

Norowirusy w środowisku i żywności – nowe zagrożenie?

ARTUR RZEŻUTKA, IWONA KOZYRA, MARTA CHROBOCIŃSKA,
AGNIESZKA KAUPKE, BEATA MIZAK

Zakład Wirusologii Żywności i Środowiska Państwowego Instytutu Weterynaryjnego
– Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Rzeżutka A., Kozyra I., Chrobocińska M., Kaupke A., Mizak B.

Do noroviruses in the environment and food constitute a new threat?

Summary

Viral pathogens are the most common cause of human gastroenteritis worldwide. Water and food are considered as the main source of the food-borne infections in humans. Recent reports have shown the increasing importance of noroviruses as one of the main agents causing food-borne diseases. In most outbreaks food is indirectly implicated as a source of infection solely through epidemiological investigation, due to difficulties in virus detection. This review is focused on noroviruses and their role in food-borne transmission. Furthermore the descriptions of the pertinent food-borne outbreaks have been presented. Finally an overview of the issues of prevention and control of food-borne infections, as well as the importance of good agricultural and hygienic practices in virus transmission have been emphasised.

Keywords: norovirus, food-borne disease, virus

Wzrastająca liczba zachorowań u ludzi z objawami ostrego zapalenia żołądka i jelit (*gastroenteritis*), o wykluczonej etiologii bakteryjnej, wskazuje na znaczenie zakażeń wirusowych. Spośród enterowirusów najważniejszą rolę odgrywają norowirusy zaklasyfikowane do rodziny *Caliciviridae*, rodzaju *Norovirus*. Do tej rodziny należą również kaliciwirusy patogenne dla człowieka rodzaju *Sapovirus*, lecz zakażenia nimi są rzadziej notowane. Według danych CDC (Centers for Disease Control and Prevention) w Stanach Zjednoczonych w 96% przypadków *gastroenteritis* za główną przyczynę uznano zakażenia norowirusami (20).

