

NOROVIRUKSET JA UUDET TEKNOLOGIAT NIIDEN
TORJUNTAAN ELINTARVIKEMATRIISEISSA

Eriksson Sandra
Kandidaatin tutkielma
Ravitsemustiede
Lääketieteen laitos
Terveystieteiden tiedekunta
Itä-Suomen yliopisto
Elokuu 2019

Itä-Suomen yliopisto, Terveystieteiden tiedekunta

Kansanterveystieteen ja kliinisen ravitsemustieteen yksikkö

Ravitsemustiede

ERIKSSON SANDRA E: Norovirukset ja uudet teknologiat niiden torjuntaan elintarvikematriiseissa

Kandidaatin tutkielma, 31 sivua

Ohjaaja: FT Jenni Korhonen

Elokuu 2019

Norovirus, elintarvike, elintarviketurvallisuus, elintarviketeknologia

NOROVIRUKSET JA UUDET TEKNOLOGIAT NIIDEN TORJUNTAAN ELINTARVIKEMATRIISEISSA

Norovirus on Suomessa yleisin akuutteja suolistotulehduksia aiheuttava mikrobi ja globaalisti se aiheuttaa noin viidenneksen kaikista gastroenteriiteistä. Sairaus paranee yleensä itsestään muutamassa päivässä, mutta sairastuneita on vuosittain maailmanlaajuisesti niin paljon, että suorien ja epäsuorien kustannusten arvioidaan olevan noin \$65 miljardia vuodessa. Muun muassa tästä syystä noroviruksen torjuntaan liittyvät tutkimukset ovat erittäin aiheellisia. Noroviruksen infektiivinen annos on hyvin pieni ja sen aiheuttama tauti leviää helposti populaatioissa aiheuttaen laajoja epidemioita. Se esiintyy yleisimmin elintarvikkeissa, joita ei kuumenneta ennen tarjoilua. Tämän kandidaattitutkielman tavoitteena on selvittää, mitä uusia teknologioita on kehitteillä norovirusten torjuntaan elintarvikematriiseissa. Tutkielmassa tarkastellaan neljää eri menetelmää norovirusten torjuntaan elintarvikematriiseissa: korkeapainekäsittelyä, otsonikäsittelyä, säteilyä ja UV-valoon perustuvia menetelmiä, sekä kemiallisia torjuntamenetelmiä. Tutkimustulokset osoittivat selkeästi, että eri norovirusvariantit reagoivat hyvin eri tavoin torjuntayrityksiin. Myös erilaisten elintarvikematriisien välillä oli huomattavia eroja, eli toisin sanoen, siinä missä norovirus tuhoutui kokonaan yhdessä elintarvikkeessa, se pysyi toimintakykyisenä toisessa elintarvikkeessa samaa torjuntamenetelmää käyttäen. Neljästä eri menetelmästä korkeapainekäsittelyllä (HPP) on selkeästi eniten potentiaalia norovirusten torjunnassa. Tutkimusnäyttö on varsin vahvaa HPP-menetelmän soveltuvuudessa ostereiden ja muiden samankaltaisten merenelävien käsittelyyn. Sen sijaan, mansikoiden ja vadelmien käsittelyyn ei tutkimustulosten perusteella vielä löydy luotettavaa torjuntamenetelmää, jolloin ennaltaehkäisyn tärkeys korostuu. Tulevaisuudessa tarvitaan lisää sellaisia tutkimuksia, joissa käytetään ihmisen norovirusta mallintajan sijaan, sekä eri menetelmien yhdistämistä tutkivia asetelmia.

SISÄLTÖ

1.	JOHDANTO.....	4
2.	NOROVIRUSTEN RAKENNE JA OMINAISPIIRTEET	5
3.	NOROVIRUSTEN AIHEUTTAMAT EPIDEMIAAT	7
3.1	Norovirusten aiheuttamat epidemiat Suomessa.....	7
3.2	Norovirusten aiheuttamat epidemiat Euroopassa.....	8
3.3	Norovirusten aiheuttamat epidemiat maailmanlaajuisesti	8
4.	NOROVIRUKSET ELINTARVIKKEISSA	9
5.	NOROVIRUSTEN TORJUNTA ELINTARVIKEMATRIISEISSA	10
5.1	High Pressure Processing (HPP).....	10
5.2	Otsonikäsittely	15
5.3	Säteilyyn ja UV-valoon perustuvat menetelmät	17
5.4	Kemialliset torjuntamenetelmät.....	22
6.	POHDINTA.....	24
7.	JOHTOPÄÄTÖKSET	27
8.	LÄHTEET	28

1. JOHDANTO

Norovirus on Suomessa yleisin akuutteja suolistotulehduksia aiheuttava mikrobi ja globaalisti se aiheuttaa noin viidenneksen kaikista gastroenteriiteistä (Ahmed ym. 2014, THL 2019). Norovirus tuhoutuu keitettäessä, ja siksi se esiintyy yleisimmin elintarvikkeissa, joita ei kuumenneta ennen tarjoilua, kuten marjoissa, hedelmissä, kasviksissa, leikkeleissä, voileivissä, ostereissa jne. (Hallanvuori ja Johansson 2010). Noroviruksen infektiivinen annos on hyvin pieni ja sen aiheuttama tauti leviää helposti populaatioissa aiheuttaen laajoja epidemioita. (Patel ym. 2009). Vaikka sairaus paranee yleensä itsestään muutamassa päivässä, sairastuneita on vuosittain maailmanlaajuisesti niin paljon, että suorien ja epäsuorien kustannusten arvioidaan olevan noin \$65 miljardia vuodessa (Bartsch ym. 2016). Muun muassa tästä syystä norovirusten torjuntaan liittyvät tutkimukset ovat erittäin aiheellisia.

Norovirusten aiheuttamat epidemiat, ja varsinkin pakastevadelmista lähtöisin olevat tartunnat, ovat lisääntyneet Euroopan Unionin alueella viimeisen kymmenen vuoden aikana. Tämän arvellaan johtuvan mm. siitä, että marjojen ja muun raakaruokien suosio on lisääntynyt terveys- ja trenditietoisuuden keskuudessa. Toki myös diagnostiset menetelmät ovat parantuneet samaan aikaan, joten tartunnat saadaan yhä varmemmin luokiteltua tietyn mikrobin aiheuttamaksi. (Tavoschi ym. 2015). Vuonna 2011 Euroopan elintarviketurvallisuusvirasto (European Food Safety Authority, EFSA) suositteli, että elintarviketeollisuus keskittyisi ennaltaehkäisemään norovirusten tarttumista elintarvikkeisiin, sen sijaan, että niitä yritettäisiin tuhota, kun ne ovat jo elintarvikkeissa. EFSA katsoi tuolloin, että täysin luotettavia menetelmiä norovirusten torjuntaan elintarvikematriiseissa ei ole olemassa. (EFSA 2011).

Teknologinen kehitys on kuitenkin nopeaa, joten tämän kandidaattitutkielman tavoitteena on selvittää, mitä uusia teknologioita on kehitteillä norovirusten torjuntaan elintarvikematriiseissa. Selvitys tehdään kirjallisuuskatsauksena, joka perustuu kuluneen vuoden aikana, sekä viitenä sitä edeltävänä vuotena julkaistuihin alkuperäistutkimuksiin (2014-kesäkuu 2019). Alkuperäistutkimuksia etsittiin PubMed, Scopus, Web of Science ja UEF Finna tietokannoista. Työtä rajattiin siten, että mukaan otettiin ainoastaan tutkimuksia, joissa norovirusten torjuntaa tutkittiin elintarvikkeissa, joita yleensä syödään raakana. Tutkielman ulkopuolelle jäivät tosin sanoen tutkimukset, joissa norovirusten torjuntaa tutkittiin pelkästään koeputkessa, pinnoilla, kuumennettavissa elintarvikkeissa, jätevedessä, tai muiden menetelmien avulla, joilla ei voida olettaa olevan käytännön sovellettavuutta elintarviketeollisuudessa. Lähempään tarkasteluun otettiin ainoastaan ne menetelmät, joista löytyi vähintään kolme alkuperäistutkimusta, koska

yksittäisten tutkimusten perusteella on mahdotonta vetää johtopäätöksiä menetelmän toimivuudesta.

2. NOROVIRUSTEN RAKENNE JA OMINAISPIIRTEET

Norovirukset (NoV) kuuluvat kalikivirusten (*Caliciviridae*) perheeseen. Muita kalikiviruksia ovat sapovirus, lagovirus, vesivirus ja nebovirus. Noroviruksen aiheuttama suolistotulehdus kuvattiin oireiden perusteella ”talviseksi oksennustaudiksi” jo vuonna 1929, mutta taudin aiheuttaja saatiin kuvattua elektronimikroskoopilla vasta vuonna 1972. Tällöin tutkijat analysoivat ulostenäytteitä, jotka oli kerätty vuonna 1968 peruskoulussa Norwalkin kaupungissa Yhdysvalloissa vatsatautiepidemian aikana. Löydetty virus nimettiin kaupungin mukaan Norwalk-virukseksi. Tästä viruskannasta polveutuvia kantoja kutsuttiin pitkään Norwalkinkaltaisiksi viruksiksi (Norwalk-like viruses), mutta nykyään käytetään yleisesti nimitystä Norovirus. NoV:en genomi kartoitettiin vuonna 1990, jonka jälkeen tieto sen rakenteesta ja toiminnasta on lisääntynyt voimakkaasti. (Patel ym. 2009).

NoV on +ssRNA vaipaton virus, jonka genomi koostuu noin 7600:sta nukleotidista. Viruksen halkaisija on noin 27-32 nm. NoV:en kapsidi koostuu 90:stä dimeeristä, eli kapsomeerejä on yhteensä 180. Kapsidin pääkomponentti on VP1, joka koostuu kolmesta rakenteellisesta domeenista: sisin, eli kuoriossa (S), keskiosa (P1) ja uloin osa (P2). Kapsidin toinen komponentti, VP2, on pieni perusproteiini, jonka tarkkaa roolia ei täysin tunneta. NoV:n genomi koostuu kolmesta avoimesta lukukehyksestä (open reading frame, ORF) ja sekä 3'-että 5'-päissä on lyhyt UTR-alue (untranslated region). ORF1 koodaa ei-rakenteellisia proteiineja, mukaan lukien RNA-polymeraasia. ORF2 koodaa VP1-proteiinia ja ORF3 VP2-proteiinia. (Eden ym. 2013).

Norovirukset jaetaan seitsemään genoryhmään (GI-GVII). Ihmisiin tarttuvat NoV kuuluvat genoryhmiin I, II ja IV. Muut ovat eläimiä infektoivia, kuten esimerkiksi hiiren NoV (GV) ja lehmän NoV (GIII). Genoryhmät jaetaan edelleen genotyyppeihin, perustuen VP1-proteiinin aminohappojärjestykseen. Genotyyppi merkitään numerolla genoryhmän perään (esim. GII.4). (Pogan ym. 2018). Genotyypin sisäiset variantit nimetään useimmiten sen kaupungin ja vuoden mukaan, jossa kyseinen rekombinantti on ensimmäistä kertaa havaittu (esimerkiksi New Orleans 2009, Sydney 2012) (Vinje 2015). Rekombinaatiot ja mutaatiot ovat hyvin tavallisia noroviruksilla ja tapahtuvat sekä kapsidin proteiinissa, että RNA:ssa. Yli 40 vuoteen ihmisen norovirusta ei pystytty kasvattamaan laboratorio-olosuhteissa, mikä teki tutkimuksista

haasteellisia. Vaihto-ehdoisina kantoina käytetään yleensä hiiren norovirusta (Murine Norovirus, MNV) tai kissan kalikivirusta (Feline Calicivirus, FCV). Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää virusten kaltaisia partikkeleita (Virus-like Particles, VLP), jotka koostuvat vain kapsidista, ilman geneettistä materiaalia. (Pogan ym. 2018). Vuonna 2016 tutkijat onnistuivat ensimmäistä kertaa kasvattamaan ihmisen norovirusia laboratoriossa. Kasvatusalustana käytettiin kantasoluista saatuja enterosyyttejä, jotka toimivat koeputkessa kuten suoliston epiteelikudos. Tutkimuksessa havaittiin, että sappi oli kriittinen komponentti, jota ilman virukset eivät monistuneet. Onnistunut kasvatus laboratoriossa tuo mukanaan uusia mahdollisuuksia tutkia menetelmiä, joiden avulla voitaisiin ehkäistä tai hoitaa norovirustartuntoja. (Ettayebi ym. 2016).

