

Sluttrapport: Smittestoffer i vegetabiliske næringsmidler

Gro S. Johannessen

Lucy Robertson

Mette Myrmel

Laila Jensvoll





Veterinærinstituttets rapportserie · 7 - 2013

Tittel
Sluttrapport:
Smittestoffer i vegetabiliske næringsmidler

Publisert av
Veterinærinstituttet · Pb. 750 Sentrum · 0106 Oslo

Form: Graf AS
Veterinærinstituttet

Bestilling
kommunikasjon@vetinst.no
Tel: 23 21 63 66

ISSN 1890-3290 elektronisk utgave

Forslag til sitering:
Gro S. Johannessen, Lucy Robertson, Mette Myrmel, Laila Jensvoll. Sluttrapport: Smittestoffer i vegetabiliske næringsmidler. Veterinærinstituttets rapportserie 7-2013. Oslo: Veterinærinstituttet; 2013.

© Veterinærinstituttet
Kopiering tillatt når kilde gjengis



Veterinærinstituttets rapportserie
— Norwegian Veterinary Institute Report Series
Rapport 7 · 2013

Sluttrapport: Smittestoffer i vegetabiliske næringsmidler

Forfattere

Gro S. Johannessen

Lucy Robertson

Mette Myrmel

Laila Jensvoll

18. mars 2013

ISSN 1890-3290 elektronisk utgave



Veterinærinstituttet
— Norwegian Veterinary Institute



Norges veterinærhøgskole

Innhold

1. INTRODUKSJON	5
2. MATERIALE OG METODER	6
3. RESULTATER OG VURDERINGER.....	8
4. REFERANSER.....	11

Hovedresultater

Ikke påvist *Salmonella*, STEC eller virus i noen av prøvene analysert for disse parameterne.

Påvist 1 cyste av *Giardia* i en prøve av importerte sukkererter.

Påvist *E. coli* i lavt antall i åtte prøver fordelt på seks forskjellige prøvetyper fra i alt 194 partier.

Funnene er ikke uventet tatt i betraktning et lavt prøveantall og få prøver fra hvert parti.

English summary

An increase in the number of registered outbreaks of illness associated with fruit/vegetables in Norway motivated the Norwegian Food Safety Authority to commission a limited survey of fresh and frozen produce for infectious agents. A variety of selected produce types (salad leaves, strawberries, sprouts, mangetout, raspberries (both fresh and frozen)), both imported and locally-grown, were analysed for bacteria (*E. coli*, *Salmonella*, and shiga toxin producing *E. coli* (STEC)), viruses (Norovirus and adenovirus), and parasites (*Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*). Not all produce samples were analysed for all parameters. Where possible, standard methods were used for the analyses; bacteriological analyses were conducted by the Norwegian Veterinary Institute, while virus and parasite analyses were conducted at the Norwegian School of Veterinary Science. *Salmonella*, STEC, norovirus, and adenovirus were not detected in any of the samples. In 8 of the 194 samples analysed for *E. coli*, low levels were detected (maximum of 80 colony-forming units per g produce). In 1 of 10 samples of mangetout analysed for *Cryptosporidium* and *Giardia*, a single *Giardia* cyst was detected in a 50 g sample. These results, which demonstrate a low level of contamination, are unsurprising, particularly given the limited number of samples analysed.

1. Introduksjon

Det har de senere årene vært en økning i antall registrerte sykdomsutbrudd forårsaket av vegetabiliske næringsmidler i Norge. Frukt og grønnsaker inngår som en viktig del av et sunt kosthold, og importen har økt i takt med økt konsum. I 2010 gjennomførte Mattilsynet en områdeanalyse for fagområdet planter og vegetabilisk mat. En av konklusjonene etter denne gjennomgangen var at Mattilsynet bør ta ut flere prøver for smittestoffer i vegetabiliske næringsmidler. I 2010 ble også EUs hygieneregelverk (hygienepakken) implementert i norsk rett. Regelverket er gjeldende for hele matkjeden, herunder også for norske primærprodusenter. Det ble i etterkant av områdeanalysen bevilget midler til å gjennomføre et prøvetakingsprosjekt i 2012. Prosjektets hovedfokus har vært import, men også norskproduserte produkter har vært inkludert. Formålet har vært å undersøke forekomst av ulike smittestoffer i stikkprøver av utvalgte spiseklare vegetabiliske næringsmidler som omsettes til forbruker i Norge. Prosjektet har inngått som en del av Mattilsynets overvåking- og kontrollprogram portefølje for 2012. I

