

Ministerstvo pôdohospodárstva SR

Sekcia potravinárstva, výživy a obchodu, Odbor bezpečnosti potravín a výživy

**VEDECKÉ HODNOTENIE RIZIKA Z VÍRUSOV
V POTRAVINÁCH**

Správu vypracovala: RNDr. Júlia Habovštiaková

Bratislava
Október 2009

Obsah

Abstrakt/ Abstract	4
Kľúčové slová/ Keywords	6
1. Úvod	7
2. Vírusové nákazy prenosné potravinami	8
2.1 Norovírus (NoV).....	10
2.2 Vírus hepatitídy typu A (HAV).....	12
2.3 Rotavírus (HRV).....	13
2.4 Vírus hepatitídy typu E (HEV).....	13
2,5 Novo objavené vírusy (Nipah vírus, HPAI-H5N1, SARS).....	14
3. Epidemiológia	15
4. Cesty prenosu	16
4.1 Infikované ľudské feces.....	16
4.2 Infikovaní jedinci podieľajúci sa na spracovávaní potravín.....	17
4.3 Zoonotický prenos.....	18
5. Prežívanie a stabilita vírusov v potravinách a prostredí	19
5.1 Proces spracovania potravín a stabilita vírusov.....	20
5.2 Inaktivácia enterických vírusov.....	21
5.2.1 Dekontaminácia rúk.....	21
5.2.2 Dekontaminácia povrchov.....	21
5.2.3 Spôsoby inaktívacie Norovírusu.....	21
6. Metódy detekcie	23
6.1 Metódy detekcie - aktuálny stav a ich dopad na detekciu a kontrolu.....	23
6.2 Molekulárna epidemiológia.....	25
6.3 Potenciálne indikátory vírusovej kontaminácie.....	25

7. Potraviny prioritne kontaminované vírusmi.....	27
7.1 NoV a HAV v lastúrnikoch.....	27
7.2 NoV a HAV v ovocí, zelenine, bobuľovitých plodoch.....	28
7.3 NoV, HAV a manuálna príprava potravín.....	29
7.4 Voda ako zdroj kontaminácie HRV a NoV.....	29
7.5 HPAI, HEV a Nipah vírus.....	29
8. Preventívne opatrenia.....	30
8.1 Lastúrniky – „see food“.....	30
8.2 Ovocie, zelenina, bobuľovité plody – „fresh produce“.....	31
8.3 Manipulácia s potravinami – príprava pokrmov.....	31
9. Závery a odporúčania.....	33
9.1 Závery.....	33
9.1.1 Vírusy prenosné potravinami a ich prevalencia.....	33
9.1.2 Prežívanie vírusov na potravinách a v prostredí.....	33
9.1.3 Cesty prenosu.....	34
9.1.4 Metódy detekcie.....	35
9.1.5 Potraviny s najväčším rizikom kontaminácie vírusmi.....	35
9.1.6 Hodnotenie rizika.....	36
9.1.7 Manažment rizika.....	36
9.2 Odporúčania.....	37
9.2.1 Vírusy prenosné potravinami a ich prevalencia.....	37
9.2.2 Metódy detekcie.....	37
9.2.3 Ciele do budúcnosti.....	38
10. Literatúra	41
11. Zoznam skratiek	53

Abstrakt

Predmetom tejto práce sú vírusy ako potenciálne riziko pre verejné zdravie, v prípade, že sa nachádzajú v potravinách. Vírusy si vyžadujú špeciálnu pozornosť, nakoľko sa správajú odlišne od baktérií. Taktiež v súčasnosti používané kontrolné opatrenia buď nie sú štandardizované a tak je málo známe o ich účinnosti na vírusy, alebo nie sú efektívne v kontrole vírusovej kontaminácie. Údaje z najnovších štúdií poukazujú na to, že alimentárne infekcie vírusového pôvodu sú veľmi časté v mnohých častiach sveta, dokonca i tam kde sú zavedené opatrenia na redukciu bakteriálnej kontaminácie.

Vírusy predstavujú hlavnú príčinu infekčných intestinálnych ochorení. Údaje o prevalencii sú však nedostatočné, chýbajú monitorovacie systémy a tie ktoré sú k dispozícii nedokážu preukazateľne stanoviť, akým percentom sa podieľajú potraviny na celkovom množstve vírusových intestinálnych ochorení.

Norovírus (NoV) a vírus hepatitídy typu A (HAV) predstavujú najčastejšie sa vyskytujúce vírusy prenosné potravinami. Potraviny s najväčším rizikom kontaminácie sú lastúrniky, ovocie, zelenina a bobuľovité plody (tzv. „fresh produce“) a potraviny určené na priamu spotrebu bez tepelnej úpravy. Výber uvedených komodít a vírusov bol uskutočnený na základe kritérií ako sú: závažnosť vyvolaného ochorenia, incidencia/ prevalencia, pravdepodobnosť vystavenia rizika, vplyv obchodu, dosah na verejné zdravie a schopnosť kontrolovať infekcie pochádzajúce z potravín. Taktiež sa stanovili tri hlavné spôsoby kontaminácie potravín: a) ľudský fekálny materiál, b) infikovaný jedinci manipulujúci s potravinami, c) zoonotický prenos.

Pre adekvátnu kontrolu alimentárnych nákaz vírusového pôvodu je nutné zabezpečiť: zvýšenie povedomia ohľadom potenciálu šírenia infikovanými jedincami, podieľajúcimi sa na spracovaní potravín a príprave pokrmov; optimalizovanie a štandardizovanie metód detekcie vírusov prenosných potravinami; zdokonalenie laboratórnych postupov s cieľom zachytiť rozsiahlejšie nákazy v skorej fáze; vyvinúť kvalitatívne kontrolné parametre

špecifické pre vírusovú kontrolu; zobrať do úvahy úlohu vírusov ako potravinami - prenosných patogénov pri tvorbe HACCP plánov; informovať konzumentov o rizikách, ktoré predstavujú potravinami prenosné vírusy; a lepšie pochopenie prenosu a rizika cez aplikáciu hodnotenia rizika.

Abstract

This report draws attention to the threat of viruses as a risk to public health when they are present in food. Viruses require special attention because they behave differently from bacteria. Moreover currently used control measures either have not been standardized and there is not a good understanding of their efficacy towards viruses, or are not effective in controlling virus contamination. Data from recent studies have shown that foodborne viral infections are very common in many parts of the world despite the measures already in place to reduce bacterial contamination.

The viruses play a major role in the burden of infectious intestinal disease. It was noted that under-reporting, the lack of surveillance systems and the inability of existing systems to determine the proportion of viral intestinal illness that is foodborne.

The virus-commodity combinations of highest priority are Noroviruses and Hepatitis A virus in shellfish, fresh produce (fruit, vegetable and berries) and prepared foods. Prioritization was done according to the following criteria: disease severity, incidence/ prevalence, probability of exposure, trade impact, public health cost and ability to control foodborne infections. There were identified three major routes of viral contamination of food: a) human sewage and faeces, b) infected food handlers, c) animal for zoonotic viruses.

To adequately control foodborne viral infections it is necessary to: heighten awareness of the potential for transmission by infected food handlers; optimize and standardize methods for detection of foodborne viruses; enhance laboratory-based surveillance to detect large common-source outbreaks at an early stage;

develop quality control measures specifically for virus control; take into consideration the role of viruses as foodborne pathogens in the development of HACCP plans; inform consumers of the risks presented by foodborne viruses; and better understanding transmission and risk through the application of risk assessment.

Kľúčové slová: enterické vírusy, alimentárne nákazy vírusového pôvodu, cesty prenosu, RT-PCR, hodnotenie rizika

Keywords: enteric viruses, foodborne viral outbreaks, route of transmission, RT-PCR, risk assessment

1. Úvod

V posledných rokoch sú vírusy čoraz častejšie rozpoznávané ako príčina ochorení objavujúcich sa po požití potravín. Prvú kategóriu predstavujú potraviny, ktoré sú minimálne tepelne opracované tak ako lastúrniky, či komodity na priamu spotrebu: zelenina, ovocie, bobuľovité plody. Ku kontaminácii tejto skupiny potravín dochádza prevažne ešte v primárnom produkčnom prostredí. Druhú skupinu predstavujú potraviny, ktoré sa tepelne neupravujú a ku kontaminácii ktorých dochádza počas prípravy od infikovaných ľudí (personál v reštauráciách, baliči potravín,...).

Vírusy si vyžadujú špeciálnu pozornosť nakoľko sa charakterom, aj správaním odlišujú od baktérií a kontrolné opatrenia používané na ich elimináciu nie sú štandardizované a ich účinok nie je jednoznačný. Údaje z posledných štúdií poukazujú na to, že vírusové infekcie vyvolané požitím potravín sú veľmi časté na celom svete, napriek opatreniam na elimináciu bakteriálnej kontaminácie. Donedávna neexistovali účinné analytické nástroje detekcie. Tento problém bol čiastočne prekonaný v posledných rokoch, keď sa zdokonalili postupy na detekciu a identifikáciu vírusov z potravín a klinických vzoriek, čo prispelo k vytvoreniu reálnejšieho obrazu o prevalencii týchto vírusov a následnému zdokonaleniu stratégie prevencie a kontroly.

Hlavnú skupinu vírusov prenosných potravinami predstavujú vírusy infikujúce gastrointestinálny trakt. Sú vylučované stolicou, alebo pri zvracaní. Spomedzi týchto vírusov patrí dominantné postavenie Norovírusu (NoV) a vírusu hepatitídy typu A (HAV). Ďalšie, aj keď menej časté sú Rotavírusy, Enterovírusy a Astrovírusy (Koopman & Duizer 2004). Bežnými symptómami vírusovej gastroenteritídy sú hnačky a zvracanie. Asymptomatické infekcie sú však taktiež bežné. Aj keď sú potraviny jednoznačne určené ako potenciálny zdroj vírusovej infekcie, počet ochorení, ktoré môžu byť pripísané konzumácii kontaminovaných potravín, nie je známy.

2. Vírusové nákazy prenosné potravinami

Vírus predstavuje biologický systém infikujúci živé bunky v biologických organizmoch. Veľkosť vírusov sa pohybuje v rozmedzí od 0,02 do 0,4 mikrometra, na rozdiel od baktérií, ktoré sú veľké 0,5 až 5 mikrometrov. Vírusy sú obligátne intracelulárne parazity, čo znamená, že sa môžu replikovať len vo vnútri živej bunky, pretože nemajú vlastný biosyntetický aparát. Genetický materiál vírusov je zaznamenaný vo forme DNA alebo RNA, ktoré môžu byť v jednovláknovej alebo dvojitovláknovej forme. Z hľadiska tvaru, veľkosti a zloženia existujú pomerne jednoduché vírusy, ktoré majú genóm uložený len v jednoduchom proteínovom obale (kapside). Takto je to u väčšiny vírusov prenosných potravinami. Druhú skupinu predstavujú zložitejšie vírusy so segmentovaným genómom uloženým v komplexnom proteínovom kapside, ktorý môže byť navyše ešte obalený ďalšou vrstvou zloženou z lipidov a glykoproteínov. Štruktúra vírusových častíc podmieňuje ich rezistenciu v prostredí. Vírusy so zložitejšou, komplexnou štruktúrou sú menej rezistentné.

Vírusy zapríčiňujú široký rozsah ochorení tak u rastlín ako zvierat a ľudí. Jednotlivé skupiny vírusov sa vyznačujú tropizmom k určitého typu buniek, alebo tkanív, ktoré využívajú na množenie. Tak isto cesty prenosu vírusov sú rôzne: kvapôčková infekcia, fekálno-orálna cesta prenosu, sexuálny styk, kontakt s infikovaným zvieratom (zoonotické vírusy), infikovanou krvou, prenos prostredníctvom vektora (kliešte, moskyty).

