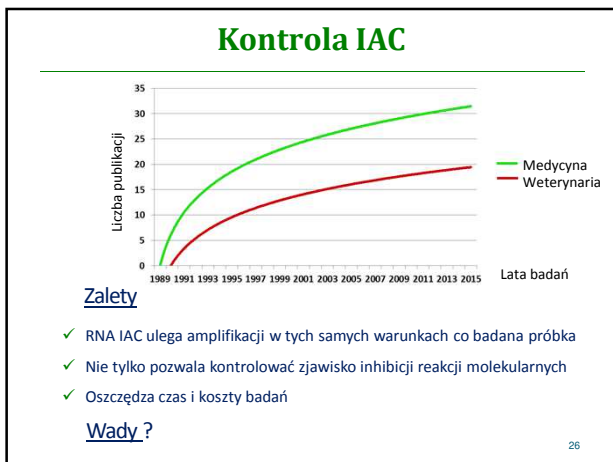
Nie określono zasad pobierania próbek

Microbiology of food and animal feed—Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real time RT-PCR—Part 2: Method for qualitative detection



24





Metoda PN-EN ISO (jakościowa)

<p>Zalety</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Główne czynniki wirusowe i najważniejsze rodzaje żywności zostały uwzględnione ✓ Szczegółowy opis wykonania badania, używanych odczynników i sprzętu ✓ Większe zaufanie do otrzymanych wyników ze względu na szeroki panel stosowanych kontroli i zasad ich interpretacji ✓ Możliwość porównania wyników otrzymanych przez różne laboratoria 	<p>Wady</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Nie uwzględnia badanie żywności przetworzonej ✓ Bardzo rozbudowana metodyka badań ✓ Duża liczba kontroli zwiększa koszt badań ✓ Nie pozwala na odróżnienie zakaźnych i inaktywowanych cząstek wirusa
--	--



27

Co oznacza dodatni wynik?

- ✓ Obecność NoV / HAV RNA w metodzie real-time (RT)PCR wg ISO TS 15216-1/2
- ✓ Obecność sygnału w badaniach molekularnych nie koniecznie może świadczyć o obecności zakaźnych cząstek wirusa

Obecność wirusowego RNA $\stackrel{?}{=}$ obecność zakaźnych wirusów



28

Interpretacja dodatnich wyników badań

- ✓ Interpretacja możliwa tylko w połączeniu z istniejącymi kontrolami używanymi na poszczególnych etapach analizy
- ✓ Rozważyć możliwość potwierdzenia „dodatnich wyników” innym testem molekularnym
- ✓ Obecność wirusowego RNA jednoznacznie nie wskazuje na stopień zagrożenia zdrowia publicznego

Mięczaki zawierające

- < 200 kopii gen. → sporadyczne zachorowania
- > 1000 kopii gen. → częste zachorowania

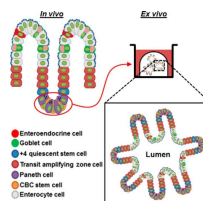


Dore i wsp. Euro Surveillance 2010, 15

29

Nowe metody w badaniach wirusologicznych żywności

- ✓ Hodowle komórek macierzystych jelit
- ✓ Mikromacierze DNA/RNA
- ✓ Sekwencjonowanie nowej generacji (NGS)
- ✓ Ilościowa ocena cząstek wirusów /cyfrowy RT-PCR/



©2016 by American Society for Biochemistry and Molecular Biology



30

Urzędowy (wirusologiczny) monitoring żywności

L 350/44 EN Official Journal of the European Union 20.12.2012

COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) No 1235/2012
of 19 December 2012

28.6.2017 PL Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej L 165/29

(4) In part
Afghani
China
Wietnam
Leone
Vietnam
the em
comple
thereby
level
consigne

ROZPORZĄDZENIE WYKONAWCZE KOMISJI (UE) 2017/1142
z dnia 27 czerwca 2017 r.
zmieniające załącznik I do rozporządzenia (WE) nr 609/2009 w odniesieniu do wykazu paszy i żywności nie pochodzących od zwierząt, podlegających zwiększonemu poziomowi kontroli urzędowych przewozu

(Państwa i żywności) level consigne	0811 20 31; ex 0811 20 11; ex 0811 20 19	10 10	Serbia (RS)	Notowirus	10
Maliny (Żywność - mrożona)					