kontraktene, og medfølgende bilag mellom Mattilsynet og Veterinærinstituttet (Ref. 2011/194918) og Mattilsynet og Norges Veterinærhøgskole (Ref. 2011/194514) står det at det skal gjennomføres et overvåknings- og kartleggingsprosjekt (OK-program) for smittestoffer i vegetabler. I bilagene er det spesifisert hvilke produkter og analyser som skal gjennomføres. De bakteriologiske analysene ble gjennomført ved Veterinærinstituttet, og de virologiske og parasittologiske analysene ble gjennomført ved Norges Veterinærhøgskole.

Definisjoner og forkortelser

STEC:	shigatoksinproduserende <i>E. coli</i>
NoV:	norovirus
AdV:	adenovirus

2. Materiale og metoder

2.1. Prøveutvalg og analyser

Hovedfokus har vært på importprodukter som vanligvis ikke varmebehandles før konsum. I tillegg til importprøvene, skulle det også tas ut noen utvalgte norsk-produserte produkter. Tabell 1 viser en oversikt over planlagte uttak av prøvetyper og analyser. Analysebudsjettet var begrenset, så det ble gjort en prioritering av prøvetyper og analyser basert på antatt risiko for de ulike produktene og smittestoffene. Det skulle velges produkter med bred distribusjon på det norske markedet. For at man skulle få tatt ut prøver av flest mulig varepartier ble det kun tatt ut 1-3 stikkprøver fra hvert vareparti.

Salat. Det skulle prioriteres prøvetaking av importerte og norskproduserte salater med stor og "frynsete" overflate, da det er større sjanse for at slike salater fanger opp smittestoffer ved vanning med forurenset vanningsvann. Hovedtyngden av prøvene i prosjektet har vært av salat.

Jordbær. En stor andel jordbærplukkere i Norge er sesongarbeidere fra land med en annen smittestatus enn Norge. Fra tidligere år er det kjent at toalettforholdene rundt åkrene ikke alltid er optimale. Det er derfor ønskelig med analysedata for norskproduserte jordbær.

Spirer er et kjent risikoprodukt pga farene for oppvekst av bakterier i frøene under spiringsprosessen. Det er ønskelig med en viss stikkprøvekontroll av produktene som frembys på det norske markedet.

Sukkererter. Importerte sukkererter på det norske markedet kommer gjerne fra tredjeland (land utenfor EU/EØS). I slike land varmebehandles som regel sukkererter før konsum, mens i Skandinavia spises gjerne sukkererter rå. Det har vært registrert flere utbrudd forårsaket av importerte sukkererter, både i Norge og i de andre skandinaviske landene.

Friske bringebær. Det har de siste årene vært en stor økning i importen av friske bringebær til Norge. Her har Mattilsynet lite analysedata. Det er registrert flere utbrudd i utlandet med parasitter i friske bringebær importert fra tredjeland. I prosjektet vil derfor analyser for parasitter gjennomføres for produktgruppen.

Fryste bringebær. I Sverige, Danmark og Finland er det registrert en rekke utbrudd av norovirus de siste årene forårsaket av importerte fryste bringebær fra land som Serbia og Kina. Det er ikke registrert tilsvarende utbrudd i Norge, noe som kan bero på underrapportering i den norske befolkningen. Det er derfor ønskelig med analysedata for virus i stikkprøver av importerte fryste bær på det norske markedet.

Tabell 1. Oversikt over planlagt uttak av prøvetyper og analyser som skal utføres på de ulike prøvetypene

Produkt	Analyseparameter				
	<i>E. coli</i> (kvantitativ)	<i>Salmonella</i>	VTEC	<i>Cryptosporidium</i> <i>Giardia</i>	Norovirus Adenovirus
Salat	120	120	-	20	20
Jordbær	35	35	-	-	-
Spirer	20	20	-	-	-
Sukkererter	30	30	30	10	-
Friske bringebær	-	-	-	10	-
Frosne bringebær	-	-	-	-	20