NoV a HAV predstavujú najčastejšiu príčinu infekcií vzniknutých po požití potravín. V tejto súvislosti sa spomínajú aj ďalšie vírusy ako sú Rotavírus (HRV), vírus hepatitídy typu E (HEV), Astrovírus, Aichi vírus, Sapovírus, Enterovírus, Coronavírus, Parvovírus a Adenovírus. Predpokladá sa, že zoznam týchto vírusov môže byť dokonca dlhší. Z hľadiska symptómov rozlišujeme viacero skupín: a) vírusy vyvolávajúce gastroenteritídy (NoV, HRV, Astrovírus, Aichi vírus, Adenovírus a Sapovírus), b) vírusy spôsobujúce entericky prenosné hepatitídy (HAV, HEV – vyznačujú sa tropizmom k pečeni, kde vyvolávajú

ochorenie), c) vírusy replikujúce sa v zažívacom trakte, ale ochorenie vyvolávajú po migrácii do iných orgánov, tak ako centrálny nervový systém (Enterovírus). Všetky uvedené vírusy sú vylučované ľudskou stolicou a k infekcii ďalších ľudí dochádza orálnou cestou. Väčšina z nich obsahuje genóm vo forme jednovláknovej RNA uloženej v jednoduchom kapside, bez vonkajšieho obalu. Výnimku predstavujú HRV (dvojvláknovú RNA), Adenovírusy a Parvovírusy (DNA vírusy) a Coronavírus, ktorý obsahuje vonkajší obal. Vo všeobecnosti sa tieto vírusy vyznačujú zvýšenou rezistenciou v prostredí a sú dokonca schopné prežiť proces, ktorý sa rutinne používa na inaktiváciu bakteriálnych patogénov v potravinách.

Okrem vyššie spomínaných vírusov, existujú ďalšie nebezpečné vírusy, u ktorých bol zaznamenaný príležitostný prenos potravinami, napriek tomu, že ich typické cesty prenosu sú odlišné. Medzi takéto vírusy patria SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome), HPAI (High Pathogenic Avian Influenza virus).

Charakteristické pre vírusy prenosné potravinami a s nimi asociovaných ochorení je:

- Vírusy potrebujú na replikáciu živú bunku. Na rozdiel od baktérií sa v potravinách nikdy nemnožia. V dôsledku toho vírusová kontaminácia potravín nespôsobuje zmenu alebo znehodnotenie ich organoleptických vlastností.
- Infikovaný človek, ale aj bezpríznakový nosič vylučuje stolicou, alebo pri zvracaní veľké množstvo vírusových častíc (10^7 vírusových častíc/1g stolice), pričom na vyvolanie infekcie a následného ochorenia stačí len niekoľko vírusových častíc (1-100).
- Väčšina vírusov prenosných potravinami neobsahuje vonkajší obal, čo podmieňuje ich značnú stabilitu v prostredí mimo hostiteľa (rezistencia voči chladu a mrazu, extrémnemu pH (menej ako 3-4; viac ako 9-10), vysušeniu, UV radiácii, teplote, tlaku,

dezinfekcii...). Prežívajú týždne až mesiace vo vode, morskom sedimente, v lastúrnikoch alebo na rozličných neživých povrchoch.

- Chlad a zmrazenie chráni tieto vírusy a dokonca sa predpokladá, že zvyšuje ich odolnosť v prostredí. Teplota a vysušenie sú vhodné na inaktiváciu, ale účinnosť týchto procesov môže byť ovplyvnená druhom vírusu a typom potravinovej komodity.
- Vírusy tak ako NoV a HAV sú vysoko infekčné a šíria sa hlavne medziľudským kontaktom. Sekundárne šírenie, napr. prostredníctvom potravín je taktiež bežné a jeho výsledkom bývajú často krát väčšie a dlhotrvajúcejšie epidémie.
- Väčšina dezinfekčných prostriedkov nie je dostatočne účinná na inaktiváciu neobalených vírusov. Odporúča sa starostlivé umytie rúk pod tečúcou vodou.
- S výnimkou HEV, prenos zoonotických vírusov prostredníctvom potravín nie je bežný (na rozdiel od bakteriálnych patogénov, ako sú napr. *Salmonella* a *Campylobacter* spp.).

Počas konferencie „Vírusy v Potravinách“ organizovanej FAO a WHO v roku 2007, boli NoV a HAV určené za vírusy s najväčším dosahom na bezpečnosť potravín. Tento výber bol urobený na základe incidencie ochorení vzniknutých po požití potravín, vážnosti ochorenia v rátane mortality a potenciálu prenosu cez potraviny. HAV a HRV boli označené za potravinovo prenosné vírusy spôsobujúce vážne ochorenia so závažnou mortalitou (FAO and WHO, Viruses in food: scientific advice to support risk management activities – meeting report, Bilthoven 2007).

2.1 Norovírus (NoV)

Čeľaď *Caliciviridae* tvoria malé (28 – 35 nm), neobalené vírusy sférického tvaru, ktorých génom tvorí jednovláknová (single-stranded) RNA pozitívnej polarity. Do čeľade *Caliciviridae* zaraďujeme 4 rody: *Vesivirus*, *Lagovirus*,

Norovírus a *Sapovírus* (Green *et al.* 2000). Vírusy patriace do prvých dvoch rodov vyvolávajú infekcie u zvierat. Ich zoonotický potenciál sa zatiaľ jednoznačne nepotvrdil (Smith *et al.* 1998). Norovírus a Sapovírus vyvolávajú gastroenteritídy u ľudí. Norovírus bol nedávno určený ako oficiálny rodový názov pre skupinu vírusov, predtým nazývaných aj ako „Norwalk-like vírusy“ (NLV), calicivírusy (podľa názvu čel'ade), alebo small round structured viruses-SRSVs (podľa ich morfológického tvaru). Rod Sapovírus, bol predtým nazývaný aj ako „Sapporo-like virus“ (SLV) alebo klasický calicivírus. Pomenovanie Norovírus je odvodené od názvu pôvodného vírusového kmeňa „Norwalk vírus“, ktorý bol pôvodcom epidémie gastroenteritídy na základnej škole v meste Norwalk, štát Ohio, v roku 1968.

V súčasnosti rozlišujeme 5 genotypov norovírusov (GI, GII, GIII, GIV, GV). Genotypy GI, GII a GIV sú humánne; a genotypy GIII a GV sú animálne. Donedávna boli ľudia považovaný za jediný rezervoár NoV. Objavenie sa príbuzných vírusov u prasiat a hovädzieho dobytká poukázalo na možnosť zoonotického prenosu NoV, ktorý však doteraz nebol jednoznačne potvrdený.

NoV je vysoko infekčné agens. Na vyvolanie infekcie stačí 10 vírusových častíc. Inkubačná doba trvá priemerne 12 až 48 hodín. Ochorenie sa prejavuje náhlou nevoľnosťou, zvracaním, brušnými kŕčmi a vodnatými nekrvavými hnačkami. Ďalšími príznakmi sú mierne zvýšená teplota, bolesti hlavy a svalov, pocit chladu. Najbežnejšou komplikáciou je dehydratácia, hlavne u detí, starých ľudí a oslabených jedincov, čo si môže vyžadovať až hospitalizáciu. Vo všeobecnosti však ide o mierne ochorenie, ktoré samo pozvoľne zanikne v priebehu 12-60 hodín (klinické príznaky ochorenia) (Kapikain *et al.* 1996; Kaplan *et al.* 1982). Uzdravenie je zvyčajne úplné bez dlhotrvajúcejších následkov. Smrť v dôsledku infekcie NoV bola síce zaznamenaná, ale príčina smrti nebola jednoznačne potvrdená (Djuretic *et al.* 1996). Infikovaný človek šíri vírusové častice vo veľkom počte stolicou alebo pri zvracaní a to počnúc inkubačnou periódou, počas akútnej fázy ochorenia a dokonca aj po odznení

klinických príznakov (imuno-kompetentní pacienti – aj tri týždne po odznení klinických príznakov, imunosuprimovaní pacienti aj dlhšie) (Graham *et al.* 1994; Greenberg *et al.* 1979; Kaplan *et al.* 1982; Rockx *et al.* 2002).

NoV sa šíria primárne fekálno-orálnou cestou, buď konzumáciou fekálne kontaminovaných potravín a vody, alebo medziľudským kontaktom. Ďalší spôsob prenosu je aerosolom pri zvracaní, kedy môže dôjsť ku kontaminácii predmetov alebo priamo k ingescii aerosólu obsahujúceho vírus.

O imunite voči NoV existuje málo poznatkov. Pri experimentálnej infekcii dobrovoľníkov sa zistilo, že človek je chránený proti opätovnej infekcii, ale iba na krátky čas (niekoľko mesiacov) a len voči rovnakému alebo príbuznému NoV kmeňu ako bol NoV, ktorý imunitnú odpoveď pôvodne vyvolal (Hale *et al.* 1999; Noel *et al.* 1997). V dôsledku vysokej genetickej variability NoV, sa človek môže počas svojho života opätovne nakaziť. Vakcína v súčasnosti nie je dostupná. Existuje hypotéza, že vnímavosť voči NoV infekcii môže byť geneticky podmienená. Tak napr. ľudia s krvnou skupinou O sú viac náchylní voči vážnej NoV infekcii.

2.2 Vírus hepatitídy typu A (HAV)

HAV vyvoláva akútnu vírusovú hepatitídu. Výskyt HAV je v jednotlivých krajinách rôznorodý. V rozvojových štátoch je väčšina ľudí infikovaná v skorom detskom veku a infekcia je asymptomatická u viac ako 90% detí mladších ako 5 rokov. V skutočnosti sú všetci dospelí imúnni. V rozvinutých krajinách je infekcia HAV menej bežná, čo je dôsledok vyššieho životného štandardu. Len málo jedincov je infikovaných v skorom detskom veku a väčšina dospelých je vnímavá voči infekcii HAV. V neskoršom veku je infekcia HAV symptomatická u viac ako 80% infikovaných jedincov a výsledkom môže byť vážne ochorenie (Koopmans & Duizer 2004; Pintó and Sáiz 2007). Inkubačná doba HAV trvá minimálne 2 týždne a maximálne 6 týždňov (v priemere 28 dní). Najrizikovejšie obdobie nakazenia je približne jeden až dva týždne pred vypuknutím ochorenia.

Vírus sa vylučuje vo veľkom množstve ($>10^6$ vírusových častíc/ 1 g) stolicou (posledné dva týždne inkubačnej doby až do 5 týždňa ochorenia). Aj keď sa väčšina chorých relatívne bez problémov vylieči, musí byť každý desiaty z nich hospitalizovaný. Liečba spravidla trvá štyri až osem týždňov (ojedinele až 18 mesiacov). Vakcína proti HAV je bežne dostupná.

2.3 Rotavírus (HRV)

Rotavírusom patrí vedúce postavenie medzi vírusovými pôvodcami gastroenteritíd u dojčiat a detí. V rozvojových krajinách sú hnačky vyvolané HRV jednou z najčastejších príčin úmrtia detí v prvých rokoch života, ako výsledku prudkej a masívnej dehydratácie zapríčinennej produkciou vírusových toxínov. Primárny spôsob prenosu HRV je medziľudský kontakt, ale v oblastiach s nedostatočnou hygienou zohráva dôležitú úlohu aj prenos potravinami a vodou.