Norovirusilla on monia ominaispiirteitä, joiden ansiosta ne pysyvät toimintakykyisinä ja leviävät helposti populaatioissa. Yhteenvedo näistä ominaispiirteistä on esitetty Taulukossa 1.

Taulukko 1. Norovirusten ominaispiirteitä.

Ominaispiirre	Havainto	Seuraukset
Matala infektiivinen annos	Noin 10-100 virusta	Leviää helposti henkilöltä toiselle, sekä elintarvikkeisiin
Leviää pitkään tartunnan saaneista	2-3 viikkoa, kuukausia immuunipuutteisilla	Virusten leviämistä on vaikea kontrolloida esim. elintarviketeollisuudessa
Kestää monia ympäristöolosuhteita	Kestää 10 ppm klooria, pakastamista ja kuumentamista 30 min 60 asteessa, selviää pH-alueella 2,0-9,0	Viruksesta on vaikea päästä eroon, kun se on päässyt elintarvikkeisiin/veteen tai pinnoille
Muuntautumiskykyinen	Paljon erilaisia geneettisiä ja antigeenisia kantoja ja variantteja	Sairastuneet eivät saa pysyvää immuniteettia, rokotteen kehittäminen vaikeaa, todentaminen laboratoriossa haastavaa (voi johtaa alidiagnosointiin)

Lähteet: Patel ym. 2009, Hallanvujo ja Johansson 2010

Ennen kuin noroviruksen genomi sekvensoitiin 1990-luvulla, ainoa tapa todeta virus oli elektronimikroskopointi, mikä vaatii kalliin laitteiston. Genomin kartoituksen jälkeen käänteiskopiointi-PCR tuli mahdolliseksi. Nykyään käytetään yleensä kvantitatiivista käänteiskopiointi-PCR menetelmää (RT-qPCR), jossa ei tarvita ajoa agarosigeelissä, vaan käytetään fluoresoivia koettimia. Myös erilaisia kaupallisia diagnoosivälineitä on tarjolla, joiden avulla voidaan samaan aikaan seuloa monia eri taudinaiheuttajia. (Vinje 2015).

3. NOROVIRUSTEN AIHEUTTAMAT EPIDEMIA

NoV aiheuttaa kaiken ikäisissä ihmisissä gastroenteriitin, eli suolistotulehduksen. Taudin inkubaatioaika on yleensä 24-48 tuntia, mutta voi olla niin lyhyt kuin 6-8 tuntia, jonka jälkeen tyypilliset oireet, kuten oksentelu ja ripuli, alkavat äkillisesti. Muita oireita ovat vatsan alueen kipu, pahoinvointi, lihassärky ja kuume. Oireet helpottavat yleensä parissa päivässä, mutta voivat kestää kauemmin lapsilla, vanhuksilla ja huonokuntoisilla. Varsinaista lääkettä tai hoitoa ei ole, mutta tarvittaessa voidaan antaa tukihoidoa, kuten esim. nesteytystä. Tartunta leviää eteenpäin ulosteiden ja oksennuksen kautta ja laajat epidemiat ovat tyypillisiä puolisoljetuissa tiloissa, kuten kouluissa, päiväkodeissa, sairaaloissa ja hoitokodeissa, sekä risteilyaluksilla. Kaikki tartunnan saaneet eivät saa oireita, mutta voivat kuitenkin levittää virusta eteenpäin. (Patel ym. 2009, Hallanvuol ja Johansson 2010). Rokotetta ei tällä hetkellä vielä ole olemassa, mutta kaksi valmistetta ovat kliinisissä kokeissa ja useampia muita valmisteita on esiklinisessä vaiheessa (Cortes-Penfield ym. 2017). Seuraavaksi esitetään lyhyt yhteenveto siitä, minkälaisia epidemioita NoV aiheuttaa eri puolilla maailmaa. Tämän yhteydessä on tärkeä muistaa, että vain murto-osa tartunnoista tulee viranomaisten tietoon.

3.1 Norovirusten aiheuttamat epidemiat Suomessa

Suomessa NoV on yksi tavallisimmista elintarvike- ja vesivälitteisten epidemioiden aiheuttajista. Vuonna 2018 tartuntatautirekisteriin rekisteröitiin 2329 NoV tapausta. Sairastuneita oli koko maassa ja kaiken ikäisiä, mutta puolet sairastuneista oli yli 75-vuotiaita. Rekisteröityneet tapaukset vaihtelevat paljon vuodesta toiseen. Vuonna 2016 sairastuneita oli 2395 ja vuonna 2017 3871. Vuonna 2018 ruokamyrkytysrekisteriin ilmoitettiin 100 epidemiaepäilyä, joista 42 koski NoV epäilyä. Analysoitujen näytteiden perusteella Suomessa esiintyi ainakin 10 erilaista NoV genotyyppiä. (THL 2019). Vuonna 2016 selvitettyjen ruokamyrkytysepidemioiden perusteella NoV aiheutti 39 % epidemioista, mutta sairastumisista yli puolet (56 %), mikä kertoo paljon viruksen tarttuvuudesta. Suomessa ruokamyrkytyksen lähde on yleisimmin kodin ulkopuolella (ravintola, kahvila, hotelli, juhlapaikka). Toki tähän tilastoon saattaa vaikuttaa juuri se, että kodin sisäiset tartunnat eivät tule viranomaisten tietoon. Yli puolet sairastumisista ja epidemioista johtuivat puutteellisista keittiörutiineista ja työntekijöiden hygienian laiminlyönneistä, eli ne olisivat olleet ehkäistävässä. (Ruokavirasto 2016).

3.2 Norovirusten aiheuttamat epidemiat Euroopassa

Euroopassa tilanne on Suomeen verrattuna hieman erilainen, koska salmonella on muualla EU:n alueella edelleen yleinen ruokamyrkytysten aiheuttaja. Vuonna 2017 salmonella aiheutti 1241 epidemiaa EU:n jäsenvaltioissa, joihin sairastui 9600 ihmistä. Näistä 23,2 % hoidettiin sairaalassa ja 11 kuoli. Norovirus ja muut kalikivirukset aiheuttivat samana vuonna 211 epidemiaa, joihin sairastui 6550 ihmistä. Näistä vain 2,3 % joutui sairaalaan, joista 2 kuoli. Näistä tilastoista käy hyvin ilmi se, että NoV on hyvin tarttuva, mutta sen aiheuttama sairaus ei yleensä ole kovin vakava. Kaikista EU:n alueella tutkituista elintarvikevälikiteisistä mikrobeista, NoV aiheutti selkeästi eniten tautitapauksia per epidemia (31). EU:n tilastoja tarkasteltaessa on otettava huomioon, että 1909 epidemian taudinaiheuttaja (13179 sairastunutta) jäi tuntemattomaksi tai selvittämättä, joten yllämainitut luvut olisivat ehkä olleet erilaisia, jos kaikkien epidemioiden aiheuttaja olisi saatu selville (EFSA ja ECDC 2018). Toisaalta vuonna 2016, NoV ja muut kalikivirukset olivat myös EU:n alueella eniten sairaustapauksia aiheuttavia mikrobeja (379 epidemiaa, joihin sairastui 11993 ihmistä), kun Salmonella aiheutti 1067 epidemiaa, joihin sairastui 9061 ihmistä. Vuodesta toiseen voi siis olla varsin suuria eroja, mikä johtuu mm. siitä, miten tarkasti taudinaiheuttajat on saatu määriteltyä ja myös siitä, miten hyvin jäsenvaltiot ovat raportoineet tapauksia. (EFSA ja ECDC 2017).

3.3 Norovirusten aiheuttamat epidemiat maailmanlaajuisesti

Maailmanlaajuisesti NoV aiheuttaa lähes viidenneksen (18 %) kaikista akuuteista suolistotulehduksista. Mielenkiintoisesti, NoV on taudinaiheuttajana useammin kehittyneissä (20 %) kuin kehittyvissä (14 %) maissa. Tämän arvellaan johtuvan siitä, että huonon hygienian ja puhtaan veden puutteesta johtuen suolistotulehduksia on kehittyvissä maissa paljon enemmän ja näissä esiintyy paljon myös sellaisia patogeenejä, joita kehittyneissä maissa ei juuri tavata. Tässä tutkimuksessa jätettiin pois sairastuneet, joiden oireina oli oksentelu ilman ripulia, mikä heikentää tulosten luotettavuutta. Jos nämä olisi otettu mukaan, NoV olisi noussut vielä merkittävämmäksi taudinaiheuttajaksi. (Ahmed ym. 2014).

Vuonna 2010 NoV aiheutti WHO:n arvion mukaan 684 miljoonaa sairautta maailmanlaajuisesti, ja oli patogeeneistä se, joka aiheutti eniten tapauksia. NoV aiheutti samana vuonna myös eniten kuolemia. (WHO 2015). Yhdysvalloissa NoV aiheuttaa noin 20 miljoonaa sairastumista ja 570-800 kuolemaa vuosittain, ollen näin tärkein akuutteja suolistotulehduksia aiheuttava patogeeni kaikissa ikäryhmissä (Hall ym. 2013). Erään arvion mukaan, NoV

aiheuttaa vuosittain globaalisti \$4,2 miljardin suoria terveystalouksia ja \$60,3 miljardin epäsuoria kustannuksia. Tuottavuuden menetys arvioitiin olevan 84-99 % kaikista kustannuksista, riippuen maasta. Kustannukset ovat suurimpia yli 55-vuotiaiden joukossa. Arviot kustannuksista saatiin tietokonesimulaation avulla, joten tämä on huomioitava tuloksia tarkasteltaessa. Tutkimus antaa kuitenkin kuvan siitä, miten suurista summista voi olla kysymys, kun myös epäsuorat kustannukset otetaan mukaan, ja osoittaa sekä rokotetutkimukset, että muut NoV tuhoamiseen liittyvät tutkimukset, aiheellisiksi (Bartsch ym. 2016).

4. NOROVIRUKSET ELINTARVIKKEISSA

Norovirus tuhoutuu keittämällä, joten se esiintyy elintarvikkeissa, joita syödään raakana tai ei kuumenneta tarpeeksi kuumaksi tai tarpeeksi kauan. Tyypillisiä elintarvikkeita ja ruokia, joissa NoV esiintyy ovat mm. pakastemarjat (erityisesti vadelmat) ja niistä valmistetut kylmät ruoat, salaattit ja muut tuoreet kasvikset, osterit ja simpukat, voileipäkakut, leikkeleet, buffetruoat, sekä talousvesi ja jääkuutiot. Suomessa tavallisimmat NoV-epidemioiden lähteet ovat olleet itäeurooppalaiset pakastevadelmat ja talousvesi. Tästä syystä Suomessa suositellaan ulkomaisten pakastevadelmien kuumentamista 90 asteessa kahden minuutin ajan. (Hallanvuo ja Johansson 2010). EU:n alueella pakastevadelmat Puolasta, Serbiasta, Kiinasta ja Montenegrosta ovat aiheuttaneet erityisen paljon NoV-epidemioita (Tavoschi ym. 2015).

Norovirustartunnan alkuperä on aina ihmisen uloste, ja elintarvikkeet voivat saastua eri tavoin. Talousvesi voi saastua jätevedellä esimerkiksi tulvimisen, teknisen ongelman tai riittämättömän puhdistuksen takia. Simpukoihin ja ostereihin virus tulee yleensä saastuneen kasvatusveden kautta. Marjoihin, hedelmiin ja vihanneksiin taas virus voi siirtyä saastuneen kasteluveden kautta, tai esimerkiksi poimijan käsistä. Kaikki kylmänä tarjoiltava ruoka voi kontaminoitua noroviruksella, jos elintarviketyöntekijän käsihygienia on riittämätöntä. Kontaminaation ehkäisyyn tulisi kiinnittää huomiota kaikissa tuotannon vaiheissa ja huolehtia siitä, että käytetty vesi on puhdasta, tilat (ml. työntekijöiden taukotilat) ovat siistit ja henkilökunnan käsihygienia riittävää. Sairastuneena ei saa käsitellä elintarvikkeita, mutta koska virus tarttuu vielä pitkään oireiden hävittyäkin, kuten yllä mainittiin, tulee myös riittäviin sairauslomiin ja työtehtävien uudelleenorganisointiin kiinnittää huomiota. (Hallanvuo ja Johansson 2010, Ruokavirasto 2019). Käsien huolellinen pesu saippualla ja puhtaalla vedellä on tärkeää, vaikka työntekijät käyttäisivät hanskoja, koska NoV siirtyy hanskojenkin välityksellä tehokkaasti elintarvikkeisiin (Rönnqvist ym. 2014).