2.2. Prøvetaking

Prøvene ble tatt ut av Mattilsynets distriktskontorer i perioden 1. januar til 15. desember 2012. Norskproduserte produkter skulle primært tas ut hos produsent etter høsting og pakking. Dersom produsenten ikke pakket selv, skulle prøvene tas ut ved pakkeriet. Prøver av importerte produkter skulle tas ut hos importør eller første mottaker, men i distrikter der dette ikke var mulig, ble prøvene tatt ut hos grossist eller detaljist. Prøveuttaket skulle spres mest mulig i aktuell tidsperiode og på flest mulig ulike produsenter og importører. Det ble i utgangspunktet tatt ut 1-3 prøver per vareparti. Enkeltp prøvene ble sendt til ulike laboratorier for henholdsvis bakteriologiske, virologiske og parasittologiske analyser jf. oppsett i tabell 1. Tabell 2 gir en oversikt over minimum prøvemengde per innsendte prøve. Prøvene ble sendt til laboratoriene med Postens Overnatt-pakke.

Hvis resultatet fra undersøkelsene for *E. coli* påviste >100 kde/g (kolonidannende enheter/g) i uttatt prøve skulle det tas ut fire ekstra prøver fra samme vareparti (hvis mulig) for å undersøke om det var *E. coli* til stede i antall >100 kde/g i flere prøver.

Tabell 2. Minimum prøvemengde (gram) per innsendte prøve.

Analyse	Produkt	Minimum prøvemengde (gram)
Bakterier	Salat	3 hoder per prøve eller min 200 g
	Sukkererter	Min 1 pakke eller helst 200 g
	Jordbær	1-2 kurver
	Spirer	100-200 g
Virus	Salat	Min 50 g
	Bringebær	Min 50 g
Parasitter	Salat	Minst 3 salathoder (min 50 g per pakke)
	Sukkererter	Minst 3 forbrukerpakker (min 50 g per pakke)
	Bringebær	Minst 3 kurver bringebær (min 50 g per kurv)

2.3. Analysemetoder

Bakterier

Etter at prøvene ankom laboratoriet, ble de enten analysert med en gang eller oppbevart kjølig til analysene ble startet. Alle prøvene ble analysert for *E.coli* (fekal indikator, kvantitativ analyse) og *Salmonella*, mens sukkerertene ble i tillegg analysert for shigatoksinproduserende *E. coli* (STEC). For kvantifisering av *E. coli* ble det benyttet Petrifilm™ Select *E. coli* (3M), mens for *Salmonella*-analysene ble NMKL nr. 71 "Salmonella. Påvisning i livsmedel" (1999) benyttet. For STEC ble prøvene analysert etter det da foreliggende metodeforslaget fra ISO/CEN (CEN ISO TS 13136 Microbiology of food and animal feed - Real-time polymerase chain detection (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens - Horizontal method for the detection of Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) belonging to the O26, O103, O111, O145 and O157 serogroups).

Virus

Salat og bringebær ble analysert for norovirus (NoV) og adenovirus (AdV) ved hjelp av CEN Horizontal method for detection of Norovirus and Hepatitis A in Food by RT-PCR. Det ble tatt ut to paralleller (2 x 25 g) fra hver prøve. Salaten ble klippet i mindre biter før den ble vasket med glycinbuffer i en filterpose. Hele bringebær ble vasket i tilsvarende buffer (inklusive pectinase) som jevnlig ble justert til pH9-9,5. Bufferen ble deretter grovsentrifugert, justert til pH7,0 og presipitert ved hjelp av PEG/NaCl ved 4°C. Viruspartikler ble løst i PBS før ekstrahering med kloroform/butanol (gjelder partikler fra bringebær). Virus RNA (NoV) og DNA (AdV) ble ekstrahert fra henholdsvis PBS (salat) og vannfase (bringebær) ved hjelp av MiniMag (BioMerieux) og analysert med real time (RT)-PCR. Mengovirus ble benyttet som prosesskontroll (tilsatt vaskebuffer) i alle analysene.

Parasitter

Etter at prøvene ankom laboratoriet, ble de enten analysert med en gang eller oppbevart kjølig til analysene ble startet. Salat, bringebær og sukkererter ble analysert for *Cryptosporidium* oocyster og *Giardia* cyster med en intern metode som er basert på en ISO metode (ISO 18744) som er under utvikling. Metoden har også blitt brukt i sammenheng med EU-prosjektet Veg-i-Trade. Det er en 4-trinns metode, med eluering i buffer, oppkonsentrering ved sentrifugering, isolering ved immunomagnetiske separasjon (IMS), og til slutt identifisering via immunofluorescens antistoff testing (IFAT) som er basert på mikroskopering av oppkonsentrert prøve. Farging av kjerner med 4'-6-diamidino-2-fenyl indole (DAPI) ble også brukt.