2.4 Vírus hepatitídy typu E (HEV)

HEV predstavuje akútnu hepatitídu vyskytujúcu sa endemicky, v oblastiach so slabým hygienickým štandardom. HEV je najčastejšou príčinou vírusovej hepatitídy u ľudí v rozvojových krajinách. Najväčšie nebezpečenstvo predstavuje pre tehotné ženy, kde môže vyvolať vážne ochorenie s vysokým rizikom úmrtia. Za hlavný spôsob prenosu sa považuje fekálne kontaminovaná voda. V rozvinutých krajinách sa HEV vyskytuje len sporadicky a je to skôr ochorenie nadobudnuté pri cestovaní. V nedávnej dobe bol z ošípaných izolovaný kmeň HEV, ktorý bol daný do súvislosti s infekciou u ľudí, čím sa potvrdil zoonotický charakter tohto vírusu. Prenos prostredníctvom konzumácie surového, alebo slabo tepelne upraveného mäsa bol zaznamenaný, nie je však celkom jasné do akej miery je táto cesta prenosu dôležitá z epidemiologického hľadiska. Prítomnosť HEV RNA a infekcia HEV bola zaznamenaná u komerčne

dostupnej prasacej pečene v Japonsku, USA a Holandsku (Yazaki *et al.* 2003; Feagins *et al.* 2007; Rutjes *et al.* 2007).

2.5 Novo objavené vírusy (Nipah vírus, HPAI – Highly Pathogenic Avian Influenza, SARS – causing Coronavirus)

Hoci sa pôvodne nepredpokladalo, že by sa primárne respiračné patogény: Nipah vírus, HPAI vírus a SARS-CoV šírili aj fekálno-orálnou cestou, prenos týmto spôsobom už bol zaznamenaný. Tak napr. vírus vtácej chrípky bol izolovaný z mrazeného exportovaného mäsa, čo poukazuje na možnosť diseminácie týchto vírusov cez potravinový reťazec. Hoci tento spôsob šírenia nie je typický pre uvedené vírusy, vážnosť následkov s ním spojených si vyžaduje mimoriadnu pozornosť upriamenú aj na túto oblasť.

3. Epidemiológia

Epidémie vyvolané vírusovou kontamináciou potravín boli zaznamenané vo všetkých častiach sveta. Avšak údaje z rozvojových krajín sú nedostatočné, s výnimkou štúdií výskytu HRV u detí. Tiež v rozvinutých krajinách nie je obraz výskytu vírusov prenosných potravinami celkom reálny.

Vo väčšine krajín neexistuje monitorovanie výskytu NoV, aj napriek tomu, že ide o jedného z najvýznamnejších pôvodcov gastroenteritíd. Ak sú aj údaje prístupné, nie je stanovené, akú časť z celkového počtu ochorení norovírusového pôvodu tvoria potraviny z hľadiska zdroja infekcie. Spoľahlivým dôkazom by bolo nájdenie identického vírusu u pacienta a u potraviny ním konzumovanej. Takáto analýza sa však vykonáva veľmi zriedkavo.

Štúdia vo Veľkej Británii odhalila, že rutinným vyšetrením sa zistila len 1 z 1562 norovírusových infekcií (Wheeler *et al.* 1999). Je to spôsobené viacerými dôvodmi: NoV vyvoláva sporadické ochorenie, ktoré samovoľne zanikne; postihnutí väčšinou nevyhľadajú lekársku pomoc; klinické diagnostické metódy nie sú bežne dostupné; pátranie po zdroji nákazy sa často krát podceňuje. Navyše neexistujú skoro žiadne údaje o prevalencii NoV v potravinách v obchodnej sieti. Našťastie vo viacerých štátoch prebiehali štúdie, ktoré priniesli viac svetla do tejto problematiky: štúdia v Holandsku poukázala na vážne podcenenie možnej súvislosti NoV infekcie s prípadmi úmrtia starých ľudí (van Asten *et al.*). Na Novom Zélande bol NoV umiestnený medzi 3 najčastejšie príčiny ochorení vzniknutých po požití potravín (Cressy & Lake 2007). Hetlund *et al.* (2000) na základe výsledkov svojho prieskumu určil NoV za najčastejšieho pôvodcu gastroenteritíd vo Švédsku. Podobne kalícivírusy boli určené za primárnu príčinu epidémií vo Fínsku (Maunula *et al.* 1999) a Nemecku (Schreier *et al.* 2000). Príležitostne sa vyskytujú NoV epidémie medzinárodného rozsahu. Tak tomu bolo v rokoch 2000/2001, kedy sa objavila veľká epidémia asociovaná s kontaminovanými lastúrnikmi a 2005/2006 epidémia asociovaná s kontaminovanými malinami.

4. Cesty prenosu

Enterické vírusy kontaminujúce potraviny sa šíria hlavne fekálno-orálnou cestou. K nákaze človeka tak dochádza konzumáciou fekálne kontaminovaných potravín. Tieto vírusy vstupujú do gastrointestinálneho traktu, prežívajú kyslé žalúdočné prostredie a následne vyvolávajú ochorenie. Postihnutý jedinec môže počas akútnej fázy ochorenia vylučovať až 10^7 infekčných vírusových častíc na gram stolice. Ďalším dôležitým faktorom je stabilita týchto vírusov mimo hostiteľa. Z toho vyplýva veľký potenciál pre kontamináciu potravín v celom potravinovom reťazci.

Samostatnú skupinu predstavujú animálne vírusy s potenciálom prenosu prostredníctvom potravín ako sú: HEV, HPAI-H5N1, SARS-CoV a Nipah vírus. Do potravinového reťazca vstupujú cez animálne produkty (mäso, vajcia), ako aj animálne feces.

Existujú tri základné spôsoby kontaminácie potravín vírusmi: infikované ľudské feces, infikovaní jedinci podieľajúci sa na spracovávaní potravín, zoonotický prenos.

4.1 Infikované ľudské feces

Tento spôsob prenosu bol objavený po zaznamenaní HAV infekcie u pracovníkov zabezpečujúcich čistenie odpadových vôd (Cadilhac & Roudot-Thoraval 1996). V súčasnosti je známe, že metódy bežne používané na čistenie odpadových vôd a účinné na baktérie, nezabezpečia dostatočnú inaktiváciu vírusov. Viaceré štúdie v Európe, Japonsku a USA ukázali, že ošetrená odpadová voda bola stále pozitívna na prítomnosť humánných enterických vírusov (van de Berg *et al.* 2005; Laverick, Wyn-Jones & Carter 2004; Ueki *et al.* 2005). Odpadová voda obsahujúca infikované ľudské feces preniká do povrchových a podzemných vôd a tak predstavuje hrozbu pre zdravie ľudí. Medzi rizikové potravinové komodity patria lastúrniky, ku nákaze ktorých

dochádza filtrovaním vody obsahujúcej infikované feces človeka. Ďalšiu dôležitú skupinu predstavujú plodiny, ktoré sú umelo zavlažované, premývané, alebo hnojené. Charakteristickým znakom takýchto nákaz je multivírusová kontaminácia, to znamená, že človek môže byť simultánne infikovaný viac ako jedným vírusovým kmeňom (Le Guyader *et al.* 2006a). Takýmto spôsobom vzniká priestor pre evolúciu nových vírusových kmeňov.

4.2 Infikovaní jedinci podieľajúci sa na spracovávaní potravín

Infikovaný jedinec vylučuje enterické vírusy buď stolicou alebo pri zvracaní. V infikovanej stolici sa môže nachádzať až 10^7 vírusových častíc. Množstvo vírusových častíc vylučovaných pri zvracaní nie je známe. Často krát ide o asymptomatickú infekciu. To znamená, že infikovaný jedinec je bezpríznakovým nosičom a šíriteľom vírusu. Už 12 hodín po vniknutí vírusu do organizmu môže dôjsť k vylučovaniu vírusu stolicou a toto vylučovanie môže pokračovať pomerne dlhú dobu aj po zotavení.

Vysoko rizikovú skupinu predstavujú ľudia podieľajúci sa na zbere, balení a príprave potravín. Zdrojom nákazy pre potraviny sú kontaminované ruky. Ku kontaminácii rúk dochádza pri nedodržiavaní hygienických zásad, hlavne pri používaní toaliet. Vírusy sa z rúk prenášajú nielen na potraviny, ale aj na pracovné povrchy, ktoré tak predstavujú sekundárny zdroj kontaminácie (Bidawid, Farber & Sattar 2000). Ku kontaminácii potravín ako následku ľudskej manipulácie môže dôjsť vo všetkých stupňoch procesu spracovania danej potravinovej komodity: od zberu a balenia, až po prípravu pokrmov.

Ďalším dôležitým zdrojom enterických vírusov je aerosól pri zvracaní. NoV infekcia veľmi často indukuje náhle zvracanie s prudkým nástupom. Aerosól obsahujúci vírus sa šíri do okolitého prostredia a kontaminuje pracovné povrchy a predmety (Boone & Gerba 2007). Veľká odolnosť týchto vírusov v prostredí, ich rezistencia voči čistiacim a dezinfekčným prostriedkom sú faktory, ktoré favorizujú spomínané cesty prenosu.

4.3 Zoonotický prenos

Pod pojmom zoonotická infekcia sa rozumie prenos animálneho agens (vírusu) na človeka, napr. prostredníctvom infikovaného mäsa alebo iných animálnych produktov. Existuje predpoklad prenosu HEV prostredníctvom tepelne neopracovaného jelenieho a diviacieho mäsa, prípadne pečene (Takahashi *et al.* 2004). Tento vírus bol tiež detegovaný v mäse, orgánoch a truse ošípaných. Napriek tomu, že bol HEV zachytený u ošípaných v mnohých krajinách sveta, existencia jeho zoonotického prenosu nie je stále potvrdená (Feagins *et al.* 2007).

HPAI-H5N1 bol detegovaný v hydinových mäsových produktoch (Tumpey *et al.* 2002) a na základe ďalších zverejnených údajov existuje predpoklad, že k infekcii človeka môže dôjsť aj alimentárnou cestou (Kuiken *et al.* 2004; Songserm *et al.* 2006). V Hong Kongu bolo množstvo ľudí infikovaných SARS Coronavírusom, pričom orálna cesta nákazy nebola vylúčená (McKinney, Gong & Lewis 2006). Taktiež bola zaznamenaná infekcia Nipah vírusu u ľudí a ošípaných, pričom zdrojom infekcie bolo kontaminované ovocie (Luby *et al.* 2006).

5. Prežívanie a stabilita vírusov v potravinách a prostredí

Vírusy sú na rozdiel od baktérií striktne intracelulárne parazity, vo vode a potravinách sa nemnožia. Množstvo vírusu v potravinách počas spracovania, transportu alebo skladovania nerastie. V potravinách prežívajú veľmi dlho a aj veľmi malé množstvo vírusu je schopné vyvolať ochorenie. Navyše vírusmi kontaminované potraviny nemajú pozmenené senzorické vlastnosti.