5. NOROVIRUSTEN TORJUNTA ELINTARVIKEMATRIISEISSA

Norovirukset tuhoutuvat kuumennettaessa, kun lämpötila on tarpeeksi korkea. Kuumentamisen ongelmana on, että elintarvikkeen rakenne, maku, väri ja ravitsemukselliset (vitamiinit, entsyymit) ominaisuudet muuttuvat. Kuluttajat kuitenkin haluavat ostaa vähän prosessoitua, lämpökäsittelmätöntä ruokaa, joten kuumentaminen ei useimmiten sovellu norovirusten torjuntamenetelmäksi juuri niissä elintarvikkeissa, joissa viruksia eniten esiintyy. Virusten torjuntaan on siis elintarviketeollisuuden kehitettävä uusia teknologioita, jotka eivät ratkaisevasti muuta elintarvikkeiden ominaisuuksia. (Lou ym. 2015a) Seuraavaksi tarkastellaan neljää eri menetelmää norovirusten torjuntaan elintarvikematriiseissa: korkeapainekäsittelyä, otsonikäsittelyä, säteilyä ja UV-valoon perustuvia menetelmiä, sekä kemiallisia torjuntamenetelmiä. Tutkimuksista esitetään alla vain norovirusiin liittyvät tulokset, vaikka tutkimuksissa olisi tutkittu myös muiden virusten torjuntaa.

5.1 High Pressure Processing (HPP)

Korkeapainekäsittely (high pressure processing, HPP) on menetelmä, jossa elintarviketta altistetaan korkealle paineelle lyhyeksi ajaksi. Elintarvikkeita käsitellään paineen alla yleensä suurissa erissä. Paine saadaan aikaan veden avulla, mutta voidaan myös käyttää öljyä tai alkoholia. HPP:n etuna on, että useimmat elintarvikkeet säilyttävät raat ominaisuutensa käsittelyn jälkeen. Haittapuolena on erityisesti laitteiden korkea hinta, jolloin menetelmä tulee kyseeseen yleensä vain suurten toimijoiden kohdalla. (Kingsley 2013). Yhdeksän tutkimusta, jotka käsitelivät HPP-menetelmää norovirusten torjuntaan elintarvikematriiseissa, täyttivät luvussa 1 esitetyt kriteerit. Taulukossa 2 esitetään yhteenveto näistä tutkimuksista.

Taulukko 2 Tutkimuksia liittyen norovirusten torjuntaan elintarvikkeissa HPP-menetelmällä

Tutkimus	Elintarvikematriisi	Tutkimusasetelma	Tulokset
Hirneisen ym. 2014	Tuore salsa	FCV- ja MNV-kannoilla saastunutta salsaa käsiteltiin 250, 400 ja 500 MPa paineella 1, 5 ja 10 min 9°C lämpötilassa.	FCV tuhoutui täysin 250 MPa paineen alla jo 1 min jälkeen. MNV tuhoutui täysin 400 MPa paineen alla 1 min käsittelyn jälkeen.
Huang ym. 2016	Mansikka, mustikka, vadelma, sekä näistä tehdyt soseet	Marjat ja näistä valmistetut soseet saastutettiin ulostenäytteistä peräisin olevilla ihmisen NoV GI.1 ja GII.4 kannoilla. Näytteet käsiteltiin 200-650 MPa paineella 2 min 0°C lämpötilassa.	2 min käsittely 0°C lämpötilassa ja 550 MPa paineella saavutti halutun virusmäärän vähenemisen mustikoissa ja kaikissa soseissa. Edes 650 MPa paineella ei saavutettu samaa tulosta mansikoiden ja vadelmien kohdalla.
Imamura ym. 2018	Osterit	Tutkimuksessa käytettiin kasvatettuja ostereita, sekä niissä luonnostaan esiintyviä NoV kantoja. Osterit hankittiin erissä (n=60), jotka jaettiin HPP-ryhmään (n=30) ja kontrolliryhmään. Kaikkiaan tutkittiin viittä erää (n=300). HPP-eriä käsiteltiin 400 MPa paineella, 5 min, 10°C.	GI-kannan NoV löytyi vain yhdestä erästä, kun taas GII-kantoja löytyi kaikista eristä. HPP käsittelyn jälkeen NoV-kantoja ei enää todettu.
Lou ym. 2015b	Osterit	Ostereita kontaminoitiin ulosteperäisellä NoV GII.4 genotyypillä ja käsiteltiin 300-450 MPa paineella, 2 min, 0 °C, 25°C ja 35 °C lämpötiloissa. Käsiteltyjä ostereita syötettiin sioille.	Käsittely 0°C lämpötilassa 350 MPa paineella vähensi virusten määrää 3,7 log ₁₀ ja sioilla ei todettu NoV antigeeni ilmentymistä, sekä minimaalisesti viruksia ulosteessa. Käsittely 35°C lämpötilassa vähensi virusten määrää 1 log ₁₀ ja sioilla todettiin NoV antigeeni ilmentymistä sekä enemmän viruksia ulosteessa.
Pan ym. 2016	Mansikkamehu, granaattiomenamehu, mansikkasose	MNV:lla kontaminoituneita mehuja käsiteltiin 300 MPa paineella, 1,5 tai 3 min 10, 20 tai 30°C. Mansikkasosetta käsiteltiin 250-400 MPa paineella 3 min 20°C.	Mehukokeet osoittivat, että viruksia tuhoutui sitä enemmän, mitä matalampi lämpötila oli. Sosekokeet osoittivat, että paineen lisääminen vaikuttaa suotuisasti virusten torjuntaan.
Park ym. 2017	Kaalista valmistettu kimchi	Kimchi kontaminoitiin MNV:lla ja käsiteltiin 100-500 MPa paineella, 5 min, huoneenlämmössä. Kimchin maun muuttumista arvioitiin koehenkilöiden avulla. Kemiaalisia ja rakenteellisia ominaisuuksia tarkasteltiin myös.	Virusten määrä väheni vain hieman 100-300 MPa paineen alla. 400 MPa sai aikaan 1,5-log vähenemisen ja 500 MPa paineen alla virusta ei enää voitu osoittaa näytteissä. Näytteiden pH ja rakenne ei muuttunut merkittävästi. Väri muuttui hieman tummemmaksi. Näytteiden maku oli hyväksyttävällä tasolla.

Park ym. 2019	Meritupet (Halocynthia roretzi)	Sama kuin Park ym. 2017 yllä. Makua ei arvioitu.	Virusten määrä ei vähentynyt ollenkaan 100-400 MPa paineen alla, mutta 500 MPa käsittelyn jälkeen virusta ei enää todettu. Väri ja pH eivät merkittävästi muuttuneet.
Sido ym. 2017	Kevätsipuli, salsa	Kevätsipuli- ja salsanäytteet kontaminoitiin ulosteperäisillä NoV GI.1 ja GII.4 genotyypeillä. Näytteitä käsiteltiin 100-600 MPa paineella, 2 min, 1°C. Tavoitteena oli selvittää mikä painemäärä saa aikaan yli 3-log virusten vähenemisen.	GI.1 oli painekestävämpi molemmissa matriiseissa. 3-log vähenemiseen tarvittiin 600 MPa sipulin ja 500 MPa salsan kohdalla. GII.4 genotyypin torjuntaan tarvitaan 500 MPa sipulin ja 300 MPa salsan kohdalla.
Ye ym. 2015	Osterit	Ostereita kontaminoitiin ulosteperäisellä NoV GI.1 ja GII.4 genotyypeillä ja käsiteltiin 300-600 MPa paineella, 2 min, 0 °C ja 25°C lämpötiloissa. Ostereiden rakennetta ja väriä arvioitiin. Lisäksi koehenkilöt arvioivat ulkonäköä ja rakennetta 5-asteisella asteikolla.	Virusten tuhoutuminen oli tehokkaampaa matalassa lämpötilassa. Yli 4-log väheneminen saavutettiin 0°C lämpötilassa 350 MPa GII.4 genotyypin ja 500 MPa GI.1 genotyypin kohdalla. Käsittely ei muuttanut rakennetta tai väriä merkittävästi. Koehenkilöt antoivat käsitellyille ostereille korkeammat pisteet kuin ei-käsitellyille.

FCV: Feline Calicivirus, MNV: Murine Norovirus, MPa: Megapascal

Vuonna 2014 julkaistussa tutkimuksessa tutkittiin erilaisten virusten torjuntaa HPP-menetelmän avulla viruksilla saastuneessa tuoreessa salsassa. Ihmisen NoV sijaan käytettiin kissan ja hiiren norovirusia (FCV ja MNV). 2 gramman salsanäytteisiin siirrettiin 10^8 TCID₅₀/ml (median tissue culture infectious dose) FCV-virusta ja 10^5 PFU/ml (plaque forming units) MNV-virusta. Näytteet altistettiin paineelle laitteessa, jossa käytettiin vettä paineen aikaansaamiseksi. Painemäärät olivat 250, 400 ja 500 MPa (megapascal), lämpötila 9 °C, ja käsittelyajat 1, 5 ja 10 minuuttia. FCV oli kaikista testatuista viruksista herkin paineelle, ja virusmäärät pienenevät alle mitattavissa olevan rajan kaikilla painemäärillä ja käsittelyajoilla. MNV kesti painetta paremmin ja tarvittiin 400 MPa painetta vähentämään virusta alle mitattavissa olevaan määrään. (Hirneisen ym. 2014).

Huang kollegoineen (2016) tutkivat norovirusten torjuntaa mansikoissa, vadelmissa, mustikoissa ja näistä valmistetuissa soseissa. Marjat ja näistä valmistetut soseet saastutettiin ulostenäytteistä peräisin olevilla ihmisen NoV GI.1 ja GII.4 kannoilla. Mansikkasoseella tehdyn ensimmäisen kokeen perusteella havaittiin, että 0 °C lämpötilassa painekäsittely tehoi parhaiten, joten sitä käytettiin seuraavissa kokeissa. Marjoja ja niistä tehdyt soseet käsiteltiin

eri painemäärällä (200-650 MPa) kahden minuutin ajan. Toivottu virusmäärän väheneminen oli vähintään 3-log ja tähän tulokseen päästiin kaikkien soseiden ja mustikoiden kohdalla 550 MPa painekäsittelyllä kahden minuutin ajan 0 °C lämpötilassa. Mansikoiden ja vadelmien kohdalla toivottuun tulokseen ei päästy edes 650 MPa paineella. Tutkimuksessa havaittiin, että GI.1 kanta on paineenkestävämpi kuin GII.4 kanta kaikissa matriiseissa. Tutkimuksessa testattiin myös mustikoiden ja kolmen marjasoseen ominaisuuksien muutosta painekäsittelyn jälkeen. Koehenkilöt antoivat selvästi korkeampia pisteitä käsittelemättömille mustikoille, joten tutkijoiden mielestä HPP ei ehkä ole soveltuva menetelmä NoV torjuntaan mustikoissa, vaikka virusten määrä vähenikin toivotusti. Soseissa sen sijaan ei havaittu tällaisia sensorisia muutoksia, joten niiden käsittelyyn HPP voi sopia paremmin. (Huang ym. 2016).

Ostereita tutkittaessa käytetään yleensä laboratoriossa kontaminoituneita ostereita, mutta Imamura kollegoineen (2018) käyttivät tutkimuksessaan ostereissa luonnostaan esiintyviä NoV-kantoja. Tutkijat hankkivat ostereita viidessä erässä, joissa jokaisessa oli 60 osteria. Puolet jokaisen erän ostereista jaettiin kontrolliryhmään ja puolet HPP-käsittelyryhmään. Kaiken kaikkiaan ostereita oli siis 300 kpl. GII-genoryhmän norovirukset olivat huomattavasti yleisimpiä ostereissa ja esiintyivät joka erässä, verrattuna GI-genoryhmän viruksiin, joita löydettiin vain yhdestä erästä. HPP -käsittely suoritettiin 400 MPa paineella, viiden minuutin ajan 10 °C lämpötilassa. Käsittelyn jälkeen norovirusta ei enää havaittu yhdestäkään erästä. Tutkijat huomauttivat kuitenkin, että osteriteollisuus käyttää matalampaa painetta (300 MPa) ja korkeampaa lämpötilaa, joten tulokset eivät ole suoraan siirrettävissä käytäntöön. (Imamura ym. 2018).