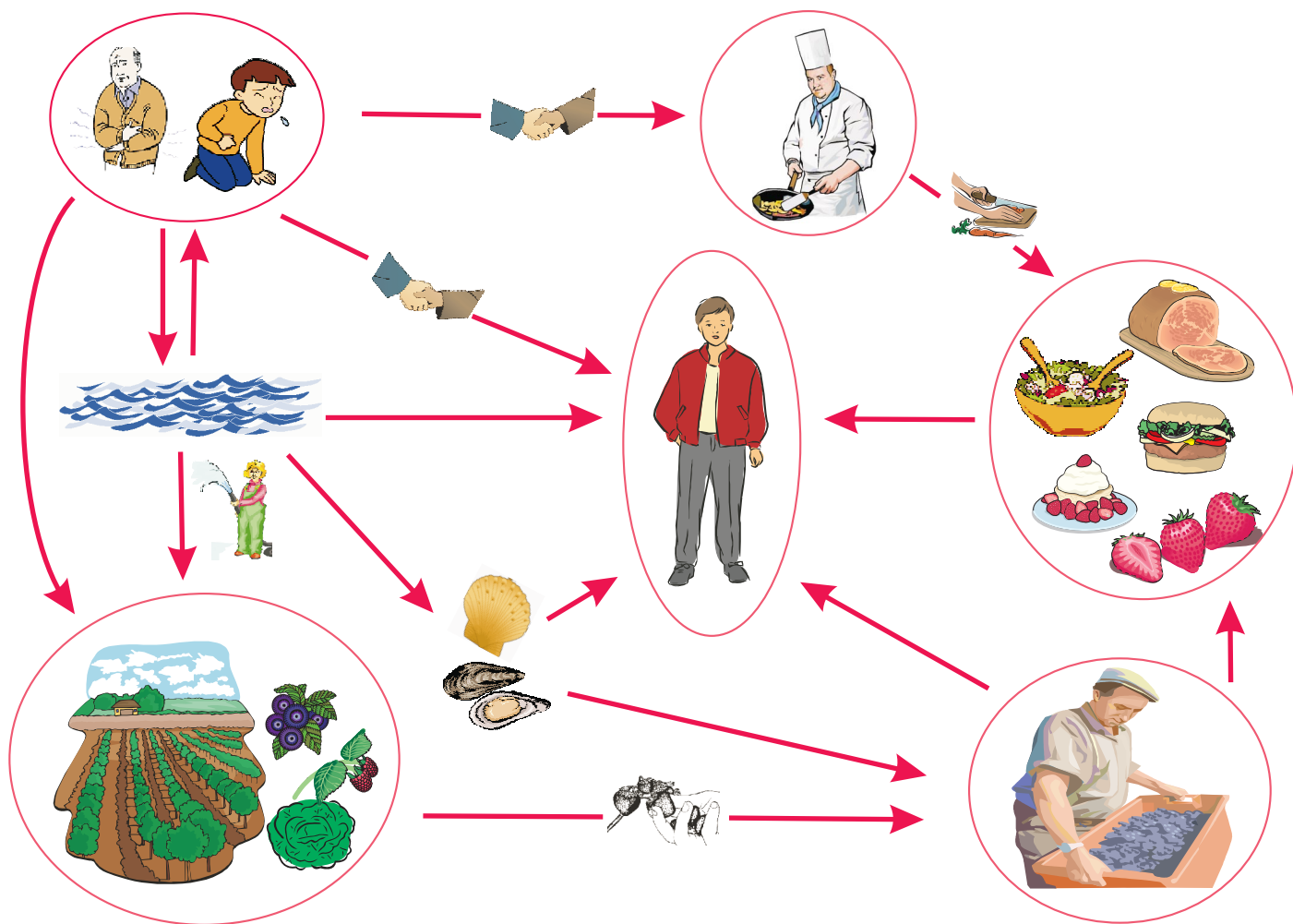
Kaliciwirusy są małymi wirusami, wielkości 30-35 nm, których wirion jest zbudowany z kapsydu zawierającego pojedynczą nić RNA. W obrazie mikroskopu elektronowego norowirusy uwidaczniają się jako cząstki kształtu sferycznego, pozbawione otoczki oraz wypustek. Zastosowanie technik biologii molekularnej do analizy genetycznej norowirusów pozwoliło na wyodrębnienie dwóch głównych genogrup GGI i GGII patogennych dla ludzi (27). Norowirusy charakteryzują się wysoką opornością na czynniki środowiskowe (zmiany pH, niska i wysoka temperatura) oraz większość powszechnie stosowanych środków dezynfekcyjnych (7, 14).

Drogi transmisji oraz patogeneza zakażeń wywołanych przez norowirusy

Do zakażenia człowieka norowirusami dochodzi drogą bezpośrednią tj. w wyniku kontaktu z osobą chorą

lub na drodze pośredniej poprzez spożywanie zanieczyszczonej wirusami żywności lub wody pitnej (15). Dane źródłowe nie podają, jaki procent przypadków *gastroenteritis* wywołany był konsumpcją zanieczyszczonej wirusami żywności i wody, a jaki był wynikiem bezpośredniego kontaktu z osobą chorą lub zanieczyszczonymi przedmiotami. Opisywane w piśmiennictwie zdiagnozowane przypadki infekcji pokarmowych u ludzi, wywoływanych przez norowirusy, dotyczyły konsumpcji mięczaków (17), świeżych warzyw i owoców (23) oraz potraw z nich przygotowanych (sałatki warzywno-owocowe, desery owocowe). Nie we wszystkich przypadkach zachorowań możliwe było wykonanie odpowiednich analiz laboratoryjnych pozwalających jednoznacznie stwierdzić, że podejrzewany produkt żywnościowy był rzeczywistym źródłem zakażenia. Wynika to głównie z braku testów diagnostycznych lub odpowiednich procedur badawczych pozwalających na analizę próbek żywności. Dzieje się tak, gdyż w wielu krajach nie diagnozuje się oraz nie ewidencjonuje wirusowych infekcji przewodu pokarmowego. Żywność może ulec zanieczyszczeniu wirusami na trzech etapach jej produkcji: w momencie jej wytwarzania (farmy mięczaków, plantacje, uprawy), pozyskiwania (zbiór) oraz przygotowywania posiłków (miejsca zbiorowego żywienia).