Faktorom, ktorý významne ovplyvňuje riziko vzniku infekcie je stabilita vírusov v prostredí. Väčšina potravinami alebo vodou prenosných vírusov je značne rezistentných voči teplote, extrémnemu pH a dezinfekčným prostriedkom. HRV prežíva v aerosóle generovanom počas zvracania do 9 dní pri teplote 20°C (Sattar *et al.* 1984). Vírusy však prežívajú oveľa dlhší čas (cca 60 dní), na rozličných materiáloch bežne používaných vo všetkých oblastiach života, ako sú napr. papier, bavlnená látka, hliník, porcelán, obkladačky, latex a polystyrén (Abad, Pinto & Bosch 1994). Vlhkosť prostredia je faktor, ktorý vplýva na jednotlivé vírusy rôzne. Relatívne vysoká vlhkosť prostredia zlepšuje prežívanie Enterovírusov. Naopak nízka vlhkosť prostredia favorizuje prežívanie HAV a HRV (Mbithi, Springthorpe & Sattar 1991; Sattar *et al.* 1986, 1988). Adenovírusy prežívajú do 35 dní na plastových povrchoch pri relatívne nízkej vlhkosti prostredia (Nauheim *et al.* 1990). Vo vysušenom feces zostáva HAV infekčné pri 25°C a 42% vlhkosti 30 dní (Holliger & Ticehurst 1996). Enterickým vírusom sa darí tak v sladkej (Morris 1984), ako aj morskej vode (Wyer & Kay 1993), dokážu prežiť v lastúrnikoch a morskom sedimente niekoľko týždňov, ba až mesiacov (Le Guyader *et al.* 2006b; Greening *et al.* 2003; Sobsey *et al.* 1988) a ani purifikačný proces nedokáže vírusy kompletne odstrániť (Lees 2000; Loisy *et al.* 2005). Navyše enterické vírusy sú schopné prežívať na povrchu čerstvého ovocia a zeleniny (tzv. „fresh produce“) dobu, ktorá dávno presahuje dátum ich spotreby (Crocì *et al.* 2002).

5.1 Proces spracovania potravín a stabilita vírusov

Enterické vírusy sú odolné voči mnohým postupom bežne používaným na ochranu potravín pred nežiaducou mikroflórou, alebo vplyvmi prostredia, ktoré spôsobujú znehodnotenie potravín. Sú pomerne rezistentné voči ionizujúcemu žiareniu a dávka, ktorá je ich schopná inaktivovať už má negatívny vplyv na organoleptické vlastnosti potravín. Chladenie a hlavne zmrazovanie má dokonca ochranný účinok na tieto vírusy (Papafragkou, D'Souza & Jaykus 2006).

V dôsledku vysokej odolnosti enterických vírusov v procese spracovania potravín, sa dôraz kladie na prevenciu kontaminácie, ide hlavne o prevenciu tzv. a) pred-zberom (ovocie, zelenina – tzv. „fresh produce“, lastúrniky) a b) po-zbere – počas prípravy pokrmov.

Norovírus a jeho stabilita v prostredí

V súčasnosti je ešte stále relatívne málo informácií o stabilite NoV, v dôsledku absencie *in vitro* kultivačného systému. Údaje, ktoré existujú, pochádzajú z epidemiologických štúdií reálnych nákaz, alebo z experimentov vykonaných na dobrovoľníkoch.

NoV sa množí v gastrointestinálnom trakte, je acido-stabilný, odolný voči kyslému žalúdočnému prostrediu. Bol zaznamenaný prípad, keď ľudia ochoreli na gastroenteritídu NoV pôvodu, potom ako skonzumovali lastúrniky naložené v octovom náleve.

Chladenie a mrazenie ma podporný účinok na zachovanie infekivity NoV. Mrazené potraviny (hlavne ovocie a zelenina), ktoré sa konzumovali priamo po rozmrazení a bez tepelnej úpravy boli zdrojom veľkého množstva epidémií NoV pôvodu. Rizikové sú tiež potraviny, ktoré sa len minimálne tepelne opracúvajú, ako sú napr. lastúrniky.

NoV veľmi dobre prežíva v prostredí na najrozličnejších predmetoch, povrchoch a pracovných plochách. Bolo zaznamenaných množstvo nákaz v domácnostiach, nemocniciach, výletných lodiach. NoV bol izolovaný zo

sterov urobených v prostredí (Le Guyader 1994; Cheesbrought *et al.* 1997). NoV je stabilný aj pri pomerne vysokej koncentrácii chlóru. Taktiež salinita prostredia nemá na jeho prežívanie väčší dopad (Dolin *et al.* 1972).

5.2 Inaktivácia enterických vírusov

5.2.1 Dekontaminácia rúk

V súčasnej dobe neexistuje žiadny prípravok, ktorý by kompletne eliminoval enterické vírusy z rúk (Mattison *et al.* 2007). Poriadne umytie rúk pod silným prúdom tečúcej vody sa stále považuje, za najúčinnjší spôsob dekontaminácie rúk (Bidawid, Farber & Sattar 2000).

5.2.2 Dekontaminácia povrchov

Stabilita humánných enterických vírusov v prostredí, na najrozličnejších povrchoch závisí od viacerých faktorov, ako sú teplota, vlhkosť, typ povrchu, typ vírusu. Vo všeobecnosti tieto vírusy prežijú pri izbovej teplote na predmetoch a povrchoch aj týždne. Väčšina dezinfekčných prostriedkov používaných v domácnostiach na dezinfekciu plôch však nedokáže dostatočne inaktivovať uvedené vírusy. Kontaminované plochy sa tak stávajú zdrojom kontaminácie potravín (Papafragkou, D'Souza & Jaykus 2006).

5.2.3 Spôsoby inaktivácie Norovírusu

V súčasnosti neexistujú presné informácie o rezistencii NoV voči rozličným chemickým a fyzikálnym spôsobom inaktivácie.

Zahriatie na 100°C účinne inaktivuje NoV. Rovnaký účinok má UHT (Ultra-High-Temperature). Zahriatie na 60°C nie je postačujúce.

NoV sa dá tiež účinne odstrániť chlórovaním. Koncentrácia 10 mg chlóru/l stačí na inaktiváciu NoV. Uvedená koncentrácia sa však využíva ojedinele a to v prípade havarijných stavov (masívne zamorenie). Koncentrácia chlóru v pitnej

vode je 0,5-1 mg/l. Voči tejto koncentrácii je však NoV rezistentný, dokonca aj koncentrácia 3,75-6,25 mg/ l nie je postačujúca na jeho elimináciu.

6. Metódy detekcie

6.1 Metódy detekcie - aktuálny stav a ich dopad na detekciu a kontrolu

Ideálna detekčná metóda by mala byť jednoduchá, senzitívna, praktická a robustná. V prípade detekcie vírusov z potravín by mala navyše účinne eliminovať inhibítory molekulárnej detekcie a byť aplikovateľná na širokú škálu potravinových komodít. Docielenie tohto stavu je náročný proces a v súčasnosti sa ním zaoberá viacero pracovných skupín expertov z rôznych krajín. Momentálne sú validované len metódy detekcie vírusovej kontaminácie lastúrnikov. Metódy týkajúce sa ostatných komodít (ovocie, zelenina, potravinové komodity určené priamo na konzumáciu) sú len v štádiu štandardizácie a validácie.

Na dôkaz vírusov prenosných potravinami sa používajú molekulárno-biologické metódy, ktoré sú založené na dôkaze prítomnosti vírusovej nukleovej kyseliny. Sú to moderné, vysoko špecifické a citlivé metódy, v súčasnosti jediný účinný diagnostický nástroj na dôkaz prítomnosti vírusov v potravinách. Napriek tomu existuje viacero otázok, ktoré zostáva doriešiť:

- 1) V potravinách sa v porovnaní s klinickými vzorkami nachádza pomerne málo vírusových častíc, ktoré sú však vysoko infekčné. Dôraz sa preto kladie na odber dostatočne veľkej vzorky.
- 2) V dôsledku toho, že v potravine, alebo na jej povrchu sa nachádza málo vírusových častíc, je nevyhnutné vírus prioritne pred izoláciou jeho nukleovej kyseliny zakoncentrovať.
- 3) Jednotlivé potravinové komodity/matrice si vyžadujú špecifický prístup pri izolácii vírusu.
- 4) Mnohé potravinové komodity obsahujú inhibítory, ktoré môžu inhibovať, alebo interferovať s detekčnou metódou.

- 5) Molekulárna detekcia je dôkaz prítomnosti vírusového genómu, nie infekčného vírusu.
- 6) Hlavné potravinami prenosné vírusy: NoV a HAV sú zatiaľ nekultivovateľné v laboratórnych podmienkach.
- 7) Vysoká genetická variabilita NoV si vyžaduje neustálu selekciu vhodných primerov a prób.

Metódy detekcie vírusov z potravín je možné rozdeliť do dvoch fáz:

- a) *Príprava vzorky*: cieľom je zakoncentrovať vírus (zredukovanie objemu vzorky) a eliminovať inhibičný účinok interferujúcich substancií. Typická metóda zahŕňa filtráciu, centrifugáciu, adsorbciu, elúciu, rozpúšťanie, precipitáciu a organickú flokuláciu. Po týchto krokoch nasleduje samotná extrakcia vírusovej nukleovej kyseliny.
- b) *Detekcia vírusovej nukleovej kyseliny*: slúžia nasledovné molekulárno-biologické metódy: konvenčná RT-PCR, real-time PCR, sekvenčná analýza, micro-arrays.

Pri izolácii vírusovej nukleovej kyseliny z potravín je veľké riziko falošne negatívnych výsledkov, hlavne v dôsledku prítomnosti inhibítorov a malého počtu vírusových častíc v potravine alebo na jej povrchu. Na kontrolu izolačného procesu sa používa tzv. vnútorná kontrola izolácie (processing control), ako sú: Mengovírus, MuNoV, FCV alebo MS2 fág. Tieto kontrolné vírusy sa pridávajú do vzorky ešte pred začiatkom izolácie. S cieľovým vírusom majú podobné fyzikálno-chemické vlastnosti, majú nízky patogénny potenciál a vo vzorke ani prostredí sa prirodzene nevyskytujú.

V súčasnej dobe je konvenčná PCR, čoraz častejšie nahrádzaná real-time PCR. Je špecifickejšia (použitie špecifickej fluorescenčne značenej oligopróby), časovo menej náročná a riziko krížovej-kontaminácie (falošne pozitívny výsledok) je menšie. Taktiež umožňuje kvantitatívnu analýzu vzorky.

Momentálne sa vírusy rutinne vyšetrujú len v lastúrnikoch. Ostatné potravinové komodity sa testujú len sporadicky, hlavne v prípade rozsiahlejších nákaz. Detekcia vírusov z potravín je viacstupňový, finančne pomerne náročný proces, vyžadujúci vysoko technicky vybavené laboratórium a odborne vzdelaný personál.

6.2 Molekulárna epidemiológia

Molekulárno-biologické metódy (techniky genotypizácie vírusových kmeňov, sekvenačné analýzy) ako nástroj analýzy vírusového genómu viedli k možnosti porovnávania vírusových kmeňov a následnému lepšiemu pochopeniu epidemiológie vírusov. Priniesli možnosť odhalenia epidemiologického spojenia zdanlivo nesúvisiacich epidémií, často krát presahujúcich hranice štátov a možnosť vystopovať zdroj infekcie. Tak napr. ak je u viacerých pacientov nájdená identická vírusová sekvencia, môže ísť o spoločný zdroj infekcie (Beller *et al.* 1997; Berg *et al.* 2000; Marshall *et al.* 2001). Naopak, nájdenie rozdielnych vírusových sekvencií u pacientov s predpokladaným spoločným zdrojom infekcie, je indikátorom viacerých nezávislých zdrojov. Výnimku tvoria odpadové vody, ktoré môžu byť zdrojom multikmeňovej infekcie (Gray *et al.* 1997; Maunula *et al.* 1999). Pribúdaním údajov o diverzite vírusov a tvorbou databáz sa dáva priestor pre fylogenetické analýzy a porovnanie molekulárnej epidemiológie medzi jednotlivými krajinami.