Myös seuraavassa tutkimuksessa käytettiin ostereita matriisina, mutta tässä tapauksessa osterit kontaminoitiin laboratoriossa. Ennen tätä osterit käsiteltiin HPP-menetelmällä (600 MPa, 5 min, 0 °C), jotta niissä luonnollisesti mahdollisesti esiintyvät virukset ja bakteerit tuhoutuisivat. Osterit jauhettiin tasaiseksi massaksi ja kontaminoitiin ulostenäytteistä saadulla NoV GII.4 genotyypillä. Viruksen määrä oli 10^7 RNA -kopiota/g. Osterimassaa HPP-käsiteltiin 300-450 MPa paineilla, kahden minuutin ajan 0, 25, ja 35 asteen lämpötiloissa. Viruksia tuhoutui enemmän alhaisessa lämpötilassa. Gnotobioottisille sioille syötettiin osterimassaa, jota oli käsitelty 350 MPa paineella 0 °C ja 35 °C lämpötiloissa, koska erot virus-RNA:n määrissä oli näissä näytteissä suurin. Kontrolliryhmälle syötettiin käsittelemättömiä ostereita. Sikojen suolistoa tutkittiin, ja mitattiin virusten määrä ulosteessa, sekä viruksen antigeenien määrä suoliston kudoksissa. Tutkimus osoitti, että 0 °C lämpötilassa käsiteltyjä ostereita syöneillä sioilla oli vähemmän suolistovaurioita, selvästi vähemmän viruksia ulosteessa, ja lisäksi heiltä

puuttui viruksen antigeenejä suoliston kudoksissa, verrattuna muihin ryhmiin. (Lou ym. 2015b).

Pan ym. (2016) halusivat HPP-kokeillaan vahvistaa lämpötilan ja paineen vaikutusta virusten vähenemiseen. Tarkoituksena oli kehittää yhtälö, jonka avulla voidaan ennakoida virusmäärien väheneminen tietyissä lämpötiloissa ja painemäärillä. Elintarvikematriiseiksi valittiin mansikka- ja granaattiomenamehu, sekä mansikkasose. Näytteet kontaminoitiin MNV-kannalla. Mehunäytteitä käsiteltiin 300 MPa paineella, 10, 20 tai 30 °C lämpötiloissa 1,5 tai 3 minuuttia. Tulokset osittivat, että viruksia väheni sitä enemmän, mitä alhaisempi lämpötila oli. Aika vaikutti myös, eli viruksia väheni puolet vähemmän, kun käsittelyaika oli puolet lyhyempi. Mansikkasosekokeet tehtiin 20 °C lämpötilassa erilaisia paineita käyttäen (250-400 MPa) 3 minuutin ajan. Korkeammalla paineella viruksia väheni huomattavasti enemmän (4,5-log PFU) verrattuna alimmalla paineella (0,2-log PFU). Tutkijoiden kehittämän yhtälön mukaan yli 5-log virusten väheneminen voidaan saada aikaan 438 MPa paineella, 20 °C asteen lämpötilassa, kolmen minuutin käsittelyllä sekä mehuissa että soseessa. (Pan ym. 2016).

Kimchi hapankaali on tavallinen NoV tartuntalähde Koreassa ja tutkijat halusivat selvittää HPP-käsittelyn soveltuvuutta NoV torjuntaan tässä elintarvikkeessa. NoV surrogaattina käytettiin MNV-1 virusta. Kontaminoitu kimchi käsiteltiin 100, 200, 300, 400 ja 500 MPa paineen alla, 5 minuuttia huoneenlämmössä. 100-300 MPa paineen alla virusten määrä väheni erittäin maltillisesti, 400 MPa paineen alla enemmän ja 500 MPa paineen käsittelyn jälkeen viruksia ei enää löytynyt. Kimchinäytteiden pH ja rakenne ei merkitsevästi muuttunut, mutta väri muuttui hieman tummemmaksi. 20 koehenkilöä sai lisäksi arvioida käsitellyn kimchin makua, rakennetta, ulkonäköä ja muita aistittavia ominaisuuksia. Arvosteluasteikkona käytettiin 7-arvoista asteikkoa (7 point hedonic test scale). Käsitelty kimchi sai kaikkien ominaisuuksien kohdalla yli 5 pistettä, ja oli siten hyväksyttävällä tasolla, mutta pisteet vähenivät hieman mitä korkeammalla paineella näytteitä oli käsitelty. Muutamit koehenkilöt huomauttivat vastenmielisestä hajusta yli 400 MPa paineella käsitellyissä näytteissä. (Park ym. 2017).

Korealaiset tutkijat toistivat yllä mainitun kokeen, mutta tällä kertaa elintarvikematriisina oli meritupet. Näitä mereneläviä syödään laajasti Koreassa ja Japanissa ja koska ne syödään yleensä raakana, ne ovat potentiaalinen NoV tartuntojen levittäjä. Tutkimusasetelma oli samanlainen kuin yllä, paitsi että makuarviointia ei tehty. Kokeiden tulokset osoittivat, että virusten määrä ei vähentynyt ollenkaan 100-400 MPa paineen alla (5 minuuttia

huoneenlämmössä), mutta virukset tuhoutuivat täysin 500 MPa käsittelyn aikana. Näytteiden pH ja väri eivät muuttuneet merkitsevästi. (Park ym. 2019).

Sido ym. (2017) selvittivät tarvittavaa paineen määrää yli 3-log virusten määrän vähenemiseen kevätsipulissa ja salsassa. Näytteet kontaminoitiin ulosteperäisillä NoV GI.1 ja GII.4 genotyypeillä ja HPP-käsiteltiin 100-600 MPa, 1 °C lämpötilassa, kahden minuutin ajan. Tulokset osoittivat että, GI.1 oli painekestävämpi molemmissa matriiseissa. 3-log vähenemiseen tarvittiin 600 MPa kevätsipulin ja 500 MPa salsan kohdalla. GII.4 genotyypin torjuntaan tarvitaan 500 MPa kevätsipulin ja 300 MPa salsan kohdalla. Tutkijat selvittivät myös lämpötilan, paineen määrän sekä käsittelyajan vaikutusta virusten torjuntaan. Näissä kokeissa MNV toimi ihmisen noroviruksen mallintajana. Tulosten mukaan alhaisempi lämpötila vaikutti suotuisasti virusten vähenemiseen. Lisäksi viruksia väheni sitä enemmän, mitä korkeampi paine oli ja mitä pidempää käsittelyaikaa käytettiin. (Sido ym. 2017).

Ye kollegoineen (2015) tutkivat tarvittavaa paineen määrää yli 4-log virusten määrän vähenemiseen ostereissa. Näytteet kontaminoitiin ulosteperäisillä NoV GI.1 ja GII.4 genotyypeillä ja HPP-käsiteltiin 300-600 MPa, 0 °C ja 25 °C lämpötiloissa, kahden minuutin ajan. Tulokset osoittivat, että viruksia tuhoutui huomattavasti enemmän matalammassa lämpötilassa. Yli 4-log väheneminen saavutettiin 0 °C lämpötilassa 350 MPa GII.4 genotyypin ja 500 MPa GI.1 genotyypin kohdalla. Käsiteltyjen ostereiden rakennetta ja väriä arvioitiin myös, eikä näissä tapahtunut merkittävää muutosta käsittelyn jälkeen. Vapaaehtoisista koehenkilöistä koostuva ryhmä arvioi lisäksi sekä käsiteltyjen, että käsittelemättömien ostereiden ulkonäköä, makua, väriä jne. 5-portaisen asteikon mukaan yhden päivän ja viikon jälkeen käsittelystä. Käsitellyt osterit saivat molempina kertoina korkeampia pisteitä. Tämän arvioitiin johtuvat erityisesti siitä, että niiden rakenne oli parempi, koska HPP-käsittelyn jälkeen ne irtoavat kuorestaan helpommin. Alhaisemmassa lämpötilassa käsitellyt osterit saivat yhden päivän jälkeen hieman huonompia pisteitä verrattuna korkeammassa lämpötilassa käsiteltyihin, mutta viikon jälkeen eroa ei enää ollut. (Ye ym. 2015).

5.2 Otsonikäsittely

Otsonikäsittely on lupaava menetelmä patogeenien torjuntaan, mutta menetelmän tehokkuutta on tutkittu useimmiten bakteereilla ja virusten kohdalla lähinnä vedessä. Virusten torjuntaa otsonilla elintarvikkeissa on tutkittu huomattavasti vähemmän. Otsoni on kolmesta happiatomista koostuva sinertävä, voimakastuoksuinen kaasu. Otsonin teho mikrobien

torjunnassa perustuu sen kykyyn toimia hyvin voimakkaana hapettajana, sekä suureen läpäisevyyteen ja reaktiivisuuteen. Otsoni hajoaa happiatomeiksi, eikä tuota myrkyllisiä sivutuotteita, kuten esim. kloori. (Predmore ym. 2015b). Taulukossa 3 esitetään yhteenveto niistä tutkimuksista, joissa otsonikäsittelyn tehoa on tutkittu elintarvikematriiseissa.

Taulukko 3 Tutkimuksia liittyen norovirusten torjuntaan elintarvikkeissa otsonikäsittelyllä

Tutkimus	Elintarvikematriisi	Tutkimusasetelma	Tulokset
Brié ym. 2018	Vadelma	Vadelmat saastutettiin MNV-1 genotyypillä ja jaettiin tutkimus sekä kontrollieriin. Tutkittavat vadelmat käsiteltiin otsonilla (1-5 ppm) 1-3 minuutin ajan. Vadelmien ulkonäköä verrattiin kontrollieriin 24, 48, ja 72 h kuluttua.	Virusten väheneminen yli 3,3-log ₁₀ saavutettiin otsonilla (3 ppm, 1 min). Edes käsittely 5 ppm otsonilla 3 min. ei muuttanut vadelmien ulkonäköä verrattuna kontrolleihin.
Predmore ym. 2015b	Salaatti ja mansikka	NoV surrogaattina käytettiin MNV-1 ja TV kantoja, joilla salaatti ja mansikat kontaminoitiin. Virusta ruiskutettiin myös mansikoiden sisälle. Näytteet käsiteltiin 6 paino% otsonia 0, 10, 20, 30 ja 40 min. ajan. Käsiteltyjen näytteiden ulkonäköä ja rakennetta verrattiin ei-käsiteltyihin.	MNV-1 kesti otsonikäsittelyä huomattavasti paremmin kuin TV. Virusten määrän väheneminen oli tilastollisesti merkitsevää molemmissa matriiseissa. Mansikoiden pinnalta tuhoutui 40 min. jälkeen enemmän viruksia (3,3-log) verrattuna sisäosaan (1,5-log). TV tuhoutui täysin pinnalta 40 min. käsittelyn jälkeen. Väri ja rakenne muuttuivat sitä enemmän, mitä pidempään näytteitä käsiteltiin.
Wang ym. 2015	Alfalfasiemenet	Steriloidut alfalfasiemenet kontaminoitiin kolmella eri kalikiviruksella (MNV, TV, sekä NoV GII). Näytteet käsiteltiin steriiliin veteen liuotetulla otsonilla (6,25 ppm) 22 °C 0,5, 1, 5, 15 tai 30 min.	TV oli resistentimpi kuin MNV. MNV määrä väheni jo 0,5 min jälkeen yli 4-log PFU. TV määrä väheni 3,83-log PFU 30 min käsittelyn jälkeen. PFU määriä ei laskettu NoV GII näytteistä, vaan mitattiin genomikopioiden määrä, mikä väheni maltillisesti kaikkien virusten kohdalla (1-2-log/g).