Ścieki komunalne są podstawowym źródłem zanieczyszczenia enterowirusami środowiska, w tym rzek i zbiorników wodnych. Obecność wirusów w ściekach jest wynikiem nieskutecznej ich inaktywacji w proce-



Ryc. 1. Źródła zakażenia człowieka oraz drogi transmisji wirusów

się oczyszczania lub różnego typu awarii urządzeń oczyszczających. Ścieki trafiające do rzek oraz zbiorników wodnych będących miejscem hodowli mięczaków powodują zanieczyszczenie wód oraz organizmów tam żyjących. Mięczaki, pobierając pokarm na drodze filtracji wody, pochłaniają i koncentrują obecne w niej wirusy. Konsumpcja zanieczyszczonych wirusami małży w stanie surowym lub poddanych niedostatecznej obróbce termicznej, prowadzi do wystąpienia zachorowań u ludzi (17).

Owoce i warzywa ze względu na specyfikę uprawy oraz sposób pozyskiwania bardzo łatwo ulegają zanieczyszczeniu wirusami. Ma to miejsce w trakcie nawadniania plantacji zanieczyszczoną fekaliami wodą lub podczas ręcznego zbioru przez osobę zakażoną lub chorą, której dłonie umożliwiły mechaniczną transmisję patogenów. W ten sposób już na początku procesu produkcyjnego owoce stają się źródłem zakażenia dla konsumenta. Kolejnymi etapami, w których może dojść do zanieczyszczenia żywności jest proces jej przetwarzania, pakowania i przygotowywania posiłków. Analiza epidemiologiczna przypadków *gastroenteritis* dowodzi, że istnieje ryzyko wtórnego zanieczyszczenia żywności przez osoby chore lub mające styczność z osobą chorą, a które z racji wykonywanej pracy zajmują się

przygotowywaniem posiłków. Źródła zakażenia człowieka oraz drogi transmisji wirusów przedstawiono na rycinie 1.

Ryzyko wystąpienia zakażenia w dużej mierze jest determinowane opornością wirusów na czynniki środowiskowe, liczbą cząstek wirusowych znajdujących się na/w żywności oraz wrażliwością konsumenta na zakażenie. Do organizmu człowieka wirus dostaje się drogą pokarmową. Aerogenna droga zakażenia człowieka nie została jeszcze w pełni udokumentowana. Zakłada ona, że wirus z górnych dróg oddechowych w wyniku połknięcia przedostaje się do przewodu pokarmowego będącego docelowym miejscem jego namnażania (19). Liczba cząstek wirusowych mogąca wywołać zakażenie jest bardzo mała i wynosi około 10-100 cząstek (4). Wirusy po pokonaniu bariery, jaką stanowi kwaśne środowisko żołądka, wnikają do komórek nabłonka jelitowego, gdzie następuje szybka ich replikacja. W wyniku uszkodzenia nabłonka oraz zmian morfologicznych kosmków jelitowych dochodzi do stanu zapalnego błony śluzowej przewodu pokarmowego i zaburzeń jej funkcji (18). Choroba ma zazwyczaj przebieg ostry w postaci silnych „fontannowych” wymiotów, intensywnej biegunki występującej już po 24-48 godzinach od zakażenia oraz gorączki. Odwodnienie oraz zaburzenia elektrolitowe w organizmie stanowią

bezpośrednią przyczynę zgonów osób starszych i dzieci. Wydalanie wirusa wraz z kałem rozpoczyna się w okresie inkubacji choroby i trwa do jednego tygodnia od momentu wystąpienia pierwszych objawów klinicznych (1, 15).

Wybrane przypadki infekcji wirusowych po spożyciu zanieczyszczonej żywności i wody

Zakażenia norowirusami są szeroko rozpowszechnione i obecnie notowane są na całym świecie. W tabeli 1. przedstawiono sumaryczne zestawienie notowanych w ostatnich latach największych ognisk choroby wywołanych przez norowirusy, zaś poniżej opisano wybrane przypadki infekcji pokarmowych wywołanych przez te wirusy po spożyciu zanieczyszczonej żywności i wody.