6.3 Potenciálne indikátory vírusovej kontaminácie

Organizmy v súčasnosti považované za indikátory fekálneho znečistenia (koliformné baktérie, fekálne koliformné baktérie, fekálne streptokoky) sú nedostatočnými ukazovateľmi vírusovej kontaminácie.

Sľubnými kandidátmi sa stali bakteriofágy, v dôsledku ich fyzikálnej a genomickej podobnosti s humánnymi enterickými vírusmi. V odpadovej vode

sa nachádzajú v pomerne veľkom množstve a dajú sa ľahko detegovať (IAWPRC Study group on health related water microbiology 1991), (Havelaar 1987). Príkladom takéhoto bakteriofága je FRNA bakteriofág. Na základe štúdie prítomnosti FRNA bakteriofága v oblasti komerčného chovu ústrie v UK, kde bol neustále problém s vírusovou kontamináciou, sa došlo k záveru, že FRNA bakteriofág je oveľa vhodnejším ukazovateľom vírusovej kontaminácie v porovnaní s *E. coli* (Dore *et al.* 2000). Nevýhodou využitia FRNA bakteriofága ako indikátora vírusovej kontaminácie je to, že sa dá aplikovať len v oblastiach s kontinuálnym znečisťovaním odpadovými vodami. V prípadoch jednorazového znečistenia, napr. pri úniku obsahu septického tanku nemusí byť detegovaný.

7. Potraviny prioritne kontaminované vírusmi

Potravinové komodity najčastejšie spojené s vírusovými nákazami:

- NoV a HAV – lastúrniky (ústrice, mušle, škeble, srdcovky a slávky)
- NoV a HAV – čerstvé ovocie, zelenina, bobuľovité plody („fresh produce“)
- NoV a HAV – manuálne pripravované potraviny: šaláty, sendviče, studené mäsové oblohy, hamburgery,...
- HRT, NoV – voda (pitná voda, voda používaná na prípravu pokrmov, ľadové kocky používané na prípravu nápojov)
- HPAI – hydina, HEV – mäso a orgány ošípaných, Nipah virus – ovocie.

7.1 NoV a HAV v lastúrnikoch

Lastúrniky sú tzv. „filter feeders“ to znamená, že potravu (riasy) prijímajú filtrovaním vody. Ak je voda kontaminovaná vírusmi (NoV, HAV), lastúrniky ich akumulujú vo svojich telách, presnejšie v gastrointestinálnom trakte. Vírusy sa do vody dostávajú prostredníctvom splaškov obsahujúcich infikované ľudské fekálie. Nelegálne vypúšťanie odpadových vôd sa nachádza na celom svete. V prípade komerčne chovaných lastúrnikov ide poväčšine o ohraničenú, pobrežnú, plytkú oblasť, kde je veľký potenciál pre akumuláciu vírusu. Vírus prežíva týždne až mesiace vo vodnom stĺpci, na najrôznejších časticiach a tiež v sedimente (Callahan *et al.* 1995; Gantzer *et al.* 1998).

Ďalším zdrojom kontaminácie lastúrnikov môže byť infikovaný človek vykonávajúci vylupovanie z lastúr. Tento spôsob je síce teoreticky možný, ale nepripisuje sa mu prakticky žiadny význam.

Vírus v gastrointestinálnom trakte lastúrnikov perzistuje týždne až mesiace. Zistilo sa, že lastúrniky obsahujú špecifický receptor, na ktorý sa viaže NoV. To

by mohlo prispieť k vysvetleniu pretrvávania vírusu aj po aplikácii purifikačného procesu (Le Guyader *et al.* 2006b).

Lastúrniky bývajú veľmi častým zdrojom nákaz. Epidémie gastroenteritíd a hepatitídy typu A boli zaznamenané v mnohých krajinách sveta. Vysoké riziko súvisí predovšetkým so zvykom ich konzumovať celé (aj s tráviacim traktom) a v surovom stave (ústrice), alebo len slabo tepelne upravené (mušle, škeble, srdcovky, slávky) (Lees 2000; Jaykus *et al.* 1994).

7.2 NoV a HAV v ovocí, zelenine, bobuľovitých plodoch

Vo svete bolo zaznamenaných množstvo epidémií, kde zdrojom infekcie NoV alebo HAV boli napr. jahody, maliny, hlávkový šalát, cibuľa, paradajky (Pönkä *et al.* 1999; Hjertqvist *et al.* 2006; Falkenhorst *et al.* 2005; Le Guyader *et al.* 2004; Dentinger *et al.* 2001; Korsager *et al.* 2005; Cotterelle *et al.* 2005). Tieto potravinové komodity sú vysoko rizikové z dôvodu ich konzumácie v surovom stave bez predchádzajúcej tepelnej úpravy. Ak sú kontaminované a konzument ich pred požitím dôkladne neumyje, sú zdrojom nákazy. Vírus sa nachádza len na ich povrchu, nezaznamenalo sa, že by prenikal do rastliny cez poškodené pletivo.

Ku kontaminácii tejto skupiny potravín dochádza hlavne pri kontakte s vodou infikovanou ľudskými fekáliami. Deje sa to hlavne pri zavlažovaní a hnojení („kontaminácia pred-zberom“). Ovocie, zelenina, ako aj bobuľovité plody sa v súčasnosti pestujú v obrovských množstvách, na rozsiahlych pláňach, kde sa na zavlažovanie často krát používa neošetrená voda obsahujúca odpadové vody z domácností a miest, ktoré sú vysoko kontaminované vírusmi. Keď sa k tomu pridá medzinárodný predaj, epidémia presahujúca hranice štátu je na svete.

Ďalší možný spôsob kontaminácie je pri zbere, pričom zdrojom vírusov sú infikovaný zberači. Táto cesta prenosu je však veľmi zriedkavá a predstavuje zanedbateľné riziko.

7.3 NoV, HAV a manuálna príprava potravín

Do tejto skupiny patria potraviny na príprave, ktorých sa manuálne podieľa človek a po jeho manipulácii sa už tepelne neupravujú. Ide o záverečnú fázu prípravy, pri ktorej sa potraviny servírujú na stôl, krájajú, dotvárajú, aranžujú, balia. Ak jedinec infikovaný vírusom takýmto spôsobom manipuluje s potravinami, predstavuje zdroj infekcie a to prostredníctvom svojich rúk. Vo svete boli zaznamenané viaceré epidémie, kde boli zdrojom infekcie: šaláty, sendviče, studené mäsové oblohy, hamburgery, rôzne delikatesy. (Parashar & Monroa 2001; de Wit *et al.* 2007). Ďalší zdroj infekcie predstavujú pracovné plochy kontaminované infikovaným aerosólom pochádzajúcim zo zvracania. Veľký dôraz sa tu preto kladie na dodržiavanie hygienických zásad, hlavne po použití toaliet. Tak isto v stravovacích zariadeniach by sa za žiadnych okolností nemal pohybovať personál trpiaci zažívacími problémami. Návrat do práce by mal byť až po úplnej rekonvalescencii.

7.4 Voda ako zdroj kontaminácie HRV a NoV

Voda v najrozličnejších podobách predstavuje zdroj NoV a HRV infekcie. Bolo zaznamenaných množstvo epidémií, pri ktorých bola zdrojom nákazy buď pitná voda alebo voda použitá na prípravu pokrmov (Villena *et al.* 2003). Prítomnosť calicivírusov bola zaznamenaná v európskych riekach (Gilgen *et al.* 1997) a ľade (Kapikain *et al.* 1996).

7.5 HPAI, HEV a Nipah vírus

Pre túto skupinu vírusov nie je prenos potravinami typický, ale príležitostne sa môže vyskytnúť. Zdrojom infekčného HPAI vírusu môže byť nedostatočne tepelne upravená hydina alebo vajcia, HEV orgány alebo svalstvo ošípanej, Nipah vírusu ovocie (infikované trusom netopierov (Luby *et al.* 2006)).

8. Preventívne opatrenia

Z hľadiska prevencie kontaminácie potravín vírusmi je dôležité, aby každý jedinec prichádzajúci do kontaktu s potravinami, počnúc zberom na farmách a končiac prípravou pokrmov si bol vedomý dôležitosti dodržiavania hygienických zásad.

8.1 Lastúrniky – „see food“

Lastúrniky predstavujú špeciálnu skupinu potravinových komodít, ktoré sa konzumujú v surovom stave alebo po ľahkej tepelnej úprave. Tepelná úprava, ktorá by zabezpečila inaktiváciu NoV, znižuje chuťovú atraktivitu ústrie (McDonnell *et al.* 1997). S cieľom ochrániť konzumenta, boli komerčné produkčné zóny lastúrnikov rozdelené do troch kategórií:

Kategória A – najčistejšie produkčné zóny, bez výskytu NoV a HAV. Produkty z takýchto oblastí sú určené priamo na konzumáciu bez ďalšej úpravy.

Kategória B – sú to zóny, kde bol zaznamenaný výskyt vírusov. Produkty z týchto oblastí sa môžu predávať v obchodnej sieti, ale len po purifikačnom procese. Purifikácia bola prvýkrát použitá v UK v 20-tych rokoch 20-teho storočia (Dodgson 1928). Znamená premiestnenie lastúrnikov do čistej vody, najčastejšie v tankoch, kde sa zbavujú mikrobiálnej kontaminácie, teda aj vírusov. Použitá sterilná voda je ošetrovaná ozónom, chlóróm, UV žiarením (Roderik & Schneider 1994). Purifikačný proces trvá od 1 do 7 dní.

Kategória C – sú to oblasti s najväčšou mikrobiálnou kontamináciou. Produkty z nich sa môžu predávať v obchodnej sieti len po tom A) ako sa na určitú dobu (minimálne dva mesiace) premiestnia do prirodzených čistejších zátok, za účelom samo-purifikácie B) ďalšia možnosť je komerčná tepelná úprava. V UK je to 1,5 min pri teplote 90°C (Anon 1993).

8.2 Ovocie, zelenina, bobuľovité plody – „fresh produce“

a) preventívne opatrenia pred zberom

Voda používaná na zavlažovanie by nemala obsahovať ľudský fekálny materiál. Mala by spĺňať hygienické požiadavky, ktoré zabezpečia ochranu konzumenta.

Ak sa na hnojenie plodín použijú kaly s potenciálom prítomnosti vírusu, je nevyhnutné tento materiál ešte pred použitím kompostovať. Kompostovanie pri teplote 60-70°C inaktivuje niektoré enterické vírusy (účinnosť na NoV nie je známa).

b) preventívne opatrenia po zbere

Existuje viacero spôsobov eliminácie nežiaducej mikroflóry v potravinách, napr.: tepelná úprava, vysušovanie, zmrazenie, solenie, fermentácia, premytie a ošetrovanie špecifickými dezinfekčnými prostriedkami. Väčšina týchto metód však nie je aplikovateľná na spomínanú skupinu potravín („fresh produce“). Chladenie a zmrazovanie nemá na vírus deštruktívny, ale práve naopak ochranný účinok. Vírus môže byť na povrchu potravín inaktivovaný pôsobením UV žiarenia a silných oxidačných činidiel, ako sú chlór a ozón. Nie sú však pre prax aplikovateľné, nakoľko je na redukciu vírusu požadovaná pomerne veľká dávka. Jedine dôkladné umytie pod tečúcou vodou predstavuje dostatočnú ochranu pred vírusom, nedá sa však účinne aplikovať na bobuľovité plody ako sú maliny a jahody (Keswick *et al.* 1985).