MNV: Murine Norovirus, NoV: norovirus, TV: Tulane virus

Brié ym. (2018) tutkivat otsonikäsittelyn vaikutusta hiiren norovirukseen (MNV-1). Paikallisesta kaupasta hankitut vadelmat saastutettiin viruksella ja jaettiin tutkimus sekä kontrollieriin. Tutkittavat vadelmat käsiteltiin otsonilla eri vahvuuksilla (1-5 ppm) 1-3 minuutin ajan. Virusten väheneminen yli 3,3-log₁₀ saavutettiin vahvuudella 3 ppm yhden minuutin käsittelyllä. Virusta ei ollut enää havaittavissa, kun käsittely tehtiin vahvuudella 4 ppm kahden minuutin käsittelyllä. Vadelmat säilytettiin 4 °C lämpötilassa ja niiden ulkonäköä verrattiin kontrollieriin 24, 48, ja 72 tunnin kuluttua. Vadelmien ulkonäössä ei havaittu olevan eroja. Edes

käsittely 5 ppm otsonilla 3 minuutin ajan ei muuttanut vadelmien ulkonäköä verrattuna kontrolleihin. (Brié ym. 2018).

Predmore kollegoineen (2015a) osoittivat tutkimuksissaan otsonikäsittelyn tehoavan hiiren norovirukseen (MNV-1) ja tulane virukseen (TV). Elintarvikematriiseina käytettiin mansikoita ja salaattia, jotka kontaminoitiin edellä mainituilla viruksilla. Viruksia siirrettiin myös mansikoiden sisään neulalla ruiskuttamalla. Näytteet käsiteltiin 6 paino% otsonia 0, 10, 20, 30 ja 40 min. ajan. Käsiteltyjen näytteiden ulkonäköä ja rakennetta tutkittiin myös. Tulokset osoittivat, että MNV-1 kestää otsonikäsittelyä huomattavasti paremmin kuin TV elintarvikkeissa. Virusten määrän väheneminen oli tilastollisesti merkitsevää molemmissa matriiseissa. Mansikoiden pinnalta tuhoutui 40 min. jälkeen enemmän viruksia (3,3-log) verrattuna sisäosaan (1,5-log). TV tuhoutui täysin pinnalta 40 min. käsittelyn jälkeen. Näytteiden väri ja rakenne muuttuivat tilastollisesti merkitsevästi ja muutos oli sitä suurempi, mitä pidempään näytteitä käsiteltiin. Saman tutkimuksen yhteydessä tutkijat osoittivat myös, että otsonin vaikutusmekanismi perustuu sen kapsidin rakennetta tuhoavaan ominaisuuteen. (Predmore ym. 2015b).

Wang ym. (2015) käyttivät tutkimuksessaan alfalfasiemeniä matriisina, koska idut ovat aiheuttaneet Yhdysvalloissa laajoja epidemioita. Steriloidut alfalfasiemenet kontaminoitiin kolmella eri kalikiviruksella (MNV, TV, sekä NoV GII). Näytteet käsiteltiin steriiliin veteen liuotetulla otsonilla (6,25 ppm) 22 °C 0,5, 1, 5, 15 tai 30 min. MNV ja TV kantojen kohdalla laskettiin käsittelyn jälkeen PFU (plague forming units) määrät, mutta tätä ei laskettu NoV GII kohdalla. Kaikista viruksista laskettiin genomikopioiden määrä. Tulokset osoittivat, että TV oli resistentimpi kuin MNV. MNV määrä väheni jo 0,5 minuutin jälkeen yli 4-log PFU. TV määrä väheni ainoastaan 1,66-log PFU 0,5 minuutin käsittelyn jälkeen ja 3,83-log PFU 30 minuutin käsittelyn jälkeen. Genomikopioiden määrä väheni maltillisesti kaikkien virusten kodalla. (Wang ym. 2015).

5.3 Säteilyyn ja UV-valoon perustuvat menetelmät

UV-C valoa käytetään teollisesti veden, pintojen ja elintarvikkeiden puhdistamiseen. Menetelmän etuina ovat mm. matalat kustannukset ja käsiteltyjen tuotteiden värin ja pH:n muuttumattomuus. Haittapuolena on erityisesti se, että UV-C valo voi edistää rasvojen hapettumista, jolloin elintarvikkeissa voidaan havaita epämiellyttävää makua. Lisäksi fruktoosi hajoo UV-C käsittelyn aikana furaaniksi, joka on karsinogeeni. (Butot ym. 2018). Säteilyä

(gammasäteily, elektronisuihkusäteily, röntgensäteily) käytetään elintarvikkeiden desinfiointiin erityisesti silloin, jos elintarvikkeet ovat olleet kontaktissa saastuneen veden kanssa ja tästä syystä sisältävät imeytyneitä mikrobeja, koska säteily läpäisee koko tuotteen ja voi siis tuhota mikrobeja myös sisältäpäin. Eri säteilymenetelmät pääsevät kuitenkin eri syvyyksille. Elektronisuihkusäteily eroaa muista säteilymenetelmistä sen suhteen, että siinä ei käytetä radioaktiivisia isotooppeja ja käsittelyaika on myös lyhyempi. (DiCaprio ym. 2016). Taulukossa 4 esitetään yhteenveto niistä tutkimuksista, joissa säteilyä tai UV-valoa on käytetty menetelmänä NoV torjumiseen elintarvikkeissa.

Taulukko 4 Tutkimuksia liittyen norovirusten torjuntaan elintarvikkeissa säteilyllä ja UV-valolla

Tutkimus	Elintarvikematriisi	Tutkimusasetelma	Tulokset
Butot ym. 2018	Mansikka, vadelma, mustikka	Marjat saastutettiin MNV S99 kannalla ja altistettiin UV-C valolle 20, 60, 120 s tai 9 min. Virusten torjunnan lisäksi mitattiin furaanin määrän muodostumista sekä marjojen aistittavia ominaisuuksia.	Furaania ei muodostunut edes 9 min käsittelyn aikana. Marjojen maku ja ulkonäkö eivät merkitsevästi muuttuneet lyhyiden käsittelyjen aikana. MNV määrät vähenivät eniten tuoreissa mustikoissa, mutta ei ollut riittävää minkään marjan kohdalla ja käsittelyaika ei vaikuttanut tuloksiin.
DiCaprio ym. 2016	Mansikka	Mansikat kontaminoitiin TV ja NoV GII.4 kannoilla. Näytteet altistettiin elektronisuihkusäteilylle 4,7, 9,8, 12,2, 16,3, ja 28,7 kGy.	Molempien viruskantojen kohdalla tarvittiin 28,7 kGy säteilyannos ennen kuin virus tuhoutui. Tämä on monikertainen määrä siihen nähden mitä elintarvikkeissa on sallittua käyttää.
Kingsley ym. 2018	Mustikka	NoV surrogaattina käytettiin TV:sta. Tuoreet mustikat saastutettiin viruksilla ja käsiteltiin 405 nm sinisellä valolla 0,5,15 ja 30 min. Lisäksi suoritettiin koe, jossa käytettiin 60 kpl 30 s sykäystä.	Virusten määrä väheni erittäin maltillisesti molemmilla menetelmillä. Sininen valo ei sovellu yksinään NoV torjuntaan marjoissa.
Liu ym. 2015	Mustikka	Mustikat kontaminoitiin MNV-1 kannalla ja altistettiin joko kuivalle UV-valolle tai vesiavusteiselle UV-valolle 1-5 min ajan. Kontrolliryhmän marjat pestiin joko pelkällä vedellä tai klooria sisältävällä vedellä (10 ppm) 1-5 min.	Virusten määrä väheni alle mittausrajan vesiavusteisella UV-käsittelyllä 2 min ajan ja oli sama kuin kloorikäsittelyllä. Kuiva UV-käsittely ei yltänyt samalle tasolle. Pelkkä vesihuuhdeltu ei merkitsevästi vähentänyt virusten määrää.

Park ym. 2016	Merilevä (Capsosiphon fulvescens ja Hizikia fusiforme)	Merilevänäytteet kontaminoitiin MNV-1 kannalla ja altistettiin gammasäteilylle 0, 3, 5, 5, 10 kGy. Näytteiden värin ja aistittavien ominaisuuksien muuttumista tutkittiin myös.	Virusten määrä väheni sitä enemmän, mitä korkeampi säteily annos oli. 10 kGy säteily sai aikaan 2,46-log ₁₀ (fulvescens) ja 2,21-log ₁₀ (fusiforme) vähenemisen. Yli 3-log ₁₀ vähenemistä ei saavutettu. Näytteiden väri ja maku ei merkitsevästi muuttuneet.
Park ja Ha 2017	Kaalista valmistettu kimchi	Kimchinäytteet kontaminoitiin MNV-1 kannalla ja altistettiin gammasäteilylle 0, 1, 3, 5, 5, 10 kGy. Näytteiden pH ja happamuus mitattiin käsittelyn jälkeen.	Virusten määrä väheni sitä enemmän, mitä korkeampi säteilyannos oli. Maksimiannos sai aikaan 1,76-log ₁₀ vähenemisen. Näytteiden pH ja happamuus ei merkitsevästi muuttuneet.
Pimenta ym. 2019	Vadelma, mansikka	Marjat saastutettiin MNV-1 kannalla ja altistettiin gammasäteilylle 0,9-7,6 kGy.	4 kGy säteilyannos vähensi virusten määrää molemmissa marjoissa noin 2-log. 7 kGy säteily tuhosi viruksia yli 3-log, mutta näin korkea annos vaikuttaisi negatiivisesti marjojen laatuun.
Predmore ym. 2015a	Mansikka, salaatti	Näytteet saastutettiin viruksilla (TV) ja altistettiin elektronisuihkusäteilylle 0, 4, 8, 16, 24, 30 kGy. Näytteiden väriä ja rakennetta arvioitiin.	Virusten määrä väheni alle havaittavissa olevan rajan säteilyannoksella 8,7 kGy salaatisissa ja 16,3 kGy mansikoissa. Korkein sallittu säteily määrä (4 kGy) sai aikaan vain maltillisen vähenemisen (1,3-1,4-log). Näytteiden väri ja rakenne muuttuivat merkitsevästi suuremmilla säteilyannoksilla.

MNV: Murine Norovirus, NoV: norovirus, TV: Tulane virus

Butot ym. (2018) tutkivat NoV torjuntaa UV-C valolla tuoreiden ja pakastettujen mansikoiden kohdalla. Tutkimus oli kolmiosainen, jossa virusten torjunnan lisäksi tutkittiin furaanin mahdollista muodostumista käsiteltyihin marjoihin, sekä marjojen aistittavia ominaisuuksia. Marjat saastutettiin MNV S99 kannalla ja altistettiin UV-C valolle 20, 60, 120 s tai 9 min. Pisintä käsittelyaikaa käytettiin ainoastaan furaanin muodostumisen ja aistillisten ominaisuuksien tutkimiseen. Tulokset osoittivat että, furaania ei muodostunut edes 9 min käsittelyn aikana. Marjojen maku ja ulkonäkö eivät merkitsevästi muuttuneet lyhyiden käsittelyjen aikana, mutta pakastettuihin mansikoihin, joita oli käsitelty pitkään (9 min.) tuli epämiellyttävä sivumaku. MNV määrät vähenivät eniten tuoreissa mustikoissa (2-3-log₁₀), verrattuna punaisiin marjoihin (alle 2- log₁₀), mutta ei ollut riittävää minkään marjan kohdalla. Tutkijat totesivat, että UV-C valo ei yksinään ole riittävä menetelmä virusten torjuntaan tuoreissa ja pakastetuissa marjoissa. (Butot ym. 2018).

DiCaprio kollegoineen (2016) selvittivät tarvittavaa elektronisuihkusäteilyn määrää, jotta NoV GII.4 ja TV tuhoutuivat saastuneissa mansikoissa. Kokonaiset mansikat kontaminoitiin viruksilla ja altistettiin elektronisuihkusäteilylle. Säteilyn määrä oli 4,7, 9,8, 12,2, 16,3, ja 28,7 kGy. Tulokset osoittivat, että molemmat virukset olivat erittäin vastustuskykyisiä säteilylle. Tarvittiin korkein testissä käytetty säteily määrä (28,7 kGy) ennen kuin virukset tuhoutuivat kokonaan. Koska sallittu säteily määrä hedelmille Yhdysvalloissa on 3,0 kGy, menetelmä ei sovellu näiden elintarvikkeiden NoV torjuntaan. (DiCaprio ym. 2016).