3. Resultater og vurderinger

3.1. Oversikt over innsamlede prøver

I perioden 1. januar til 15. desember 2012 ble det tatt ut 1-3 stikkprøver fra 235 partier av de utvalgte produktene til bakteriologiske, virologiske og parasittologiske analyser. Til sammen 96 partier var norskproduserte, mens de resterende (140 partier) var importerte. For fordeling av prøver og opprinnelsesland, se tabell 3. Prøvene kom fra 19 ulike land, inkludert Norge, der hoveddelen av de importerte salatene kom fra Italia, Frankrike og Spania, mens sukkerertene i stor grad kom fra Guatemala og Kenya.

Fra 10 partier av salat, ble det utført bakteriologiske, parasittologiske og virologiske analyser, mens det fra henholdsvis ni og fem partier av sukkererter og salat ble utført bakteriologiske og parasittologiske analyser. Fra fem og fra ett parti av salat ble det utført henholdsvis bakteriologiske og virologiske, og virologiske og parasittologiske analyser.

Tabell 3. Antall partier som ble prøvetatt fra de enkelte land.

Land	Produkt					
	Salat	Sukkererter	Spirer	Jordbær	Bringebær (friske)	Bringebær (fryste)
Norge	48		15	33		
Frankrike	24					
Guatemala		11				
Etiopia		1				
Polen						12
Nederland	4		4		2	
Spania	14				5	
Italia	25					
Kenya		12				
Mexico					1	
Kina			1			
Ungarn						4
Latvia						1
Portugal					2	
Danmark	2					
Peru		5				
Zimbabwe		1				
Tyskland	3	1				
Ukjent	4					
Totalt	124	31	20	33	10	17

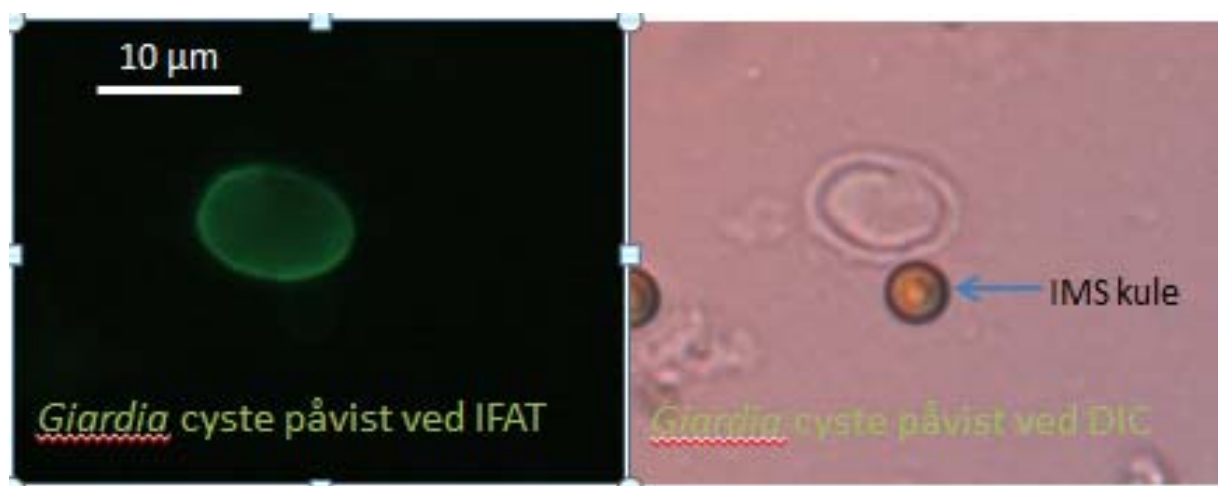
3.2. Analyseresultater

Det ble ikke påvist *Salmonella* eller STEC i noen av prøvene som ble analysert for disse parametrene. Det ble funnet *E. coli* i lavt antall i til sammen åtte prøver fra 194 partier (tabell 4). Til sammen 39 prøver ble analysert for noro- og adenovirus. Det ble ikke påvist virus i noen av prøvene. I alt ble 41 prøver analysert for *Cryptosporidium* og *Giardia*. I en av 10 prøver av sukkererter analysert for *Cryptosporidium* og *Giardia*, ble det påvist 1 cyste av *Giardia* (Fig. 1). Det ble ikke påvist *E. coli* i to tilsvarende prøver fra samme parti av sukkererter.

