

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

# ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Διπλωματική εργασία στα πλαίσια του Προγράμματος  
Μεταπτυχιακών Σπουδών Εφαρμοσμένης Δημόσιας Υγείας  
και Περιβαλλοντικής Υγιεινής

Παρασκευή Κ. Πατούκα

Τ.Ε. Δημόσιας Υγιεινής

Λάρισα 2015

## **Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

### **1. ΓΚΟΒΑΡΗΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ**

Καθηγητής, Υγιεινή Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τμήμα Κτηνιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

### **2. ΠΕΞΑΡΑ ΑΝΔΡΕΑΝΑ**

Επίκουρος Καθηγήτρια, Υγιεινή Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τμήμα  
Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

### **3. ΣΟΛΩΜΑΚΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ**

Επίκουρος Καθηγητής, Υγιεινή τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τμήμα Κτηνιατρικής  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

*Αφιερωμένη*

*στη Χλόη μου*

Λέξεις κλειδιά: τροφιμογενείς ιοί, Νοροϊοί, Ηπατίτιδα Α, Ηπατίτιδα Ε, ανίχνευση ιών, πρόληψη ιών.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ιογενείς τροφιμογενείς λοιμώξεις, παρουσιάζουν διαρκώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη δημόσια υγεία παγκοσμίως. Το 2007 εκτιμήθηκε ότι οι ιοί ήταν υπεύθυνοι για το 12% των δηλωμένων εξάρσεων κρουσμάτων τροφιμογενών νοσημάτων στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων αναφέρει ότι το νούμερο αυτό αυξήθηκε στο 14% το 2012 (EFSA 2011, 2014). Αντίστοιχα, στις Η.Π.Α. οι ιοί θεωρείται ότι ευθύνονται για το 67% των τροφιμογενών λοιμώξεων κάθε χρόνο. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organisation-WHO), οι Νοροϊοί (Noroviruses) και ο ιός της ηπατίτιδας Α (HAV) αποτελούν ιδιαίτερα σημαντικούς κινδύνους για την ασφάλεια των τροφίμων, ενώ ο ιός της ηπατίτιδας Ε (HEV) κατατάχθηκε ως αναδυόμενος κίνδυνος. Η υψηλή επικινδυνότητα των ιογενών λοιμώξεων οφείλεται στο μικρό αριθμό ιικών σωματιδίων που χρειάζονται για την ασθένεια, στο μεγάλο αριθμό σωματιδίων που αποβάλλονται από μολυσμένα άτομα, και την περιβαλλοντική σταθερότητα των ιών. Για την προστασία της δημόσιας υγείας είναι επιβεβλημένη η εφαρμογή προληπτικών μέτρων για τον έλεγχο των ιογενών τροφιμογενών λοιμώξεων. Η πρόληψη επιτυγχάνεται, μέσω πρακτικών σωστής υγιεινής, που πρέπει να εφαρμόζονται σε όλα τα στάδια παραγωγής και επεξεργασίας των τροφίμων, διότι η μόλυνση μπορεί να προκύψει κατά την πρωτογενή παραγωγή, τη μετέπειτα επεξεργασία, ή από μολυσμένους χειριστές τροφίμων. Τρόφιμα που επιδέχονται ιδιαίτερης προσοχής και αυστηρού ελέγχου, είναι τα οστρακοειδή, τα φρέσκα-νωπά προϊόντα και τα έτοιμα προς κατανάλωση. Η εφαρμογή των κατευθυντήριων αρχών του *Codex Alimentarius* και η θέσπιση ορίων και πρακτικών πρόληψης από την Ε.Ε. για τους ιούς, κρίνονται απαραίτητες για τον περιορισμό των ιογενών τροφιμογενών λοιμώξεων.

## VIRAL FOOD BORNE INFECTIONS

Keywords: food borne viruses, Noroviruses, Hepatitis A, Hepatitis E, virus detection, virus prevention.