Sininen valo soveltuu varsin hyvin bakteerien torjuntaan, mutta virusten torjunnasta tällä menetelmällä tiedetään hyvin vähän. Kingsley ym. (2018) selvittivät menetelmän soveltuvuutta TV:en torjuntaan saastutetuissa mustikoissa. Näytteet käsiteltiin 405 nm sinisellä valolla 0,5, 15 ja 30 min. Jotta lämpötila ei nousisi liian korkeaksi käytettiin kuivajäätä näytteiden alla. Lisäksi suoritettiin koe, jossa käytettiin 60 kpl 30 sekunnin valosykäystä ilman kuivajäätä. Kaikissa kokeissa virusten määrä väheni hyvin maltillisesti (0,02-0,18-log) tai jopa lisääntyi 30 minuutin käsittelyssä. Yksinään sininen valo ei siis ole riittävä torjuntamenetelmä noroviruksella saastuneissa marjoissa. (Kingsley ym. 2018).

Liu ym. (2015) selvittivät eroja kuivan UV-valon ja vesiavusteisen UV-valon välillä NoV torjunnassa mustikoissa. Mustikat kontaminoitiin MNV-1 kannalla ja altistettiin joko kuivalle UV-valolle tai vesiavusteiselle UV-valolle 1-5 min ajan. UV-valon aaltopituus oli 254 nm. Vesiavusteisessa kokeessa vettä sekoitettiin koko ajan voimakkaasti, jotta marjat pyörisivät vapaasti vedessä. Kontrolliryhmän marjat pestiin joko pelkällä vedellä tai klooria sisältävällä vedellä (10 ppm) 1-5 min. Tulokset osoittivat, että virusten määrä väheni alle mittausrajan vesiavusteisella UV-käsittelyllä 2 min ajan ja oli sama kuin kloorikäsittelyllä. Kuiva UV-käsittely ei yltänyt samalle tasolle (2,48-log väheneminen). Pelkkä vesihuuhtelu ei merkitsevästi vähentänyt virusten määrää. Koska vesiavusteisella UV-käsittelyllä päästiin samoihin tuloksiin kuin kloorikäsittelyllä, se voisi korvata kloorin käytön mustikoiden, ja mahdollisesti muiden marjojen, käsittelyssä säästämällä sekä vettä (koska kloori jäämiä ei tarvitse huuhtoa pois) että pienentämällä käytettyjen kemikaalien ja niiden sivutuotteiden määrää. (Liu ym. 2015).

Merilevät ovat Aasiassa tavallisia elintarvikkeita, varsinkin talvisin kuin tuoreita kasviksia on vähemmän saatavilla. Merilevät syödään usein raakana, jolloin ne ovat potentiaalinen NoV tartuntojen lähde. Park ym. (2016) tutkivat mahdollisuutta tuhota NoV:ia gammasäteilyn

avulla. Merilevänäytteet (*Capsosiphon fulvescens* ja *Hizikia fusiforme*) kontaminoitiin MNV-1 kannalla ja altistettiin gammasäteilylle 0, 3, 5, 5, 10 kGy. Näytteiden värin muuttumista tutkittiin Hunter testin ja aistittavien ominaisuuksien muuttumista koehenkilöiden avulla. Virusten määrä väheni sitä enemmän, mitä korkeampi säteily annos oli. 10 kGy säteily sai aikaan $2,46\text{-log}_{10}$ (*fulvescens*) ja $2,21\text{-log}_{10}$ (*fusiforme*) vähenemisen. Yli 3-log_{10} vähenemistä ei kuitenkaan saavutettu, joten tutkijoiden johtopäätös oli, että gammasäteilyä voisi mahdollisesti käyttää jonkin toisen menetelmän rinnalla. Näytteiden väri ja maku ei merkittävästi muuttuneet. (Park ym. 2016).

Park ja Ha (2017) selvittivät gammasäteilyn tehokkuutta NoV torjuntaan kimchi hapankaalissa. Kimchinäytteet kontaminoitiin MNV-1 kannalla ja altistettiin gammasäteilylle 0, 1, 3, 5, 5, 10 kGy. Näytteiden pH ja happamuus mitattiin käsittelyn jälkeen. Tulokset osoittivat että, virusten määrä väheni sitä enemmän, mitä korkeampi säteilyannos oli. Maksimiannos sai aikaan $1,76\text{-log}_{10}$ vähenemisen. Näytteiden pH ja happamuus ei merkittävästi muuttuneet. (Park ja Ha 2017).

Pimenta ym. (2019) tutkivat gammasäteilyn vaikutusta MNV-1 kannalla saastutettuihin vadelmiin ja mansikoihin. Marjat altistettiin gammasäteilylle 0,9-7,6 kGy. 4 kGy säteilyannos vähensi virusten määrää molemmissa marjoissa noin 2-log PFU/g. 7 kGy säteily tuhosi viruksia yli 3-log PFU/g, mutta näin korkea annos vaikuttaisi negatiivisesti marjojen laatuun, joten käytännössä tätä ei voisi käyttää marjojen käsittelyssä. Tutkijat toteavat sen sijaan, että korkeampia säteilyannoksia voitaisiin käyttää kasteluveden käsittelyyn, jolloin marjat eivät kontaminoituisi viruksilla ainakaan tätä reittiä. (Pimenta ym. 2019).

Predmore ym. (2015b) selvittivät mahdollisuutta torjua viruksia elektronisuihkusäteilyllä saastuneissa mansikoissa ja salaatissa. Näytteet saastutettiin viruksilla (TV) ja altistettiin elektronisuihkusäteilylle 0, 4, 8, 16, 24, 30 kGy. Näytteiden väriä ja rakennetta arvioitiin myös. Tulokset osoittivat, että virusten totaaliseen tuhoamiseen tarvittiin korkeita säteilyannoksia; 8,7 kGy salaatissa ja 16,3 kGy mansikoissa. Korkein sallittu säteily määrä (4 kGy) sai aikaan vain maltillisen vähenemisen ($1,3\text{-}1,4\text{-log}$) molemmissa matriiseissa. Näytteiden väri ja rakenne muuttuivat merkittävästi suuremmilla säteilyannoksilla. Mansikat muuttuivat vaaleammiksi ja pehmeämmiksi ja salaatti muuttui tummemmaksi (salaatin rakennetta ei tutkittu). Koska väri ja rakenne muuttui korkeilla säteilyannoksilla selkeästi ja alhaisempi säteilyannos ei tuhonnut tarpeeksi paljon viruksia, menetelmä ei sovellu yksinään NoV torjuntaan mansikoissa ja salaatissa. (Predmore ym. 2015a).

5.4 Kemialliset torjuntamenetelmät

Monet tuoreita elintarvikkeita prosessoivat tahot käyttävät hapettavia kemikaaleja mikrobien torjuntaan elintarvikkeiden huuhtelun yhteydessä. Käytetyin kemikaali on kloori, mutta sen tehoa norovirusilla saastuneiden elintarvikkeiden puhdistamiseen on tutkittu yllättävän vähän. Elintarviketeollisuus käyttää klooria yleensä 50-200 mg/l. Kloorin ongelmana pidetään usein sitä, että sen teho vähenee, jos huuhteluvedessä on jäämiä orgaanisesta aineesta. Tällaista vapautuu mm., kun vihanneksia pilkotaan ennen huuhtelua. (Dunkin ym. 2017). Alla olevassa taulukossa esitetään yhteenveto niistä tutkimuksista, joissa kemiallisia torjuntamenetelmiä on käytetty norovirusten torjuntaan elintarvikematriiseissa.

Taulukko 5 Tutkimuksia liittyen norovirusten torjuntaan elintarvikkeissa kemiallisin menetelmin

Tutkimus	Elintarvikematriisi	Tutkimusasetelma	Tulokset
Dunkin ym. 2017	Rooman salaatti, jäävuorisalaatti	Salaattien huuhteluvettä kerättiin teollisuudesta ja saastutettiin NoV G1.3 ja GII.2 kannoilla. Näytteet käsiteltiin kloorilla ja mitattiin CT-arvo.	GII kanta kesti klooria huomattavasti paremmin kuin G1 kanta. Torjunta onnistui paremmin kokonaisessa salaatisa verrattuna pilkottuun. Jäävuorisalaatista ei saatu yli 3-log vähenemistä millään annoksella.
Girard ym. 2016	Mustikka, vadelma, salaatti	Marjat ja salaatti kontaminoitiin MNV-3 kannalla. Näytteet upotettiin 10-15 ml desinfiointiaineeseen minuutiksi ilman sekoittamista. Testatut aineet olivat natriumhypokloriitti 50 ppm, klooridixidi 20 ppm ja peretikkahappo 85 ppm. Testi suoritettiin sekä orgaanisen aineen läsnä ollessa että ilman.	Klooridixidi oli tehoton (virusten väheneminen alle 1-log) kaikissa matriiseissa. Natriumhypokloriitti toimi yllättäen paremmin orgaanisen aineen läsnä ollessa, jolloin saavutettiin lähes 5-log väheneminen salaatisa ja mustikoissa ja 3-log vadelmissa. Orgaaninen aines paransi myös peretikkahapon tehoa salaatisa.
Maks ym. 2019	Vadelma	Vadelmat kontaminoitiin MNV kannalla ja ruiskutettiin liukuhihnalla natriumhypokloriitilla (50 ppm) tai peretikkahapolla (80 ppm).	Natriumhypokloriittikäsittely vähensi virusten määrää 0,2-log ja peretikkahappo 0,3-log.
Zhou ym. 2017	Mansikka	Marjat saastutettiin MNV-1 kannalla ja käsiteltiin kolmella eri desinfiointiaineella: 0,5 % LVA + 0,5 % SDS, 5 % LVA + 2 % SDS, natriumhypokloriitti 50 ppm.	Mikään desinfiointiaineista ei saavuttanut yli 1,5-log vähenemistä. Pelkkä vesipesu oli yhtä tehokasta kuin desinfiointiaineiden käyttö. Tutkituista mikrobeista MNV oli desinfiointiaineille vastustuskykyisin.

CT: concentration-time, MNV: murine norovirus, LVA: levuliinihappo, SDS: natriumlauryylisulfaatti

Dunkin kollegoineen (2017) tutkivat kloorin tehokkuutta norovirusten torjuntaan eri salaattien huuhteluvvedessä. Tutkimuksessa käytettiin kokonaista ja pilkottua Rooman salaattia, sekä pilkottua jäävuorisalaattia. Salaattien huuhteluvettä kerättiin teollisuudesta ja saastutettiin NoV G1.3 ja GII.2 kannoilla (myös MNV ja MS2 kantoja tutkittiin, mutta näitä tuloksia ei tässä yhteydessä erikseen mainita). Näytteet käsiteltiin kloorilla ja mitattiin CT-arvo. GII kanta kesti klooria huomattavasti paremmin kuin G1 kanta. Torjunta onnistui paremmin kokonaisessa salaatissa verrattuna pilkottuun. Tämän arveltiin johtuvan siitä, että pilkotusta salaatista vuotaa orgaanista ainesta, joka sitoo klooria. Jäävuorisalaatista ei saatu yli 3-log vähenemistä millään annoksella. (Dunkin ym. 2017).

Girard ym. (2016) tutkivat kolmen hapettavan aineen vaikutusta MNV-3 kannalla saastutettuihin mustikoihin, mansikoihin ja salaattiin. Hapettavat aineet olivat natriumhypokloriitti 50 ppm, klooridiodidi 20 ppm ja peretikkahappo 85 ppm. Kokeet suoritettiin sekä orgaanisen aineen (Feclone) läsnä ollessa, että ilman. Tulokset osoittivat, että klooridiodidi oli tehoton (virusten väheneminen alle 1-log) kaikissa matriiseissa. Natriumhypokloriitti toimi yllättäen paremmin orgaanisen aineen läsnä ollessa, jolloin saavutettiin lähes 5-log väheneminen salaatissa ja mustikoissa ja 3-log mansikoissa. Ilman orgaanista ainesta natriumhypokloriitti oli tehoton salaatin ja mansikoiden kohdalla, mutta mustikoissa saavutettiin 2,5-log virusten väheneminen. Orgaaninen aines paransi myös peretikkahapon tehoa salaatissa, jolloin saavutettiin yli 4-log virusten väheneminen. Tutkijoiden mielestä tarvitaan kuitenkin lisää tutkimuksia, koska Feclone ei ehkä ole paras mahdollinen mallintaja oikeissa tilanteissa esiintyvälle orgaaniselle ainekselle. (Girard ym. 2016).