Tabell 4. Oversikt over prøver med funn og fra hvilke land disse kom fra.

Land	Produkt	<i>E. coli</i>	<i>Giardia</i>
Kenya	Sukkererter	< 10 kde/g	1 cyste/50 g
Kenya	Sukkererter	10 kde/g	
Frankrike	Feldsalat	10 kde/g	
Norge	Ruccola	20 kde/g	
Spania	Spinat	40 kde/g	
Kina	Spirer	20 kde/g	
Norge	Jordbær	80 kde/g	
Norge	Jordbær	20 kde/g	
Norge	Jordbær	10 kde/g	

Figur 1. *Giardia* cysten som ble funnet i prøven av sukkererter fra Kenya. (Foto: Lucy Robertson, NVH)



3.3. Vurdering

Det ble ikke påvist *Salmonella* i noen av prøvene av salat, spirer, jordbær eller sukkererter og heller ikke VTEC i noen av prøvene av sukkererter. Resultatene fra de bakteriologiske analysene av stikkprøvene som ble analysert i dette prosjektet, indikerer at forekomsten av *E. coli* som indikator på fekal forurensing er lav, med få positive prøver og lavt antall *E. coli* i de positive prøvene. Man må ta forbehold om at prøveantallet er lavt og at man stort sett har tatt ut en prøve fra hvert parti. Fekal forurensing av vegetabiliske næringsmidler er ofte ujevnt fordelt i produktene med mindre forurensingen er massiv. Derfor kan det være vanskelig å oppdage smitte i produktene når det i de fleste tilfellene bare er analysert en prøve per parti. I mikrobiologiske kriterier (EU-forordning 2073/2005) er det krav til fem prøver, både for mattrygghetskriterier (*Salmonella* i spiseklare spirer og ferdig-skåret frukt og grønnsaker, samt upasteuriserte frukt- og grønnsaksjuicer). For prosesskriteriene skal det også tas fem prøver for analyse av *E. coli* i spiseklare, ferdigskåret frukt og grønnsaker og upasteuriserte frukt- og grønnsaksjuicer. For prosesskriteriene kan to av fem prøver inneholde *E. coli* mellom 100 og 1000 kde/g. Ingen av resultatene i denne stikkprøvetakingen overskred 100 *E. coli*/g. Det er ikke overraskende at det

ikke er isolert *Salmonella* eller VTEC fra noen av prøvene. Dette er tarmbakterier, og disse vil ikke finnes naturlig tilstedeværende i produkter som er analysert her. Forekomst av tarmpatogene bakterier vil skyldes en fekal forurensning.

Adenovirus har en høy forekomst i avløpsvann og kan benyttes som en indikator for fekal forurensning (mer egnet enn *E.coli* med hensyn på virus). Det ble ikke påvist verken noro- eller adenovirus i prøvene av salat eller fryste bringebær, noe som for salatprøvene er i tråd med de andre mikrobiologiske funnene. Prøvene av fryste bringebær ble ikke analysert for bakterier eller parasitter.

Det har vært flere undersøkelser av vegetabiliske matvarer for *Cryptosporidium* og *Giardia* fra forskjellige deler av verden. Til sammen fire av disse (fra Norge, Sicilia, England og Spania) har brukt metoder tilsvarende den som er benyttet her. Disse undersøkelser har generelt påvist et lavt, men bredt nivå av kontaminering med *Giardia* cyster. Resultatene med hensyn på parasitter er derfor ikke overraskende. Det burde understrekes at i foreliggende og tidligere undersøkelser er det ikke påvist om de tilstedeværende *Giardia* var av en genotype som er infektiv for mennesker. I tillegg er det ikke undersøkt om cystene var i stand til å infisere en mottakelig vert. Noen tidligere undersøkelser har også påvist kontaminering av vegetabiliske næringsmidler med *Cryptosporidium* oocyster. På grunn av det begrensede antall prøver i dette prosjektet, er det ikke overraskende at vi ikke fant *Cryptosporidium* i noen av våre prøver. I de nordiske land har det vært flere utbrudd av kryptosporidiose knyttet til vegetabiliske matvarer, så dette er en kjent smittevei.