Zachorowania pojawiły się jesienią 2001 r. w południowej Szwecji, gdzie u 30 osób wystąpiły objawy *gastroenteritis*. Wstępne dochodzenie epidemiologiczne wykazało, że osoby chore spożywały ciastka z kremem zawierającym mrożone maliny. Badaniom laboratoryjnym poddano próbki kału od osób chorych oraz mrożone maliny z partii użytej do produkcji kremu. Obecność norowirusa genogrupy I wykazano w 5 z 9 badanych próbek kału oraz genogrupy II w próbkach malin. Przeprowadzone badania potwierdziły, że źródłem zakażenia były maliny. Obecność różnych szczepów wirusa w próbkach klinicznych od chorych oraz w malinach skłoniło autorów do rozważań pozwalających wyjaśnić powyższe różnice. W tym przypadku odniesiono się do badań prowadzonych na małżach, u których uprzednio stwierdzano występowanie zanieczyszczeń mieszanymi szczepami norowirusa przy jednoczesnym zakażeniu ludzi wywołanym przez jeden szczep. W opisanym ognisku choroby prawdopodobnie maliny były zanieczyszczone norowirusami obu genogrup, a tylko jedna wywołała kliniczne objawy

Tab. 1. Wybrane przykłady ognisk *gastroenteritis* wywołanych przez norowirusy po spożyciu zanieczyszczonej żywności

Miejsce wystąpienia zachorowania	Rok	Zanieczyszczona żywność	Liczba zachorowań	Piśmiennictwo
USA	1996	ostrygi	153	Berg i wsp., 2000
USA	1998	szynka, mięso indycze, salami	125	Daniels i wsp., 2000
Finlandia	1998	mrożone maliny	509	Pönkä i wsp., 1999
Szwecja	2001	mrożone maliny	30	Le Guyader i wsp., 2004
Japonia	2001	kapusta	52	Kobayashi i wsp., 2004
USA	2001	lody	84	Parshionkar i wsp., 2003
Francja, Włochy	2003	ostrygi	269	Doyle i wsp., 2002
Dania	2005	mrożone maliny	450	Falkenhorst i wsp., 2005

choroby. Również rozmieszczenie wirusa w partii malin mogło być nierównomierne, tzn. spożyta część malin mogła zawierać jeden szczep wirusa, a próbki malin pobrane do badań wirusologicznych inny (16).

Na przełomie września i października 2001 r. w stanie Wyoming, USA wystąpiło ognisko ostrego *gastroenteritis* u 84 ze 111 osób spożywających posiłki w barze turystycznym. Analizie epidemiologicznej poddano 41 rodzajów żywności, jednak nie wykazano związku między jej spożyciem, a wystąpieniem choroby. W dalszym etapie badaniem objęto wodę pitną z ujęcia wody usytuowanego w bliskiej odległości od zbiornika ścieków. Badania wykazały obecność pałeczek *E. coli* pomimo działających urządzeń chlorujących wodę. Dalsze dochodzenie ujawniło ich nieprawidłowe funkcjonowanie. W analizowanych próbkach wody i kału osób chorujących stwierdzono obecność norowirusów, zaś analiza sekwencyjna potwierdziła ich przynależność do genogrupy I. Norowirusy genogrupy II stwierdzono w jednej próbce wody. Badania laboratoryjne jednoznacznie wskazały na norowirusy jako przyczynę zachorowań osób, które spożywały posiłki w barze (21).

W 2003 we Francji stwierdzono ognisko *gastroenteritis* po spożyciu ostryg. W tym samym czasie informowano o podobnych zachorowaniach we Włoszech (ponad 200 przypadków) po spożyciu ostryg pochodzących z tego samego źródła. Badania epidemiologiczne przeprowadzone we Francji wykazały, że spośród 36 osób, które spożywały surowe ostrygi tylko u 21 osób wystąpiły objawy choroby. W tym samym czasie odnotowano 13 kolejnych ognisk choroby z 69 przypadkami. Przeprowadzone badania laboratoryjne 12 próbek kału z 5 różnych ognisk potwierdziły obecność norowirusów genogrupy I i II w 7 próbkach. W spożywanych ostrygach wykryto norowirusy przynależące do jednej lub obu genogrup. Spośród 3 szczepów norowirusa, wykrytych w próbkach kału we Francji, jeden był identyczny ze szczepem obecnym w ostrygach oraz w próbce kału z Włoch, świadcząc o tym samym źródle zakażenia. Uważa się, że bezpośrednią przyczyną zanieczyszczenia mięczaków były ulewne deszcze, które ułatwiły wtórne zanieczyszczenie ściekami wód przybrzeżnych (6).