Maks ym. (2019) tutkivat ruiskutettavien hapettavien aineiden vaikutusta hiiren noroviruksella saastuneisiin vadelmiin. Klooriruiskutus on yleisesti käytetty mikrobien hallintamenetelmä marjateollisuudessa, mutta sen tehokkuutta ei ole juuri tutkittu. Tässä tutkimuksessa simuloitiin teollisuudessa käytettyä liukuhihnaruiskutusta, jonka aikana saastuneet marjat käsiteltiin natriumhypokloriitilla (50 ppm) tai peretikkahapolla (80 ppm). Tulokset osoittivat, että virusten määrä väheni erittäin maltillisesti molemmilla aineilla (0,2-0,3-log). Tutkijat arvelivat tämän johtuvan siitä, että marjat pysyivät staattisina käsittelyn aikana, jolloin hapettavat aineet eivät päässeet kosketuksiin koko marjan pinnan kanssa. (Maks ym. 2019).

Zhou kollegoineen (2017) tutkivat kolmen eri desinfiointiaineen vaikutusta erilaisilla mikrobeilla saastuneisiin mansikoihin. Noroviruksen mallintajaksi valittiin MNV-1.

Desinfiointiainesekokset olivat: 0,5 % LVA (levuliinihappo) + 0,5 % SDS (natriumlauryylisulfaatti), 5 % LVA + 2 % SDS, natriumhypokloriitti 50 ppm. Mikään näistä ei saavuttanut yli 1,5-log vähenemistä hiiren noroviruksen kohdalla ja pelkkä vesipesu oli yhtä tehokasta kuin desinfiointiaineiden käyttö. Tutkituista mikrobeista MNV oli desinfiointiaineille vastustuskykyisin. (Zhou ym. 2017).

6. POHDINTA

Tämän kandidaattitutkielman tavoitteena oli selvittää, mitä uusia teknologioita on kehitteillä norovirusten torjuntaan elintarvikematriiseissa. Luvussa 1 esitettyjä kriteerejä täyttäviä alkuperäistutkimuksia löytyi 24 kappaletta. Nämä tutkimukset jakautuivat neljään eri kategoriaan: HPP eli korkeapainekäsittely (9 tutkimusta), otsonikäsittely (3 tutkimusta), säteilyyn ja UV-valoon perustuviin menetelmiin (8 tutkimusta), sekä kemiallisiin torjuntamenetelmiin (4 tutkimusta). Korkeapainekäsittelyä sekä säteilyyn ja UV-valoon perustuvia menetelmiä on siis viimeisen viiden vuoden aikana tutkittu selkeästi eniten.

Kaikki tutkimukset yhteensä osoittivat selkeästi kaksi asiaa. Ensinnäkin, että eri genoryhmiin ja genotyypeihin kuuluvat norovirukset voivat reagoida hyvin eri tavalla torjuntamenetelmiin. Siinä missä yksi genotyyppi tuhoutuu täysin tietyn menetelmän avulla, voi toinen olla vastustuskykyinen samalle menetelmälle. Tämä aiheuttaa suuria haasteita elintarviketeollisuudelle, jossa voi olla lähes mahdotonta selvittää tarkasti mikä viruskanta on saastuttanut tietyn elintarvikkeen. Puhumattakaan siitä, että elintarviketeollisuus luonnollisesti toivoisi menetelmää, jonka avulla voidaan tuhota mahdollisimman monia erilaisia mikrobeja, sekä viruksia että bakteereja, samaan aikaan. Vaikka jokin menetelmä olisi tehokas norovirusten torjunnassa, voi se olla hyödytön jotain toista yleistä mikrobia vastaan tai päinvastoin, jolloin menetelmä ei ehkä kiinnosta elintarviketeollisuutta.

Toiseksi tutkimukset osoittivat, miten suuria eroja erilaisten elintarvikematriisien välillä on. Yksi menetelmä voi soveltua hyvin norovirusten torjuntaan esimerkiksi mustikoissa, mutta olla tehoton salaatisissa. ”One size fits all” menetelmää ei siis norovirusten torjuntaan elintarvikkeissa ole olemassa tällä hetkellä. Useat tutkimukset osoittivat, että norovirusten torjunta vadelmissa on erityisen hankalaa, johtuen vadelman pinnan rakenteesta, johon virukset ja muut mikrobit helposti pääsevät piiloutumaan (Girard ym. 2016, Huang ym. 2016, Butot ym. 2018, Maks ym. 2019). Tyydyttävä tulos vadelmien kohdalla (virusten väheneminen yli 3-log) saavutettiin ainoastaan yhdessä tutkimuksessa, jossa käytettiin otsonikäsittelyä. Menetelmä on lupaava,

koska vadelmien ulkonäkö ei muuttunut. Tässä tutkimuksessa käytettiin hiiren norovirusta mallintajana, joten menetelmää olisi hyvä tutkia myös ihmisen noroviruksella. (Brié ym. 2018).

Tässä kirjallisuuskatsauksessa tarkastellut tutkimukset erosivat toisistaan sen suhteen mitä norovirusta kokeissa käytettiin. Suurin osa tutkimuksista (16 kpl) käytti jotain mallintajaa ihmisen noroviruksen sijaan. Tavallisin mallintaja oli hiiren norovirus (MNV). Kuudessa tutkimuksessa käytettiin ulosteperäisiä ihmisen noroviruskantoja ja kahdessa tutkimuksessa käytettiin sekä ihmisen norovirusta, että sen mallintajaa. Näin ollen tutkimukset eivät ole täysin vertailukelpoisia, koska eri viruskannat reagoivat hyvin eri lailla samaan käsittelyyn, kuten esimerkiksi Wang ym. (2015) osoittivat. Ihmisen norovirusta käyttäneet tutkimukset antanevat luotettavampaa tietoa, kuin pelkästään mallintajaa käyttäneet. Tutkimusasetelmat erosivat myös sen suhteen, tutkittiinko elintarvikematriisin ulkonäköä ja/tai makua käsittelyn jälkeen. Kahdeksassa tutkimuksessa aistittavia ominaisuuksia tutkittiin ja lopussa ei. Ulkonäön ja maun muutosten selvittäminen olisi tärkeää mikrobien torjuntaan liittyvissä tutkimuksissa, koska muuten ei saada tietoa siitä, onko tutkittu menetelmä käyttökelpoinen elintarviketeollisuudessa.

Neljästä eri menetelmästä korkeapainekäsittelyllä (HPP) on selkeästi eniten potentiaalia norovirusten torjunnassa. Tutkimusten mukaan HPP soveltuu erityisen hyvin ostereiden ja samankaltaisten merenelävien käsittelyyn, koska NoV saadaan tuhottua täysin ja rakenteelliset ominaisuudet voivat olla jopa paremmat käsittelyn jälkeen. Tutkimukset osoittivat, että viruksia tuhoutuu enemmän matalammassa lämpötilassa ja korkeammalla paineella, kuin mitä osteriteollisuus perinteisesti käyttää. Kaikki kolme osteritutkimusta tehtiin ihmisen noroviruksilla, joten evidenssi menetelmän toimivuudesta on melko vahvaa. (Lou ym. 2015b, Ye ym. 2015, Imamura ym. 2018). HPP näyttäisi tutkimusten mukaan soveltuvan norovirusten torjuntaan myös salsassa (Hirneisen ym. 2014, Sido ym. 2017), marjasoseissa- ja mehuissa, sekä mustikoissa (Huang ym. 2016, Pan ym. 2017), kevätsipulissa (Sido ym. 2017) ja kaalista valmistetussa kimchissä (Park ym. 2017). Yksittäisistä elintarvikkeista on kuitenkin vain vähän tutkimuksia, joten niitä pitäisi vielä tehdä enemmän, sekä mahdollisuuksien mukaan käyttää ihmisen norovirusta mallintajan sijaan. Norovirusten torjuntaan kokonaisissa mansikoissa ja vadelmissa HPP ei tämän hetkisen tiedon mukaan sovellu, mutta toisaalta tutkimuksia oli vain yksi, joten näitäkin pitäisi tehdä lisää (Huang ym. 2016).

Otsonikäsittelyyn liittyviä tutkimuksia löytyi hakuehdoilla kolme kappaletta. Tutkimustulokset olivat näissä kaikissa hyvin erilaiset. Brié ym. (2018) saavuttivat yli 3-log virusten vähenemisen vadelmissa 3 ppm otsonilla 1 minuutin käsittelyllä, kun taas Predmore ym. (2015a) käsittelivät

mansikoita ja salaattia peräti 40 minuuttia. Näin pitkä käsittely kuitenkin aiheutti selviä ulkonäkömuutoksia elintarvikkeisiin. Ihmisen norovirus näyttäisi kestävän otsonikäsittelyä varsin hyvin, mutta tutkimuksia oli vain yksi (Wang ym. 2015). Lisäksi tutkimustuloksissa oli ristiriitaisuutta sen suhteen mikä viruskanta on vastustuskykyisempi käsittelylle (Predmore ym. 2015a, Wang ym. 2015). Voidaan siis todeta, että otsonikäsittelystä ei ole tällä hetkellä tarpeeksi tutkimustietoa.

Kahdeksassa tutkimuksessa selvitettiin säteilyn ja UV-valon vaikutusta norovirusiin elintarvikematriiseissa. Näiden tutkimusten perusteella voidaan varmuudella todeta, että nämä menetelmät eivät yksinään sovellu elintarviketeollisuuden käyttöön ainakaan marjojen, kaalin ja merilevän käsittelyyn, koska tarvittava säteilyannos oli paljon suurempi kuin mitä on sallittu käyttää elintarvikkeissa. Sallitulla säteilymäärällä ei saavutettu yli 3-log virusten vähenemistä missään tutkimuksessa. Yksi tutkimus, sen sijaan, osoitti, että vesiavusteisella UV-valolla voisi olla potentiaalia norovirusten torjuntaan mustikoissa, joten tätä menetelmää olisi syytä tutkia enemmän. (Butot ym. 2018, DiCaprio ym. 2016, Kingsley ym. 2018, Liu ym. 2015, Park ym. 2016, Park ym. 2017, Pimenta ym. 2019, Predmore ym. 2015b).

Elintarvikkeiden kloorikäsittely ei varsinaisesti ole uusi teknologia, vaan elintarviketeollisuus on käyttänyt tätä jo pitkään. Menetelmää ei ole kuitenkaan tutkittu paljon, varsinkaan virusten kohdalla. Hakuehdoilla löytyi neljä tutkimusta, joissa selvitettiin hapettavien kemikaalien tehoa norovirusiin. Tutkimukset osoittivat jälleen kerran, että käsiteltyjen elintarvikkeiden välillä on suuria eroja, esimerkiksi hapettavat aineet toimivat paremmin kokonaisen verrattuna pilkotun salaatin käsittelyssä ja roomansalaatissa paremmin kuin jäävuorisalaatissa (Dunkin ym. 2017). Ruiskukäsittely osoittautui tehottomaksi noroviruksen kohdalla (Maks ym. 2019). Marjojen pesua desinfiointiaineella tutkittiin kahdessa tutkimuksessa ja tulokset olivat näissä hyvin erilaiset. Yhdessä tutkimuksessa desinfiointiaineet todettiin tehottomiksi noroviruksen kohdalla, vaikka ne toimivatkin muiden tutkittujen mikrobien kohdalla hyvin (Zhou ym. 2017), mutta toisessa tutkimuksessa natriumhypokloriitti ja peretikkahappo toimivat toivotulla tavalla varsinkinkin orgaanisen aineen läsnä ollessa (Girard ym. 2016). Viimeksi mainittuun tulokseen on kuitenkin syytä suhtautua erittäin varauksellisesti, koska tulos on ristiriidassa vakiintuneen näkemyksen kanssa, jonka mukaan orgaaninen aines estää kloorin tehoa, eikä yksittäinen tutkimustulos voi kumota tätä käsitystä. (Girard ym. 2016, Dunkin ym. 2017). Yhteenvedona voidaankin todeta, että evidenssiä hapettavien kemikaalien tehosta norovirusten torjunnassa ei tällä hetkellä ole riittävästi.