4. Referanser

- Amorós, I., Alonso, J.L., Cuesta, G. 2010. *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts on salad products irrigated with contaminated water. *Journal of Food Protection* 73:1138-1140.
- Baert L, Mattison K, Loisy-Hamon F, Harlow J, Martyres A, Lebeau B, Stals A, Van Coillie E, Herman L, Uyttendaele M. 2011. Review: norovirus prevalence in Belgian, Canadian and French fresh produce: a threat to human health? *Int J Food Microbiol.* 151(3):261-9.
- Cook, N., Lim, Y.A.L. 2012. *Giardia duodenalis*: contamination of fresh produce. In: *Foodborne Protozoan Parasites* (eds: Robertson, L.J., Smith, H.V.). Nova Publishers.
- Cook, N., Nichols, R.A.B., Wilkinson, N., Paton, C.A., Barker, K., Smith, H.V. 2007. Development of a method for the detection of *Giardia duodenalis* on lettuce and for simultaneous analysis of salad products from the presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology* 73:7388-7391.
- Di Benedetto, M.A., Cannova, L., Di Piazza, F., Amodio, E., Bono, F. Cerame, G., Romano, N. 2007. Hygienic-sanitary quality of ready-to-eat salad vegetables on sale in the city of Palermo (Sicily). *Ig. Sanità Pubbl.* 63:659-670.
- Forskrift om næringsmiddelhygiene (næringsmiddelhygieneforskriften). FOR-2008-12-22-1623. <http://www.lovdatab.no/cgi-wift/ldles?doc=/sf/sf/sf-20081222-1623.html>
- Mattilsynets områdeanalyse. 2010. Tilsyn med planter, planteprodukter og vegetabilisk mat. http://www.mattilsynet.no/mat_og_vann/produksjon_av_mat/frukt_bar_gronnsaker_og_korn/tilsyn_med_planter_planteprodukter_og_vegetabilisk_mat__omraadeanalyse_fra_2010.6079/BINARY/Tilsyn%20med%20planter%20planteprodukter%20og%20vegetabilisk%20mat%20-%20Omr%C3%A5deanalyse%20fra%202010
- Robertson LJ, Chalmers RM. 2013. Foodborne cryptosporidiosis: is there really more in Nordic countries? *Trends Parasitol.* 29(1):3-9.
- Robertson, L.J., Gjerde, B.K. 2001. Occurrence of parasites on fruits and vegetables in Norway. *Journal of Food Protection* 64:1793-1798.
- Rzezutka A, Nichols RA, Connelly L, Kaupke A, Kozyra I, Cook N, Birrell S, Smith HV. 2010. *Cryptosporidium* oocysts on fresh produce from areas of high livestock production in Poland. *Int J Food Microbiol.* 139(1-2):96-101



Veterinærinstituttet er et nasjonalt forskningsinstitutt innen dyrehelse, fiskehelse, mattrygghet og dyrevelferd med uavhengig forvaltningsstøtte til departementer og myndigheter som primær oppgave. Beredskap, diagnostikk, overvåking, referansefunksjoner, rådgivning og risikovurderinger er de viktigste virksomhetsområdene.

Veterinærinstituttet har hovedlaboratorium i Oslo og regionale laboratorier i Sandnes, Bergen, Trondheim, Harstad og Tromsø, med til sammen ca. 360 ansatte.

www.vetinst.no

Tromsø

Stakkevollvn. 23b · 9010 Tromsø
Stakkevollvn. 23b · 9010 Tromsø
t 77 61 92 30 · f 77 69 49 11
vitr@vetinst.no

Harstad

Havnegata 4 · 9404 Harstad
9480 Harstad
t 77 04 15 50 · f 77 04 15 51
vih@vetinst.no

Bergen

Bontelabo 8 b · 5003 Bergen
Pb 1263 Sentrum · 5811 Bergen
t 55 36 38 38 · f 55 32 18 80
post.vib@vetinst.no

Sandnes

Kyrkjev. 334 · 4325 Sandnes
Pb 295 · 4303 Sandnes
t 51 60 35 40 · f 51 60 35 41
vis@vetinst.no

Trondheim

Tungasletta 2 · 7047 Trondheim
Pb 5695 Sluppen · 7485 Trondheim
t 73 58 07 50 · f 73 58 07 88
vitr@vetinst.no

Oslo

Ullevålsveien 68 · 0454 Oslo
Pb 750 Sentrum · 0106 Oslo
t 23 21 60 00 · f 23 21 60 01
post@vetinst.no