31

Monitoring wirusologiczny łańcucha produkcyjnego żywności

Rodzaj próbek

	woda	wymazy z dłoni	wymazy z klamek	wymazy z toalet	wymazy z narzędzi	obornik	owoce/warzywa
Etap produkcji	✓	✓	✓	✓			
Etap przetwórstwa	✓	✓			✓		
Sprzedaż detaliczna							✓



32

Występowanie wirusów w łańcuchu produkcyjnym malin

	HEV	HAV	NoV GI	NoV GII
Plantacja				
Woda	0/56	0/56	0/56	2/56
Toaleta	-	0/9	0/9	0/9
Toaleta (klamka)	-	0/10	0/10	0/10
Dłonie	-	0/113		0/113
Przetwórstwo				
Taśma transportowa	0/24	0/24	0/24	0/24
Dłonie	-	0/1	0/1	0/1
Sprzedaż detaliczna				
Maliny (świeże)	0/64	0/60	0/60	0/60
Maliny (mrożone)	1/38	0/39	0/39	0/39



Maunula i wsp. Int. J Food Microbiol. 167, 2013

33

Próbki środowiskowe w badaniach monitoringowych żywności

Osoba zakażona może być siewcą wirusów nawet **przez 8 tyg.** po ustąpieniu objawów zakażenia, natomiast u osób z obniżoną odpornością okres ten może być dłuższy.

Codex Alimentarius Commission

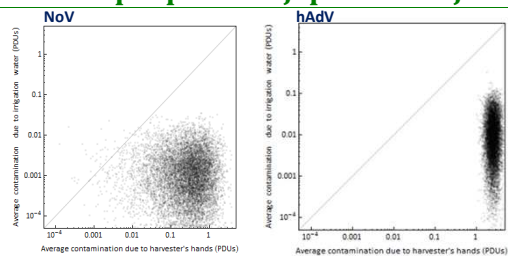
Nawet **46 produktów spożywczych** może zostać zanieczyszczonych w trakcie ich przygotowywania za pośrednictwem dłoni, na których znajduje się co najmniej 3 log₁₀ NoV

Ronqvist, praca doktorska, UH, Finlandia 2015



34

Źródła zanieczyszczenia żywności na etapie produkcji pierwotnej



Quantitative farm-to-fork risk assessment model for norovirus and hepatitis A virus in European leafy green vegetable and berry fruit supply chains
 Maria Korkkila¹, Katharina Verbeke², Antti Bortolotto³, Jenna Kivisaari⁴, Leena Mänttä⁵, Carl Henrik von Bonsdorff⁶, Apostolos Vassilakis⁷, Petros Kokkinos⁸, Taina Penttinen⁹, Sanna Laitinen¹⁰, Jari-Pekka Pöyry¹¹, Petri Vuorikari¹², Kirsi A. Vuolteenaho¹³, Anneli Uusitalo¹⁴, Sanna A. Siitonen¹⁵, Anu Maria de Ruiter-Hermans¹⁶

35



Występowanie wirusów w łańcuchu produkcyjnym warzyw zielonych – etap produkcji pierwotnej

Rodzaj próbki	NoV GI	NoV GII	HAV	hAdV
Woda do nawadniania	1/35	1/25	-	17/61
Dłonie	-	1/101	2/97	34/209

n = 6 gospodarstw



Kokkinos i wsp. Food Env. Virol. 4, 2012

36

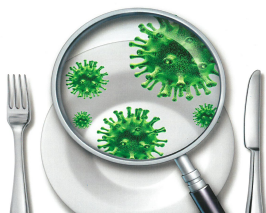
Wnioski

- ✓ wirusy nie namnażają się w żywności, a tylko ją zanieczyszczają
- ✓ żywność zanieczyszczona wirusami nie zmienia swoich właściwości organoleptycznych
- ✓ do zanieczyszczenia żywności wirusami głównie dochodzi na etapie produkcji pierwotnej
- ✓ obecność wirusów oznacza błędy w stosowaniu dobrych praktyk w łańcuchu produkcyjnym żywności, które wymagają podjęcia pilnych działań oraz wprowadzenia rozwiązań systemowych gwarantujących wirusologiczne bezpieczeństwo żywności



37

Dziękuję Państwu za uwagę



38