Norovirusten torjuntatutkimukset ovat yhteiskunnallisesti tärkeitä, koska norovirukset aiheuttavat viidenneksen kaikista suolistotulehduksista maailmanlaajuisesti ja kustannukset (suorat ja epäsuorat) ovat tästä syystä erittäin korkeat (Ahmed ym. 2014, Bartsch ym. 2016). Nämä seikat huomioon ottaen, norovirusten torjuntaa elintarvikkeissa on tutkittu yllättävän vähän. Yksi syy tähän on ollut se tosiasia, että ihmisen norovirusta ei ole kyetty kasvattamaan laboratoriossa, joten tutkijat ovat joko joutuneet käyttämään mallintajaa tai ulosteperäisiä norovirusia. Viimeksi mainittujen käyttö taas edellyttää sopivien sairaalakontaktien ja näytteiden olemassaoloa, sekä potilaan suostumusta, mikä voi hankaloittaa tutkimusten tekemistä (Dunkin ym. 2017). Vuoden 2016 läpimurto, jolloin ihmisen norovirusta onnistuttiin kasvattamaan laboratoriossa ensimmäistä kertaa muuttaa toivottavasti tilannetta niin, että tulevaisuudessa suurin osa tutkimuksista tehtäisiin ihmisen norovirusilla, jolloin johtopäätösten vetäminen olisi varmempaa (Ettayebi ym. 2016).

7. JOHTOPÄÄTÖKSET

Tämän kandidaattitutkielman tavoitteena oli selvittää kirjallisuuskatsauksen avulla, mitä uusia teknologioita on kehitteillä norovirusten torjuntaan elintarvikematriiseissa. Vuonna 2011 EFSA suoritti samankaltaisen kirjallisuuskatsauksen ja tuli siihen tulokseen, että luotettavia menetelmiä ei ole, joten elintarviketeollisuuden tulisi täysin keskittyä ennaltaehkäisyyn. Tämän kandidaattitutkielman tulosten pohjalta voidaan todeta, että tämä suositus pätee suurimmilta osin edelleen, mutta lupaavia teknologioita on kuitenkin jo olemassa. Korkeapainekäsittely (HPP) on näistä lupaavin ja voidaan todeta, että varsinkin ostereiden käsittelyn tehokkuudesta tällä menetelmällä on jo varsin vahvoja todisteita. Kirjallisuuskatsaus osoitti sen sijaan, että norovirusten torjuntaan vadelmissa ja mansikoissa ei tällä hetkellä ole luotettavia menetelmiä, joten ennaltaehkäisy näiden elintarvikkeiden kohdalla on ensisijaisen tärkeää. Tulevaisuudessa tarvitaan lisää sellaisia tutkimuksia, joissa käytetään ihmisen norovirusta mallintajan sijaan, sekä eri menetelmien yhdistämistä tutkivia asetelmia.

8. LÄHTEET

Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, Verhoef L, Premkumar P, Parashar UD, Koopmans M, Lopman BA. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases* 2014;14:725-730.

Bartsch SM, Lopman BA, Ozawa S, Hall AJ, Lee BY. Global Economic Burden of Norovirus Gastroenteritis. *PLoS ONE* 2016;11:e0151219.

Brié A, Boudaud N, Mssihid A, Loutreul J, Bertrand I, Gantzer C. Inactivation of murine norovirus and hepatitis A virus on fresh raspberries by gaseous ozone treatment. *Food Microbiology* 2018;70:1-6.

Butot S, Cantergiani F, Moser M, Jean J, Lima A, Michot L, Putallaz T, Stroheker T, Zuber S. UV-C inactivation of foodborne bacterial and viral pathogens and surrogates on fresh and frozen berries. *International Journal of Food Microbiology* 2018;275:8-16.

Cortes-Penfield NW, Ramani S, Estes MK, Atmar RL. Prospects and Challenges in the Development of a Norovirus Vaccine. *Clinical Therapeutics* 2017;39:1537-1549.

DiCaprio E, Phantkankum N, Culbertson D, Ma Y, Hughes JH, Kingsley D, Uribe RM, Li J. Inactivation of human norovirus and Tulane virus in simple media and fresh whole strawberries by ionizing radiation. *International Journal of Food Microbiology* 2016;232:43-51.

Dunkin N, Weng S, Jacangelo JG, Schwab KJ. Inactivation of Human Norovirus Genogroups I and II and Surrogates by Free Chlorine in Postharvest Leafy Green Wash Water. *Appl Environ Microbiol* 2017;83:1457.

Eden J, Tanaka MM, Boni MF, Rawlinson WD, White PA. Recombination within the Pandemic Norovirus GII.4 Lineage. *Journal of Virology* 2013;87:6270.

EFSA. Scientific opinion on an update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses. *EFSA Journal* 2011;9:2190.

EFSA ja ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *European Food Safety Authority Journal* 2018;16:262.

EFSA ja ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *European Food Safety Authority Journal* 2017;15:5077.

Ettayebi K, Crawford SE, Murakami K, Broughman JR, Karandikar U, Tenge VR, Neill FH, Blutt SE, Zeng X, Qu L. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science* 2016;353:1387-1393.

Girard M, Mattison K, Fliss I, Jean J. Efficacy of oxidizing disinfectants at inactivating murine norovirus on ready-to-eat foods. *International Journal of Food Microbiology* 2016;219:7-11.

Hall AJ, Lopman BA, Payne DC, Patel MM, Gastañaduy PA, Vinjé J, Parashar UD. Norovirus Disease in the United States. *Emerging infectious diseases* 2013;19:1198-1205.

Hallanvuoto S, Johansson T. *Elintarvikkeiden mikrobiologiset vaarat*. Helsinki: Elintarviketurvallisuusvirasto Evira 2010.

Hirneisen K, Reith JL, Wei J, Hoover DG, Hicks DT, Pivarnik LF, Kniel KE. Comparison of pressure inactivation of caliciviruses and picornaviruses in a model food system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2014;26:102-107.

Huang R, Ye M, Li X, Ji L, Karwe M, Chen H. Evaluation of high hydrostatic pressure inactivation of human norovirus on strawberries, blueberries, raspberries and in their purees. *International Journal of Food Microbiology* 2016;223:17-24.

Imamura S, Kanezashi H, Goshima T, Suto A, Ueki Y, Sugawara N, Ito H, Zou B, Kawasaki C, Okada T, Uema M, Noda M, Akimoto K. Effect of High Pressure Processing on a Wide Variety of Human Noroviruses Naturally Present in Aqua-Cultured Japanese Oysters. *Foodborne Pathogens and Disease* 2018;15:621-626.

Kingsley DH. High pressure processing and its application to the challenge of virus-contaminated foods. *Food and environmental virology* 2013;5:1-12.

Kingsley DH, Perez-Perez R, Boyd G, Sites J, Niemira BA. Evaluation of 405-nm monochromatic light for inactivation of Tulane virus on blueberry surfaces. *J Appl Microbiol* 2018;124:1017-1022.

Liu C, Li X, Chen H. Application of water-assisted ultraviolet light processing on the inactivation of murine norovirus on blueberries. *International Journal of Food Microbiology* 2015;214:18-23.

Lou F, Neetoo H, Chen H, Li J. High Hydrostatic Pressure Processing: A Promising Nonthermal Technology to Inactivate Viruses in High-Risk Foods. *Annu Rev Food Sci Technol* 2015a;6:389-409.

Lou F, Ye M, Ma Y, Li X, DiCaprio E, Chen H, Krakowka S, Hughes J, Kingsley D, Li J. A Gnotobiotic Pig Model for Determining Human Norovirus Inactivation by High-Pressure Processing. *Appl Environ Microbiol* 2015b;81:6679-6687.

Maks N, Ye MU, Swanson S, Lee A, Freeman BB, Deng K. Evaluation of Inactivating Norovirus, Hepatitis A, and *Listeria monocytogenes* on Raspberries by Sanitizer Spray. *J Food Prot* 2019;82:869-877.

Pan H, Buenconsejo M, Reineke KF, Shieh YC. Effect of Process Temperature on Virus Inactivation during High Hydrostatic Pressure Processing of Contaminated Fruit Puree and Juice. *J Food Prot* 2016;79:1517-1526.

Park SY, Ha J, Kim SH, Ha S. Effects of high hydrostatic pressure on the inactivation of norovirus and quality of cabbage Kimchi. *Food Control* 2017;81:40-45.

Park SY, Ha S. Application of gamma radiation for the reduction of norovirus and the quality stability in optimally ripened cabbage kimchi. *Food Research International* 2017;100:277-281.

- Park SY, Jung YJ, Kwon JY, Kim SE, Jeong M, Ha S. Application of high hydrostatic pressure for the inactivation of norovirus and quality stability in fresh sea squirt (*Halocynthia roretzi*). *Food Sci Technol Int* 2019;1082013219842439.
- Park SY, Kang S, Ha S. Inactivation of murine norovirus-1 in the edible seaweeds *Capsosiphon fulvescens* and *Hizikia fusiforme* using gamma radiation. *Food Microbiology* 2016;56:80-86.
- Patel MM, Hall AJ, Vinjé J, Parashar UD. Noroviruses: A comprehensive review. *Journal of Clinical Virology* 2009;44:1-8.
- Pimenta AI, Margaça FMA, Cabo Verde S. Virucidal activity of gamma radiation on strawberries and raspberries. *International Journal of Food Microbiology* 2019;304:89-96.
- Pogan R, Dülfer J, Uetrecht C. Norovirus assembly and stability. *Current Opinion in Virology* 2018;31:59-65.
- Predmore A, Sanglay GC, DiCaprio E, Li J, Uribe RM, Lee K. Electron beam inactivation of Tulane virus on fresh produce, and mechanism of inactivation of human norovirus surrogates by electron beam irradiation. *International Journal of Food Microbiology* 2015a;198:28-36.
- Predmore A, Sanglay G, Li J, Lee K. Control of human norovirus surrogates in fresh foods by gaseous ozone and a proposed mechanism of inactivation. *Food Microbiology* 2015b;50:118-125.
- Rönnqvist M, Aho E, Mikkilä A, Ranta J, Tuominen P, Rättö M, Maunula L. Norovirus Transmission between Hands, Gloves, Utensils, and Fresh Produce during Simulated Food Handling. *Applied and Environmental Microbiology* 2014;80:5403-5410.
- Ruokavirasto. Usein kysyttyä noroviruksesta. 2019.
<https://www.ruokavirasto.fi/henkiloasiakkaat/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikkeiden-turvallisen-kayton-ohjeet/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia-aiheuttavia-virusia/norovirus/usein-kysyttya-noroviruksesta/> (luettu Jun 7, 2019).
- Ruokavirasto. Ruokamyrkytysepidemiat vuonna 2016. 2016.
<https://www.ruokavirasto.fi/teemat/zoonosikeskus/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytysepidemiat-suomessa/ruokamyrkytysepidemiat-vuonna-2016/> (luettu Jun 7, 2019).
- Sido RF, Huang R, Liu C, Chen H. High hydrostatic pressure inactivation of murine norovirus and human noroviruses on green onions and in salsa. *International Journal of Food Microbiology* 2017;242:1-6.
- Tavoschi L, Severi E, Niskanen T, Boelaert F, Rizzi V, Liebana E, Dias JG, Nichols G, Takkinen J, Coulombier D. Food-borne diseases associated with frozen berries consumption: a historical perspective, European Union, 1983 to 2013. *Eurosurveillance* 2015;20:21193.
- THL. Noroviruksen esiintyvyys - Infektiotaudit - THL. 2019.
<http://thl.fi/fi/web/infektiotaudit/seuranta-ja-epidemiat/tartuntatautirekisteri/tartuntataudit-suomessa-vuosiraportit/tautien-esiintyvyys/noroviruksen-esiintyvyys> (luettu Jun 7, 2019).
- Vinje J. Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus. *J Clin Microbiol* 2015;53:373-381.

Wang Q, Markland S, Kniel KE. Inactivation of Human Norovirus and Its Surrogates on Alfalfa Seeds by Aqueous Ozone. *J Food Prot* 2015;78:1586-1591.

WHO. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. Geneva: World Health Organization 2015.

Ye M, Lingham T, Huang Y, Ozbay G, Ji L, Karwe M, Chen H. Effects of High-Hydrostatic Pressure on Inactivation of Human Norovirus and Physical and Sensory Characteristics of Oysters. *Journal of Food Science* 2015;80:M133-M1335.

Zhou Z, Zuber S, Cantergiani F, Butot S, Li D, Stroheker T, Devlieghere F, Lima A, Piantini U, Uyttendaele M. Inactivation of viruses and bacteria on strawberries using a levulinic acid plus sodium dodecyl sulfate based sanitizer, taking sensorial and chemical food safety aspects into account. *International Journal of Food Microbiology* 2017;257:176-182.