Wykrywanie kaliciwirusów w żywności

W związku z narastającą liczbą przypadków infekcji pokarmowych na tle wirusowym u ludzi, wiele laboratoriów wirusologicznych podjęło próby opracowania metod badawczych, umożliwiających przeprowadzenie analizy wirusologicznej próbek żywności. Napotykanie trudności wynikają z braku komercyjnie dostępnych testów diagnostycznych, pozwalających na analizę próbek różnych rodzajów żywności oraz odpowiednich materiałów referencyjnych. Dotychczas stosowane klasyczne metody wirusologiczne np. mikroskopia elektronowa czy hodowle komórkowe posiadają niską czułość, a w związku z tym ich zastosowanie w diagnostyce wirusologicznej żywności jest ograniczone. Ponadto kaliciwirusy ludzi nie namnażają się w hodowlach

komórkowych, a minimalna ich liczba, jaką powinna zawierać badana próbka, aby można je było uwidocznić w obrazie mikroskopu elektronowego, sięga kilkuset tysięcy.

Głównym problemem w wykrywaniu wirusów zanieczyszczających żywność jest brak efektywnej metody ich ekstrakcji i koncentracji z badanych próbek metody, która jednocześnie pozwoliłaby usunąć substancje mające właściwości inhibitorów enzymów używanych w reakcjach amplifikacji. Obecnie stosowane metody diagnostyczne składają się z dwóch etapów, tj. ekstrakcji i koncentracji wirusów z próbek żywności oraz ich detekcji. Niezmiernie ważne jest, aby każdy z tych etapów charakteryzował się maksymalną czułością, pozwalającą na wykrycie jak najmniejszej liczby cząstek wirusowych w badanej próbce. Ekstrakcję wirusów przeprowadza się na drodze homogenizacji próbki (owoce, mięczaki) bądź też jej mycia (warzywa, wędliny) w roztworach substancji pozwalających uwolnić wirusy z powierzchni produktów żywnościowych. W celu określenia czułości zastosowanej metodyki ekstrakcji i detekcji wirusów z próbek żywności wielu badaczy stosuje wirusy modelowe, jak np. poliovirus czy kaliciwirus kotów (FCV). Jest to szczególnie ważne w przypadku pracy z norowirusami, które nie namnażają się *in vitro*. Wirusy modelowe namnażają się w hodowlach komórkowych, dając łatwy do oceny efekt cytopatyczny, który w sposób bezpośredni pozwala określić ich miano, a w dalszej kolejności ocenić stopień odzysku cząstek wirusowych z analizowanych próbek.

Detekcję wirusów w ekstraktach z próbek żywności przeprowadza się w oparciu o techniki pozwalające na wykrywanie materiału genetycznego wirusów. Powszechnie stosowaną metodą jest odwrotna transkrypcja połączona z polimerazową reakcją łańcuchową (RTPCR) oraz jej odmiany, real-time PCR czy NASBA (9-11, 24, 25). Powyższe metody pozwalają uzyskać wysoką czułość w granicach 10^1 - 10^3 cząstek wirusowych w 1 gramie badanej próbki (14). Aby zwiększyć czułość i swoistość zastosowanej metody detekcji, należy dążyć do maksymalnego odzysku wirusa z badanej próbki oraz do usunięcia substancji inhibitorowych, które łącznie z wirusami przedostały się do roztworów elucyjnych. Substancje te w wielu przypadkach prowadzą do zmniejszenia wydajności lub zatrzymania reakcji amplifikacji, co skutkuje znacznym obniżeniem czułości metody oraz uzyskiwaniem wyników fałszywie ujemnych. Włączenie odpowiednich kontroli w proces analizy próbek żywności, np. kontroli dodatniej i ujemnej metody ekstrakcji lub kontroli wewnętrznej reakcji amplifikacji, pozwoli monitorować przebieg każdego etapu metody, wykluczyć wpływ czynników zewnętrznych na uzyskiwane wyniki oraz podnieść wiarygodność przeprowadzonych analiz.