8.3 Manipulácia s potravinami – príprava pokrmov

Eliminácia potenciálneho rezervoáru NoV sa dá zabezpečiť:

- i) Všetci jedinci s príznakmi gastroenteritídy musia byť vylúčení z procesu prípravy pokrmov. Je potrebné, aby táto izolácia pokračovala ešte po uzdravení minimálne 48 hodín, v dôsledku možnosti bezpríznakového vylučovania vírusu.
- ii) Odstránenie potenciálne kontaminovaných potravín.

iii) Dekontaminácia kuchynských pracovných povrchov a toaliet použitím horúcej vody a dezinfekčných prostriedkov, s následnou aplikáciou 500 ppm hypochloridu.

Prevenia kontaminácie:

i) Pravidelná dekontaminácia kuchynských pracovných priestorov a toaliet.

ii) Na toaletách by mal byť vždy: toaletný papier, mydlo, papierové utierky alebo sušič rúk.

iii) Personál (reštaurácie, stravovacie zariadenia, jedálne,...) by mal prísne dodržiavať osobnú hygienu a malo by sa zväžiť použitie rukavíc.

9. Závery a odporúčania

9.1 Závery

9.1.1 Vírusy prenosné potravinami a ich prevalencia

Infekcie gastrointestinálneho traktu sú v populácii bežné. Z hľadiska ich pôvodcov patrí prvenstvo vírusom. Problémom však je, že len veľmi malá časť prípadov je zaznamenaná národnými monitorovacími systémami, dokonca v mnohých krajinách žiadny monitoring neprebíha. Navyše tradičný monitorovací systém nie je v súčasnosti schopný určiť aká časť infekcií gastrointestinálneho traktu bola vyvolaná prenosom cez potraviny, v porovnaní s inými cestami prenosu.

Vírusy prenosné potravinami tvoria rôznorodú skupinu, v rámci ktorej rozlišujeme 3 základné oblasti:

- Vírusy s najčastejším výskytom – NoV. Monitoring výskytu NoV vo viacerých štátoch stanovil jeho výskyt na 11 až 3067 prípadov na 100 000 ľudí za rok. Údaje z minimálne 4 kontinentov poukazujú na jeho vysokú incidenciu. Údaje z rozvojových štátov sú však nedostačujúce.
- Vírusy zapríčiňujúce vážne ochorenia s významnou mortalitou – HRV a HAV.
- Novo sa objavujúce vírusy zoonotickej povahy s potenciálom prenosu prostredníctvom potravín – HEV, Nipah vírus, HPAI-H5N1.

9.1.2 Prežívanie vírusov na potravinách a v prostredí

Vírusy prenosné potravinami majú neobalený kapsid, čo podmieňuje ich vyššiu perzistenciu v prostredí a odolnosť voči vonkajším a vnútorným parametrom bežne používaným na ochranu potravín (chladenie, zmrazovanie, pH, atď.). NoV a HAV prežíva na ovocí a zelenine dobu, ktorá dávno presahuje životnosť týchto komodít.

Chladienie a zmrazovanie má ochranný účinok na tieto vírusy a dokonca sa predpokladá, že zvyšuje ich odolnosť v prostredí. Naopak tepelná úprava a vysušovanie môže byť účinné na inaktiváciu vírusov. Od vírusu k vírusu však existujú rozdielnosti v citlivosti k týmto procesom. Taktiež potraviny najčastejšie asociované s vírusovými infekciami ako sú ovocie a zelenina, lastúrniky a potraviny bez tepelnej úpravy, nepodstupujú pred konzumáciou virocídny proces.

Alkoholová dezinfekcia rúk nemá väčší účinok na inaktiváciu týchto vírusov. Odporúča sa starostlivé umytie rúk po silným prúdom tečúcej vody.

HAV a HRT je viac rezistentný k inaktivácii v porovnaní s enterickým adenovírusom a poliovírusom. Keďže NoV je v súčasnosti stále nekultivovateľný, experimentálne údaje o prežívaní tohto vírusu sú nahrádzané modelovými systémami, čo sú príbuzné vírusy, ktoré môžu, ale aj nemusia kopírovať správanie NoV, čím zostáva skutočný obraz tohto vírusu stále neobjasnený.

9.1.3 Cesty prenosu

Rozlišujeme viaceré cesty prenosu vírusov na potraviny:

- Pre čerstvé ovocie, zeleninu a bobuľovité plody – tzv. „fresh produce“ je hlavným zdrojom infekcie kontaminovaná voda (používaná na zavlažovanie, agrochemickú aplikáciu alebo umývanie); ďalej je to humánný fekálny materiál používaný ako hnojivo; a manuálna manipulácia počas zberu a po zbere.
- Pre lastúrniky je hlavným zdrojom kontaminácie fekálne kontaminovaná voda v ich životnom prostredí. Takýto ľudský fekálny materiál pochádza buď z ľudských obydľí, poľnohospodárskej produkcie, alebo ide o bodovú kontamináciu z lokality bezprostredne ležiacej v blízkosti komerčnej zóny chovu.

- Zdrojom kontaminácie pre potraviny určené na priamu konzumáciu bez tepelnej úpravy sú infikovaní jedinci podieľajúci sa na príprave a servírovaní týchto pokrmov.

9.1.4 Metódy detekcie

Metódy detekcie vírusov z potravín zaznamenali v poslednej dobe veľký pokrok. Napriek tomu sú validované len metódy detekcie vírusov z lastúrnikov. U ostatných potravín je situácia zložitejšia. Súčasné metódy nie sú oficiálne a len sa odporúčajú používať, v dôsledku nízkej senzitivity (falošná negativita).

Dôležitým nástrojom sa stali molekulárno-biologické postupy (RT-PCR), napriek ich neschopnosti rozlíšiť infekčný vírus od neinfekčného. Sú senzitívne, menej časovo náročné a umožňujú analýzu veľkého počtu vzoriek. Môžu byť kvantitatívne aj semi-quantitatívne. Po ukončení validácia týchto metód sa získa spoľahlivý nástroj na detekciu vírusov z potravín.

Jedným z primárnych cieľov je aj sprístupnenie týchto diagnostických postupov čo do najväčšej možnej miery, nakoľko rutinná diagnostika vírusov z potravín prebieha len v niekoľkých laboratóriách v rámci niekoľkých štátov.

9.1.5 Potraviny s najväčším rizikom kontaminácie vírusmi

Potraviny s najväčším rizikom kontaminácie vírusmi, hlavne NoV a HAV sú: a) čerstvé ovocie, zelenina a bobuľovité plody – tzv. „fresh produce“; b) lastúrniky; c) potraviny určené na priamu konzumáciu bez tepelnej úpravy. Výber uvedených komodít a vírusov bol uskutočnený na základe kritérií ako sú: závažnosť vyvolaného ochorenia, incidencia/ prevalencia, pravdepodobnosť vystavenia riziku, vplyv obchodu, dosah na verejné zdravie a schopnosť kontrolovať infekcie pochádzajúce z potravín.

9.1.6 Hodnotenie rizika

Aj keď v súčasnosti ešte nie je možná plnohodnotná kvantitatívna analýza rizika, samotné hodnotenie rizika zohráva dôležitú úlohu v hlbšom pochopení problematiky vírusov prenosných potravinami. Tak napr. obraz o cestách prenosu vírusov môže napomôcť získať údaje, ktoré naštartujú určitú sféru výskumu.

Hoci je stále veľmi veľa otázok a výziev, pre niektoré oblasti (napr. NoV a HAV v lastúrnikoch) už existuje relatívne hodnotný základ vedomostí a informácie, ktoré sú k dispozícii, sú štruktúrované a priority sú určené. Tak isto pokrok vo vývoji diagnostických metód podstatne prispieva k objasňovaniu problému.

Úzka spolupráca medzi hodnotením rizika a manažmentom rizika môže nasmerovať výskum a hodnotenie rizika na najakútnejšie problémy.

9.1.7 Manažment rizika

Počas primárnej produkcie je potrebné doceliť lepšie pochopenie poľnohospodárskych a akvakultúrnych postupov a identifikovať vysoko rizikové postupy, ďalej implementovať GAP (Good Agricultural Practices) a kontrolovať ich dodržiavanie a tiež stanoviť, aký rozsah kontrol je efektívny na vírusy.

Súčasná kontrola potravín nie je špecificky nasmerovaná na monitoring vírusov v rizikových komoditách a tak je neefektívna v kontrole vírusovej transmisie. Následkom čoho môžu byť kontaminované potraviny uvoľňované na trh. Problém sa môže zvýrazniť po objavení nových nebezpečných vírusov (HPAI-H5N1) s potenciálom prenosu prostredníctvom potravín.

Množstvo údajov a informácií o alimentárnych nákazach vírusového pôvodu je často nedostatočný. Intervencia kompetentných autorít by mohla zlepšiť situáciu.

Kontrolné opatrenia by mali byť nasmerované skôr na prevenciu kontaminácie (kontrola zdrojov, čističiek odpadových vôd, dodržiavania

hygienických zásad), ako na samotné odstraňovanie kontaminácie počas spracovania potravín, nakoľko doposiaľ neexistuje účinný dekontaminačný postup.

9.2 Odporúčania

9.2.1 Vírusy prenosné potravinami a ich prevalencia

V súčasnosti sú údaje o prevalencii alimentárnych nákaz vírusového pôvodu nedostatočné. Hlavne v rozvojových krajinách je nevyhnutné podporiť a implementovať monitorovacie systémy. Tam, kde údaje už sú prístupne, je potrebné ich systematicky revidovať a obnovovať.

Na medzinárodnej úrovni je potrebné stanoviť kritéria zbierania údajov, harmonizovať metodiky, stanoviť protokoly pre odber a testovanie environmentálnych vzoriek.

Štúdie o prevalencii a úrovni vírusovej kontaminácie potravín bežne sa vyskytujúcej pri epidémiách by mali viesť ku kvantitatívnej analýze rizika (QMRA - Quantitative Microbiological Risk Assessment).

Výmena údajov o epidémiách (v rátane sekvencií vírusových kmeňov) na medzinárodnej úrovni by mohla prispieť k skorej detekcii zdrojov epidémií medzinárodného charakteru.

9.2.2 Metódy detekcie

Je nevyhnutné, aby naďalej pokračoval vývoj jednoduchých, dostatočne senzitivných a robustných metód detekcie vírusov z potravín. A už existujúce metódy, by mali byť podrobené kritickému hodnoteniu účinnosti a efektivity s následnou harmonizáciou a validáciou.

Veľkosť laboratórnej vzorky by mala reflektovať priemernú konzumnú veľkosť potravín a limit detekcie by mal byť postačujúci na zachytenie aj veľmi nízkej koncentrácie vírusu v potravinách.

Narastajúci počet detekčných metód nastoľuje potrebu medzilaboratórnej štandardizácie a validácie na národnej, aj medzinárodnej úrovni. Centrom pozornosti je proces odberu a prípravy vzorky, stanovenie detekčného limitu a účinnosť vírusovej extrakcie.

Taktiež by bolo užitočné vypracovať sprievodcu správnej laboratórnej praxe (Good laboratory practice) pre molekulárno-biologickú diagnostiku vírusov v potravinách s cieľom uľahčiť rozšírenie a spoľahlivú aplikáciu týchto metód.

9.2.3 Ciele do budúcnosti

Existuje ešte veľmi veľa otázok, ktoré ak by boli zodpovedané, významnou mierou by prispeli k zvýšeniu úrovne vedomostí o vírusoch prenosných potravinami. Hlavné ciele sú:

- Hlbšia analýza ciest prenosu.
- Na základe poznatkov, že väčšina vírusov prenosných potravinami sa nedá kultivovať na bunkách, je potrebné stanoviť alternatívne modelové vírusy, ktoré by boli dobre kultivovateľné a slúžili by ako model pre štúdium stability a inaktivácie enterických vírusov pri rôznych podmienkach.
- Úloha potravín pri určitých vírusových infekciách nie je celkom objasnená. Tak napr. nie je známe akú úlohu zohrávajú potraviny pri prenose HEV, alebo prenose HRV u detí.
- Prenos prostredníctvom potravín má potenciál pre vznik nových vírusových kmeňov rekombináciou. Táto sféra však zostáva zatiaľ neobjasnená.
- Je potrebné zaviesť metódy rýchleho stanovenia rozsahu nákazy/epidémie (napr. metódy založené na analýze slín).