Wrażliwość norowirusów na środki dezynfekcyjne oraz zabiegi stosowane w przetwórstwie spożywczym

Warzywa, owoce oraz mięczaki spożywane są w stanie surowym bądź też poddane tylko niewielkim za-

biegom kulinarnym. Mycie owoców i warzyw jest najczęściej spotykaną praktyką usuwania zanieczyszczeń mechanicznych, owadów i pasożytów z ich powierzchni. W przypadku zanieczyszczeń mikrobiologicznych ta metoda okazała się mniej skuteczna, gdyż tylko redukuje ich ilość (3). Obecnie uważa się, że mycie owoców w niektórych przypadkach może powodować przemieszczenie drobnoustrojów z powierzchni do głębszych ich tkanek. Najczęściej stosowanym środkiem dezynfekcyjnym w przetwórstwie owocowo-warzywnym są roztwory zawierające związki chloru ze względu na niską cenę, łatwość użycia oraz wysoką aktywność bójczą w stosunku do drobnoustrojów. Mimo to w niektórych krajach europejskich wprowadzono zakaz ich stosowania ze względu na silne powinowactwo związków chloru do materii organicznej, a także szybki spadek koncentracji aktywnego chloru w roztworach myjących, co nie gwarantowało skutecznej dezynfekcji. Norowirusy są dość odporne na działanie związków chloru. Dopiero stężenie 10 mg/l tego związku jest stężeniem inaktywującym kaliciwirusy, jednak tak wysoka koncentracja chloru używana jest tylko do dezynfekcji systemów wodociagowych w przypadku ich zanieczyszczenia mikrobiologicznego. Roztwory dezynfekcyjne zawierające chlor nie mogą być stosowane rutynowo do usuwania zanieczyszczeń mikrobiologicznych z każdego typu żywności, gdyż mogą one powodować zmianę właściwości organoleptycznych, np. owoców. Inną grupą związków stosowanych w przetwórstwie owocowo-warzywnym są kwasy organiczne, które mogą hamować wzrost mikroorganizmów. Jednak niskie pH roztworów kwasów organicznych używanych do mycia owoców bądź stosowanych w formie oprysku nie pozbawi właściwości zakaźnych obecnych tam kaliciwirusów (26).

Zapobieganie infekcjom wirusowym przenoszonym przez żywność

Najsukuteczniejszą formą zapobiegania wirusowym infekcjom pokarmowym przenoszonym przez żywność jest ściśle przestrzeganie zasad higieny wśród osób zajmujących się pozyskiwaniem i przetwarzaniem żywności. Szczególny nacisk należy położyć na najprostsze sposoby postępowania, jak np. częste mycie rąk, noszenie rękawiczek czy też zapewnienie odpowiednich warunków sanitarnych na plantacjach owoców. Używanie jednorazowych rękawiczek jest szczególnie ważne tam, gdzie żywność ma bezpośredni kontakt z dłońmi. Należy pamiętać, że rękawiczki nie zabezpieczą żywności przed jej wtórnym zanieczyszczeniem, jeżeli dotykano nimi powierzchni uprzednio zanieczyszczonych wirusami. Wirusy znajdujące się na powierzchni owoców lub w ciele mięczaków nie namnażają się, więc liczba drobnoustrojów, jaka została do nich wprowadzona w miejscu pierwotnej kontaminacji nie ulega zwiększeniu, a wręcz przeciwnie – może się zmniejszyć w związku z przedłużonym okresem i warunkami ich przechowywania. Przechowywanie żywności w niskich, często ujemnych temperaturach wpływa konser-

wującą na obecne na/w niej czynniki wirusowe, przez co żywność jest nadal zanieczyszczona, a więc potencjalnie zakaźna.

Nieprzestrzeganie zasad higieny osobistej było przyczyną większości opisywanych przypadków infekcji pokarmowych u ludzi, kiedy osoba z zanieczyszczonymi wirusami dłońmi zbierała owoce bądź też przygotowywała posiłki. Szczególną uwagę należy zwrócić na osoby z objawami wskazującymi na infekcję przewodu pokarmowego, które z racji wykonywanej pracy mają kontakt z żywnością. Osoby takie powinny zostać tymczasowo odsunięte od wykonywanych zajęć. Obecne zalecenia dotyczące powrotu do pracy osób, u których stwierdzono infekcję wywołaną przez norowirusy wskazują, że może to nastąpić dopiero po 48 godzinach od ustąpienia objawów klinicznych choroby (22).