- Je potrebné zaviesť metódy pre rýchle rozlíšenie medzi nákazami, ktorých zdrojom bol kontakt človek - človek, od nákaz, kde boli zdrojom infekcie potraviny.
- Úloha hmyzu (napr. múch) ako potenciálneho vektora nie je objasnená.
- Je potrebné zhromaždiť informácie o problematike zavlažovania plodín (ovocie, zelenina, bobuľovité plody), čo sa považuje za jednu z možných ciest kontaminácie.
- Chýbajú informácie o účinnosti procesu čistenia odpadových vôd na inaktiváciu vírusov. Tak isto absentuje kontrola vypúšťania odpadových vôd.
- Chýbajú exaktné informácie o výskyte jednotlivých vírusových kmeňov (v rátane zoonotických vírusov) v rozličných typoch potravín.
- Chýbajú údaje o perzistencii infekivity enterických vírusov. A tak isto zostáva vyriešiť problém: detekcia vírusovej nukleovej kyseliny verzus infekivita.
- Chýbajú informácie o súvislostiach medzi veľkosťou laboratórnej vzorky a jej konzumnou/ spotrebiteľskou veľkosťou.
- Je potrebné zhromaždiť údaje o prevalencii vírusov v potravinách v konkrétnych epidémiách.
- Potreba zaviesť GAP (Good Agricultural Practices) programy so zreteľom na kontrolu prítomnosti vírusov.
- V procese zberu, spracovania potravín a prípravy pokrmov by bolo potrebné zefektívniť už existujúce kontrolné body v smere kontroly vírusov.
- Potreba zhromaždiť údaje o dodržiavaní hygienických zásad u ľudí manipulujúcich s potravinami.
- U novo zaznamenaných vírusov (HPAI-H5N1, Nipah vírus, HEV) by bolo potrebné prešetriť ich potenciál prenosu prostredníctvom potravín.

- Tak isto je potrebné stanoviť účinnosť v súčasnosti dostupných dezinfekčných prostriedkov určených na dekontamináciu pracovných povrchov ako aj samotných potravinových komodít.

10. Literatúra

Abad, F.X.; Pinto, R.M.; Bosch, A. 1994. Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(10): 3704-3710.

Anon. 1993. Council decision of 11th December 1992 approving certain heat treatments to inhibit the development of pathogenic micro-organisms in bivalve molluscs and marine gastropods (93/25/EEC). *Off. J. Eur. Communities*. 16: 22-23.

Beller, M.; Ellis, A.; Lee, S.H.; Drebot, M.A.; Jenkerson, S.A.; Funk, E.; Sobsey, M.D., Simmons, O.D. 3rd; Monroe, S.S.; Ando, T.; Noel, J.; Petric, M.; Middaugh, J.P.; Spika, J.S. 1997. Outbreak of viral gastroenteritis due to a contaminated well, International consequences. *JAMA* 278, 563-8.

Berg, D.E.; Kohn, M.A.; Farley, T.A.; McFarland, L.M. 2000. Multi-state outbreaks of acute gastroenteritis traced to fecal-contaminated oysters harvested in Louisiana. *J.Infect.Dis.* 181, 381-3866.

Bidawid, S.; Farber, J.M.; Sattar, S.A. 2000. Contamination of foods by foodhandlers: Experiments on hepatitis A virus transfer and its interruption. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2759-2763.

Boone, S.A.; Gerba, C.P. 2007. Significance of fomites in the spread of respiratory and enteric viral disease. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6): 1687-1696.

Cadilhac, P. & Roudot-Thoraval, F. 1996. Seroprevalence of hepatitis A virus infection among sewage workers in the Parisian area, France. *European Journal of Epidemiology*, 12(3): 237-240.

Callahan, K.M.; Taylor, D.J.; Sobsey, M.D. 1995. Comparative survival of hepatitis A virus, poliovirus and indicator viruses in geographically diverse seawater. *Water Sci. Technol.* 31, 189-193.

Cotterelle, B.; Drougard, C.; Rolland, J.; Becamel, M.; Boudon, M.; Pinede, S.; Traore, O.; Balay, K.; Pothier, P.; Espie, E. 2005. Outbreak of Norovirus infection associated with the consumption of frozen raspberries, France, March 2005. *Eurosurveillance*, 10(17): 2690.

Cressy, P.; Lake, R. 2007. Risk ranking: Estimates of the burden of foodborne disease for New Zealand. Available at http://www.nzfsa.govt.nz/science/research-projects/FW0724_DALY_estimates_August_2007_final.pdf

Croci, L.; De Medici, D.; Scalfar, C.; Fior, a.; Toto, L. 2002. The survival of hepatitis A virus in fresh produce, *International Journal of Food Microbiology*, 73(1):29-34.

Dentinger, C.M.; Bower, W.A.; Nainan, O.V.; Cotter, S.M.; Myers, G.; Dubusky, L.M.; Fowler, S.; Salehi, E.D.; Bell, B.P. 2001. An outbreak of hepatitis A associated with green onions. *Journal of Infectious Diseases*, 183(8): 1273- 1276.

De Wit, M.A.; Widdowson, M.A.; Vennema, H.; de Bruin, E.; Fernandes, T.; Koopmans, M. 2007. Large outbreak of Norovirus: the baker who should have known better, *Journal of Infection*, 55(2): 188-193.

Djuretic, T.; Wall, P.G.; Ryan, M.; Evans, H.S.; Adak, G.K.; Cowden, J.M. 1996. General outbreaks of infectious intestinal disease in England and Wales 1992 to 1994. *CDR Review* 6, R57-63.

Dodgson, R.W. 1928. Report on musel purification. Fisheries Investigations Series II. 10, 1-498. Ministry of Agriculture and Fisheries, HMSO, Lando.

Dolin, R.; Blacklow, N.R.; DuPont, H.; Buscho, R.F.; Wyatt, R.G.; Kasel, J.A.; Hornick, R.; Chanock, R.M. 1972. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 140, 578-583.

Dore, W.J.; Henshilwood, K.; Lees, D.N.: 2000. Evaluation of F-specific RNA bacteriophage as a candidate human enteric virus indicator for bivalve molluscan shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1280-1282.

EUROPEAN COMMISSION, HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL: Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on Norwalk-like viruses (adopted on 30-31 January 2002).

Falkenhorst, G.; Krusell, L.; Lisby, M.; Madsen, S.B.; Böttiger, B.E.; Mølbak, K. 2005. Imported frozen raspberries cause a series Norovirus outbreaks in Denmark. *Eurosurveillance*, 10(38): 2795.

FAO and WHO, Viruses in food: scientific advice to support risk management activities – meeting report, Bilthoven 2007.

Feagins, A.R.; Opriessnig, T.; Guenette, D.K.; Halbur, P.G.; Meng, X.J. 2007. Detection and characterization on infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *Journal of General Virology*, 88, 912-917.

Gauntzer, C.; Dubois, E.; Crance, J.M.; Billaudel, S.; Kopecka, H.; Schwartzbrod, L.; Pommepuy, M.; Le Guyader, F. 1998. Influence of environmental factors factors on the survival of enteric viruses in water samples. *Int. J. Food Microbiol.* 37, 189-199.

Gilgen, O.N.; German, D.; Luthy, J.; Hubner, P.H. 1997. Three step isolation on method for sensitive detection of enteroviruses, rotaviruses, hepatitis A viruses and small structural viruses in water samples. *Int. J. Food Microbiol.*, 37, 189-199.

Graham, D.Y.; Jiang, X.; Tanaka, T.; Opekun, A.R.; Madore, H.P.; Estes, M.K. 1994. Norwalk virus infection of volunteers: New insights based on improved assays. *J.Infect.Dis.* 170, 34-43.

Gray, J.J.; Green, J.; Cunliffe, C.; Gallimore, C.; Lee, J.V.; Neal, K.; Brown, D.W. 1997. Mixed genogroup SRSV infections among a party of canoeists exposed to contaminated recreational water. *J. Med. Virol.* 52, 425-429.

Green, K.Y.; Ando, T.; Balayan, M.S.; Berke T.; Clarke, I.N.; Estes M.K.; Matson D.O.; Nakata S.; Neill, J.D.; Studdert M.J.; Thiel, H.J. 2000. Taxonomy of the caliciviruses. *J.Infect.Dis.*181 Suppl.2, 322-330.

Greenberg, H.G.; Wyatt, R.G.; Kapikain, A.Z. 1979. Norwalk virus in vomitus, letter. *Lancet* 1, 55.

Greening, G.E.; Lake, R.; Hudson, J.A.; Cressey, P.; Nortje, G. 2003. Risk profile: Norwalk-like virus in mollusca (raw). Client Report FW0312 prepared for NZ Food Safety Authority, January 2003. <http://www.nzfsa.govt.nz/science/risk-profiles/norwalk-like-virus-in-raw-mollusca.pdf>

Hale, A.D.; Crawford, S.E.; Ciarlet, M.; Green, J.; Gallimore, C.; Brown, D.W.; Jiang, X.; Estes, M.K. 1999. Expression and self assembly of Grimsby virus: antigenic distinction from Norwalk and Mexico virus. *Clin.Diag.Lab.Immunol.*, 6, 142-145.

Havelaar, A.H. 1987. Bacteriophages as model organisms in water treatment. *Microbiol. Sci.* 4, 362-364.

Hedlund, K.; Rubilar-Abreu, E.; Svensson, L. 2000. Epidemiology of calicivirus infections in Sweden, 1994-8. *J. Infect.Dis.* 181, 275-80.

Hjertqvist, M.; Johansson, A.; Svensson, N.; Abom, P.E.; Magnusson, C.; Olsson, M.; Hedlund, K.O.; Andersson, Y. 2006. Four outbreaks of Norovirus gastroenteritis after consuming raspberries, Sweden, June - August 2006. *Eurosurveillance*, 11(36): Article no. 3038.

Holliger, F.B.; Ticehurst, J.R. 1996. Hepatitis A virus. pp. 735-782, in: B.N. Fields, D.M. Knipe and P.M. Howley (editors). *Field Virology*. 3rd ed. Lippincott-Raven, Philadelphia PA, USA.

Cheesbrough, J.S.; Barkess-Jones, L.; Brown, D.W.G. 1997. Possible prolonged environmental survival of small round-structured viruses. *J.Hosp.Infect.* 35, 325-326.

Jaykus, L.A.; Hemard, M.T.; Sobsey, M.D. 1994. Human Enteric Pathogenic Viruses. In: C.R. Hackney and M.D. Pierson (Eds.), *Environmental Indicators and Shellfish Safety*. Chapman and Hall, New York, p. 92-153.

Kapikain, A.Z.; Estes, M.K.; Chanock, R.M. 1996. Norwalk group of viruses. *Field virology* 783-810.

Kaplan, J.E.; Feldman, R.; Cambell, D.S.; Lookabaugh, C.; Gary, G.W. 1982. The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. *Am.J.Public Health*.72, 1329-1332.

Keswick, B.H.; Satterwhite, T.K.; Johnson, P.C.; DuPont, H.L.; Secor, S.L.; Bitsura, J.A.; Gary, G.W.; Hoff, J.C. 1985. Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* 50(2) 261-4.

Koopmans, M. & Duizer, E.2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology*, 90(1):23-41.

Korsager, B.; Hede, S.; Boggild, H.; Bottiger, B.E.; Molbak, K. 2005. Two outbreaks of Norovirus infections with the consumption of imported raspberries, Denmark, May - June 2005. *Eurosurveillance*. 10(25): Art. 2729.

Kuiken, T.; Rimmelzwaan, G.; van Riel, D.; van Amerongen, G.; Baars, M.; Fouchier, R.; Osterhaus, A. 2004. Avian H5N1 influenza in cats. *Science*, 306(5694):241.

Laverick, M.A.; Wyn-Jones, A.P.; Carter, M. 2004. Quantitative RT-PCR for the enumeration of Noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Letter in Applied Microbiology*, 39(2): 127-136.

Lees, D. 2000. Viruses and bivalve shellfish. *International Journal of Food Microbiology*, 59:81-116.

Le Guyader, F.S.; Bon, F.; DeMedici, D.; Parnaudeau, S.; Bertone, A.; Crudeli, S.; Doyle, A.; Zidane, M.; Suffredini, E.; Kohli, E.; Maddalo, F.; Monini, M.; Gallay, A.; Pommepuy, M.; Pothier, P.; Ruggeri, F.M. 2006a. Detection of multiple Noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 3878-3882.

Le Guyader, F.S.; Dubois, E.; Menard, D., Pommepuy, M. 1994. Detection of hepatitis A virus, rotavirus and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-nested PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3665-3671.

Le Guyader, F.S.; Loisy, F.; Atmar, R.L.; Hutson, A.M.; Estes, M.K.; Ruvoen-Clouet, N.; Pommepuy, m.; Le Pendu, J. 2006b. Norwalk virus specific binding to oyster digestive tissues. *Emerging Infectious Diseases*, 12: 931-936.

Le Guyader, F.S.; Mittelholzer, C.; Haugarreau, L.; Hedlund, K.O.; Alsterlund, R.; Pommepuy, M.; Svensson, L. 2004. Detection of Norovirus in raspberries associated with a gastroenteritis outbreak. *Journal of Clinical Microbiology*, 97(2): 179-86.

Loisy, F.; Atmar, R.L.; Le Saux, J.-C.; Cohen, J.; Caparis, M.-P.; Pommepuy, M.; Le Guyader, S. F. 2005. Use of Rotavirus like particles as surrogates to evaluate virus persistence in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 6049-6053.

Luby, S.P.; Hossain, M.J.; Blum, L.S.; Husain, M.M.; Gurley, E.; Khan, R.; Ahmed, B.N.; Rahman, S.; Nahar, N.; Kenah, E.; Comer, J.A.; Ksiazek, T.G. 2006. Foodborne transmission of Nipah virus, Bangladesh. *Emerging Infectious Diseases*, 12: 1888-1894.

Marshall, J.A.; Yuen, L.K.; Catton, M.G.; Gunsekere, I.C.; Wright, P.J.; Bettelheim, K.A.; Griffith, J.M.; Lightfoot, D.; Hogg, G.G.; Gregory, J.; Wilby, R.; Gaston, J. 2001. Multiple outbreaks of NLV gastroenteritis associated with a Mediterranean style restaurant. *J. Med. Microbiol.* 50, 143-51.

Mattison, K.; Karthikeyan, K.; Malik, N.; Abebe, M.; Sattar, S.A.; Farber, J.M.; Bidawid, S. 2007. Survival of calicivirus in food and on surfaces: experiments with feline calicivirus as a surrogate for Norovirus. *Journal of Food Protection*, 70(2): 500-503.

Maunula, L.; Piiparinen, H.; von Bonsdorff, C.H. 1999. Confirmation of Norwalk-like virus amplicans after RT-PCR by microplate hybridization and direct sequencing. *J. Virol. Methods*, 83, 125-134.

Mbithi, J.N.; Springthorpe, V.S.; Sattar, S.A. 1991. Effect of relative humidity and air temperature on survival of hepatitis A virus on environmental surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 1394-1399.

McDonnell, S.; Kirkland, K.B.; Hlady, W.G.; Aristeguieta, C.; Hopkins, R.S.; Monroe, S.S.; Glass, R.I. 1997. Failure of cooking to prevent shellfish-associated viral gastroenteritis. *Arch. Intern. Med.* 157. 111-116.

Morris, S. 1984. Reduction of naturally occurring enteroviruses by waste-water treatment processes. *Hyg.J.*, Lond.92,97-103.

Nauheim, R.C.; Romanowski, e.G.; Araullocruz, T.; Kowalski, R.P.; Turgeon, P.W.; Stopkak, S.S.; Gordaon, Y.J. 1990. Prolonged recoverability of desiccated Adenovirus type 19 from various surfaces. *Ophthalmology*, 97: 1450-1453.

Noel, J.S.; Ando, T.; Leite, J.P.; Green, K.Y.; Dingle, K.E.; Estes, M.K.; Seto, Y.; Monroe, S.S., Glass, R.I. 1997. Correlation of patient immune responses with genetically characterized small round-structured viruses involved in outbreaks of nonbacterial acute gastroenteritis in the united states, 1990 to 1995. *J.Med.Virol.* 53, 372-383.

Papafragkou, E.; D'Souza, D.; Jaykus, L.-A. 2006. Foodborne viruses: prevention and control. Pp. 289-330, *in*: Goyal (editor). *Viruses in Food*. Springer, New York, USA.

Parashar, U.D.; Monroe, S.S. 2001. „Norwalk-like viruses“ as a cause of foodborne outbreaks. *Reviews in Medical Virology*, 11: 243-252.

Pintó, R.M. & Saiz, J.C. 2007. Enteric Hepatitis Viruses. Pp. 39-67, *in*: A. Bosch (editor). *Human Viruses in Water*. [A.J. Zuckerman and I.K. Mushshwater, series editors. Perspectives in Medical Virology Series, vo. 17] Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Pönkä, A.; Maunula, L.; von Bonsdorff, C.-H.; Lyytikäinen, O. 1999. Outbreak of calicivirus gastroenteritis associated with eating frozen raspberries. *Epidemiol. Infect.* 123: 469-474.

Rockx, B.; de Wit, M.; Vennema, H.; Vinje, J.; van Duijnhoven, Y.; Koopmans, M. 2002. Natural history of caliciviruses. *Clin.Infect.Dis.Accepted for publication*.

Roderick, G.E.; Schneider, K.R. 1994. Depuration and relaying of Molluscan shellfish. In: C.R. Hackney and M.D. Pierson (Eds.). *Environmental Indicators and Shellfish Safety*. Chapman & Hall, New York, p. 331-363.

Rutjes, S.A.; Lodder, W.J.; Bouwknecht, M.; de Roda Husman. 2007. Increased hepatitis E virus prevalence on Dutch pig farms from 33 to 55% by using appropriate internal quality controls for RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 143(1), 112-116.

Sattar, S.A.; Dimock, K.D.; Ansari, S.A.; Springthorpe, V.S. 1988. Spread of acute hemorrhagic conjunctivitis due to Enterovirus-70: effect of air temperature and relative humidity on virus survival on fomites. *Journal of Medical Virology*, 25: 289-296.

Sattar, S.A.; Ijaz, M.K.; Johnson-Lussenburg, C.M.; Springthorpe, V.S. 1984. Effect of relative humidity on the airborne survival of Rotavirus SA11. *Applied and Environmental Microbiology*, 47: 879-881.

Sattar, S.A.; Lloyd-Evans, N.; Springthorpe, V.S; Nair, R.C. 1986. Institutional outbreaks of rotavirus diarrhoea: potential role of fomites and environmental surfaces as vehicles for virus transmission. *Journal of Hygiene*, 96: 277-289.

Schreier, E.; Doring, F., Kunkel, U. 2000. Molecular epidemiology of outbreaks of gastroenteritis associated with small round structured viruses in Germany in 1997/98. *Arch.Virol.* 145, 443-453.

Smith, A.W.; Skilling, D.E.; Cherry, N.; Mead, J.H.; Matson, D.O. 1998. Calicivirus emergence from ocean reservoirs: zoonotic and interspecies movements. *Emerg.Infect.Dis.*4,13-20.

Sobsey, M.; Shields, p.; Hauchman, F.; Davis, A.; Rullman, V.; Bosch, A. 1988. Survival and persistence of hepatitis A virus in environmental samples. pp. 121-124, *in*: A. Zuckermann (editor). *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Alan Liss, New York, USA.

Takahashi, K.; Kitajima, N.; Abe, N.; Mishiro, S. 2004. Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wildboar, a deer, and four patients who ate the deer. *Virology*, 330: 501-505.

Tumpey, T.M.; Suarez, D.L.; Perkins, L.e.; Senne, D.A.; Lee, J.G.; Lee, Y.J.; Mo, I.P.; Sung, H.W.; Swayne, D.E. 2002. Characterization of a highly pathogenic H5N1 avian influenza A virus isolated from duck meat. *Journal of Virology*, 76(12): 6344-6355.

Ueki, Y.; Sano, D.; Watanabe, T.; Akiyama, K.; Omura, T. 2005. Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters. *Water Research*, 39: 4271-4280.

Van Asten, L.; Siebenga, J.; van den Wijngaard, C.; Verheij, R.; Vliet, H.; van Pelt, W.; Koopmans, M. Unexpected increase in illness and death associated with norovirus epidemic peaks.

Van den Berg, H.; Lodder, W.; van der Poel, W.; Vennema, H.; de Roda Husman, A.M. 2005. Genetic diversity of Noroviruses in raw and treated sewage water. *Research in Microbiology*, 156(4): 532-540.

Villena, C.; Gabrieli, R.; Pintó, R.M.; Guix, S.; Donia, D.; Buonomo, E.; Palombi, L.; Cenko, F.; Bino, S.; Bosch, A.; Divizia M. 2003. A large infantile gastroenteritis outbreak in albania caused by multiple emerging Rotavirus genotypes. *Epidemiology and Infection*, 131(3): 1105-1110.

Wheeler, J.G.; Seithi, D.; Cowden, J.M.; Wall, P.G.; Rodrigues, L.C.; Tompkins, D.C.; Hudson, M.J.; Roderick, P.J. 1999. Study of the infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance. *British Medical Journal*, 318, 1046-1050.

Wyer, M.D.; Kay, D. 1993. Corelation between enterovirus and faecal indicator organisms. R&D Note 188. Bristol: National River Authority.

Yazaki, Y.; Mizuo, H.; Takahashi, M.; Nishizawa, T.; Sasaki, N.; Gotanda, Y.; Okamoto, H. 2003. Sporadic acute or fulminat hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be foodborne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *Journal of General Virology*, 84, 2351-2357.

11. Zoznam skratiek

CoV	Coronavirus
DNA	kyselina deoxyribonukleová (Deoxyribonucleic acid)
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FCV	Feline calicivirus
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Point
HAV	vírus hepatitídy typu A
HEV	vírus hepatitídy typu E
HPAI	Highly Pathogenic Avian Influenza
HRV	Rotavírus (Human Rotavirus)
MuNoV	the murine Norovirus
NoV	Norovírus
PCR	Polymerázová reťazová reakcia (Polymerase chain reaction)
RNA	kyselina ribonukleová (Ribonucleic acid)
RT-PCR	Polymerázová reťazová reakcia spojená s reverznou transkripciou (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction)
SARS-C	Severe Acute Respiratory Syndrome-causing Coronavirus
UK	United Kingdom
WHO	World Health Organization