Należy dążyć do ustawicznego podnoszenia świadomości z zakresu mikrobiologicznego bezpieczeństwa żywności wśród producentów żywności (plantatorów owoców i warzyw), sezonowych pracowników oraz osób zajmujących się przetwarzaniem i przygotowywaniem żywności w małych zakładach gastronomicznych lub zakładach zbiorowego żywienia. Należy określić punkty krytyczne związane z procesem jej pozyskiwania i przetwarzania, ze szczególnym zwróceniem uwagi na mechanizmy, jakie prowadzą do zanieczyszczenia żywności przez wirusy. Kontrolując jakość sanitarną żywności jako gotowego produktu należy zwrócić uwagę nie tylko na proces jej produkcji, przetwarzania czy dystrybucji, ale również na środowisko, z którego ona została pozyskana. Jest to szczególnie ważne w przypadku owoców i warzyw. Woda używana do nawadniania upraw czy plantacji, która nie spełnia wymogów sanitarnych stanowić może główne źródło zanieczyszczenia wirusami. Również hodowla mięczaków powinna być prowadzona w wodach spełniających kryteria sanitarne, a ich zbiór z obszarów zanieczyszczonych powinien być surowo zakazany. Ścieki, szczególnie te, których nie uzdatniano w sposób prawidłowy, przedostając się do rzek lub ujęć wody mogą być przyczyną zanieczyszczenia upraw w momencie powodzi czy lokalnego wystąpienia rzek. Zgodnie z ustawą o odpadach oraz Rozporządzeniem Ministra Środowiska w sprawie komunalnych osadów ściekowych zabrania się rolniczego wykorzystania ścieków do nawożenia użytków rolnych na gruntach przeznaczonych do uprawy roślin spożywanych w stanie surowym. Również komunalnymi osadami ścieków nie wolno nawozić gruntów, na których rosną rośliny jagodowe i warzywa w okresie zbiorów oraz w czasie 18 miesięcy poprzedzających ich zbiór (13).

Przestrzeganie zasad higieny przez osoby zatrudnione w przemyśle rolno-spożywczym oraz zasad dotyczących nawadniania i nawożenia pól uprawnych osadami ścieków, a także okresów karencji, jakie należy zachować przed zbiorem warzyw i owoców z plantacji, pozwoli znacznie zredukować ryzyko wirusologicznego zanieczyszczenia żywności. Z drugiej strony, wprowadzenie diagnostyki oraz ewidencjonowanie wi-

rusowych infekcji przewodu pokarmowego pozwoli ustalić faktyczne źródło zakażenia oraz zastosować odpowiednie procedury mające na celu ograniczenie możliwości transmisji czynnika zakaźnego oraz liczby zachorowań u ludzi.

Piśmiennictwo

1. *Appleton H.*: Control of food-borne viruses. *Br. Med. Bull.* 2000, 56, 172-183.
2. *Berg D. B., Kohn M. A., Farley T. A., McFarland L. M.*: Multi-State outbreaks of acute gastroenteritis traced to fecal-contaminated oysters harvested in Louisiana. *J. Infect. Dis.* 2000, 181, 381-386.
3. *Beuchat L. R.*: Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. WHO/FSF/FOS/98.2. Geneva: Food Safety Unit, WHO.
4. *Caul E. O.*: Small round structured viruses: airborne transmission and hospital control. *Lancet* 1994, 343, 1240-1242.
5. *Daniels N. A., Bergmire-Sweat D. A., Schwab K. J., Hendricks K. A., Reddy S., Rowe S. M., Fankhauser R. L., Monroe S. S., Atmar R. L., Glass R. I., Mead P.*: A foodborne outbreak of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses: first molecular traceback to deli sandwiches contaminated during preparation. *J. Infect. Dis.* 2000, 181, 1467-1470.
6. *Doyle A., Barataud D., Gallay A., Thiolet J. M., Le Guyager S., Kohli E., Vaillant V.*: Norovirus foodborne outbreaks associated with the consumption of oysters from the Etang de Thau, France, December 2002. *Euro Surveill* 2004, 9, 24-26.
7. *Duizer E., Bijker P., Rockx B., de Groot A., Twisk F., Koopmans M.*: Inactivation of caliciviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70, 4538-4543.
8. *Falkenhorst G., Krusell L., Lisby M., Bo Madsen S., Böttiger B., Mølbak K.*: Imported frozen raspberries cause a series of norovirus outbreaks in Denmark, 2005. *Eurosurveillance* 2005, 10, 050922, /www.eurosurveillance.org/.
9. *Jean J., D'Souza D. H., Jaykus L. A.*: Multiplex nucleic acid sequence-based amplification for simultaneous detection of several enteric viruses in model ready-to-eat foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70, 6603-6610.
10. *Jothikumar N., Lowther J. A., Henshilwood K., Lees D. N., Hill V. R., Vinje J.*: Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71, 1870-1875.
11. *Kingsley D. H., Richards G. P.*: Rapid and efficient extraction method for reverse transcription-PCR detection of hepatitis A and Norwalk-like viruses in shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67, 4152-4157.
12. *Kobayashi S., Natori K., Takeda N., Sakae K.*: Immunomagnetic capture RT-PCR for detection of norovirus from foods implicated in a foodborne outbreak. *Microbiol. Immunol.* 2004, 48, 201-204.
13. *Kodeks dobrej praktyki rolniczej, Fundacja Programów Pomocy dla Rolnictwa, Warszawa 2004, wydanie III, s. 36.*
14. *Koopmans M., Duizer E.*: Foodborne viruses: an emerging problem. *Int. J. Food Microbiol.* 2004, 90, 23-41.
15. *Koopmans M., von Bonsdorff C. H., Vinje J., de Medici D., Monroe S.*: Foodborne viruses. *FEMS Microbiol. Rev.* 2002, 26, 187-205.
16. *Le Guyader F. S., Mittelholzer C., Haugarreau L., Hedlund K. O., Alsterlund R., Pommepuy M., Svensson L.*: Detection of noroviruses in raspberries associated with a gastroenteritis outbreak. *Int. J. Food Microbiol.* 2004, 97, 179-186.
17. *Lees D.*: Viruses and bivalve shellfish. *Int. J. Food Microbiol.* 2000, 59, 81-116.
18. *Lopman B. A., Brown D. W., Koopmans M.*: Human caliciviruses in Europe. *J. Clin. Virol.* 2002, 24, 137-160.
19. *Marks P. J., Vipond I. B., Carlisle D., Deakin D., Fey R. E., Caul E. O.*: Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiol. Infect.* 2000, 124, 481-487.
20. „Norwalk-Like viruses” public health consequences and outbreak management. CDC, MMWR 2001, 50, 1-13.
21. *Parshionkar S. U., Willian-True S., Fout G. S., Robbins D. E., Seys S. A., Cassidy J. D., Harris R.*: Waterborne outbreak of gastroenteritis associated with a norovirus. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69, 5263-5268.
22. PHLS Viral Gastroenteritis Sub-Committee (1993) Outbreaks of gastroenteritis associated with SRSVs. *PHLS. Microbiology Digest.* 10, 2-8.
23. *Pönkä A., Manula L., von Bonsdorff C. H., Lyytikäinen O.*: An outbreak of calicivirus associated with consumption of frozen raspberries. *Epidemiol. Infect.* 1999, 123, 469-474.
24. *Sair A. I., D'Souza D. H., Moe C. L., Jaykus L. A.*: Improved detection of human enteric viruses in foods by RT-PCR. *J. Virol. Methods.* 2002, 100, 57-69.
25. *Schwab K. J., Neill F. H., Fankhauser R. L., Daniels N. A., Monroe S. S., Bergmire-Sweat D. A., Estes M. K., Atmar R. L.*: Development of methods to detect „Norwalk-like viruses” (NLVs) and hepatitis A virus in delicatessen foods: application to a food-borne NLV outbreak. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 213-218.
26. *Seymour I. J., Appleton H.*: Foodborne viruses and fresh produce. *J. Appl. Microbiol.* 2001, 91, 759-773.
27. *Svensson L.*: Diagnosis of foodborne viral infections in patients. *Int. J. Food Microbiol.* 2000, 59, 117-126.

Adres autora: dr Artur Rzeżutka, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy;
e-mail: arzez@piwet.pulawy.pl