### SUMMARY

The foodborne viral infections, showing a growing interest public health worldwide. In 2007 it was estimated that viruses were responsible for the 12% of reported cases of foodborne disease outbreaks in the European Union. European Food Safety reports that this figure increased to 14% in 2012. (EFSA 2011, 2014). Correspondingly, in the U.S. viruses considered to be responsible for 67% of foodborne infections each year. According to the World Health Organization (World Health Organisation-WHO), nor the (Noroviruses) and hepatitis A virus (HAV) are very significant risks to food safety, while the Hepatitis E (HEV) classified as emerging risk. The high risk of viral infections due to the small number of virus particles needed for the disease in a large number of particles expelled from infected individuals, and the environmental stability of the virus. To protect public health necessitating the application of preventive measures to control foodborne viral infections. Prevention is achieved through proper hygiene practices to be applied at all stages of production and processing of food, because the infection can occur in primary production, further processing, or by infected food handlers. Food susceptible special attention and strict control is shellfish, fresh produce and ready to eat products. The application of the guiding principles of the Codex Alimentarius and establishing limits and prevention practices by the EU for viruses deemed necessary to reduce foodborne viral infections.

	Τίτλος-στοιχεία διπλωματικής εργασίας-εξώφυλλο	
	Τριμελής επιτροπή	
	Αφιέρωση	
	Περίληψη	
	Περιεχόμενα	
	Ευχαριστίες	I
	Κατάσταση πινάκων	II
	κατάσταση διαγραμμάτων	III
	Κατάσταση εικόνων	IV
	Εισαγωγή	1
1	Γενικά χαρακτηριστικά τροφολοιμώξεων	3
1A	Εισαγωγικά	3
1B	Χαρακτηριστικά τροφιμογενών ιών	4
1Γ	Προσδιορισμός κινδύνου	7
2	Ιοί	9
2A	Νοροϊοί	9
2B	Ιός ηπατίτιδας A	17
2Γ	Ιός ηπατίτιδας E	27
2Δ	Εμπλεκόμενοι ιοί σε τροφιμογενείς λοιμώξεις	38
2E	Νεοεμφανιζόμενοι ιοί που σχετίζονται με τρόφιμα	39
	Μέθοδοι εξυγίανσης	
3	τροφίμων	41
3A	Νοροϊοί	42
3B	HAV	44
3Γ	HEV	45
4A	Μέθοδοι ανίχνευσης ιών στα τρόφιμα	46
4B	Στρατηγική ανίχνευσης ιών	46
4Γ	Μέθοδοι ανίχνευσης NoV και HAV	47
4Δ	Μέθοδοι ανίχνευσης HEV	49
5	Πρόληψη & έλεγχος τροφιμογενών ιών	50
5A	Εμβόλια	50
5B	Προστατευτικά-παρεμβατικά μέτρα μετά την έκθεση	51
5Γ	Υγιεινή χειρισμού τροφίμων	52
5Δ	Υγιεινή καλλιέργεια τροφίμων & συγκομιδή	54
5E	Καθαρισμός μολυσμένων υλικών	57
	Ευρωπαϊκή Νομοθεσία στην πρόληψη τροφιμογενών νοσημάτων	
6	νοσημάτων	58
6A	Φρέσκα προϊόντα	59
6B	Κενά Ευρωπαϊκής Νομοθεσίας	60
7	Συμπεράσματα	61
	Βιβλιογραφία	64

## Ευχαριστίες

Ευχαριστώ θερμά την τριμελή επιτροπή μου: τον κ. Αλέξανδρο Γκόβαρη, καθηγητή Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας που δέχτηκε να αναλάβει την επίβλεψή μου, τον κ. Νικόλαο Σολωμάκο επίκουρο καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για το χρόνο που αφιέρωσε και τη βοήθειά του. Επίσης ευχαριστώ ιδιαίτερος την κ. Ανδρέα Πιξάρη, επίκουρο καθηγήτρια του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την αμέριστη βοήθεια και συμπαράστασή της όλο αυτό το διάστημα.

## ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΕΙΚΟΝΩΝ

Α/Α	ΤΙΤΛΟΣ	ΚΕΦΑΛΑΙΟ	ΣΕΛΙΔΑ
1	Νοροϊοί-λοιμογόνος παράγοντάς τους	2 Α	11
2	Σάρωση Νοροϊού από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο	2 Α	14
3	Οργάνωση γονιδιώματος του HAV	2 Β	20
4	HEV-Αντιγραφή	2 Γ	29
5	Φυλογενετικό δέντρο απεικόνισης γονοτύπων HAV	2 Γ	31
6	Πιθανές οδοί μετάδοσης τροφιμογενούς & περιβαλλοντικής μόλυνσης HEVHEV	2 Γ	34
7	GAP	6 Α	60



## ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>A/A</b>	<b>ΤΙΤΛΟΣ</b>	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ</b>	<b>ΣΕΛΙΔΑ</b>
1	Τύποι τροφιμογενούς μετάδοσης & εμπλεκόμενοι ιοί	1B	6
2	Εφαρμογή μέτρων πρόληψης NoV, HAV, HEV που μεταδίδονται με τα τρόφιμα	5A	51
3	Προτεινόμενα μέτρα πρόληψης & ελέγχου NoV σύμφωνα με την ΕΡΑ	5Γ	53

## ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

<b>A/A</b>	<b>ΤΙΤΛΟΣ</b>	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ</b>	<b>ΣΕΛΙΔΑ</b>
1	Αριθμός κοινοποιήσεων ανά έτος για υπόνοιες μόλυνσης από ιό των προϊόντων διατροφής, μέσω RASFF (2000-2010)	1Γ	8
2	Αριθμός κοινοποιήσεων για υποψία μόλυνσης από ιό, σε προϊόντα διατροφής μέσω RASFF (2000-2010) με βάση τις εκθέσεις για την ασθένεια ή την ανίχνευση του ιού	1Γ	8
3	Χαρακτηριστικά επιδημικής έκρηξης Νοροϊών	2Α	10
4	Αναφερόμενα περιστατικά HAV στις Η.Π.Α. για την περίοδο 1980-2013	2Β	19
5	Εξέλιξη δηλούμενης επίπτωσης ηπατίτιδας Α στην Ελλάδα περιόδου 2004-2012	2Β	25

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι ιογενείς τροφιμογενείς λοιμώξεις, αποκτούν συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη δημόσια υγεία παγκοσμίως. Οι ιοί, έχουν αναδειχθεί ως σημαντικό αίτιο στην πρόκληση τροφιμογενών νοσημάτων τα τελευταία χρόνια. Πολλοί από αυτούς, μπορούν να μεταδοθούν μέσω τροφίμων. Ιδιαίτερης σημασίας όμως είναι εκείνοι που προσβάλλουν ανθρώπους και μεταδίδονται, όταν εφαρμόζονται κακές πρακτικές υγιεινής είτε από χειριστές τροφίμων, είτε κατά τη διαδικασία παραγωγής (Mead *et al.*, 1999).

Οι ιοί που μπορούν να μολύνουν τους ανθρώπους, κατηγοριοποιούνται σε 22 οικογένειες. Επιπλέον πολλοί καινούριοι ιοί έχουν πλέον ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί πλήρως χάρη στην εξέλιξη νέων μοριακών τεχνικών, που επιτρέπουν τον πλήρη χαρακτηρισμό του γενετικού υλικού ενός δείγματος (Allander *et al.* 2005; Briese *et al.* 2009; Jones *et al.* 2007). Πολλοί από αυτούς τους ιούς, σχετίζονται με τροφιμογενείς επιδημίες και οι λοιμώξεις τους μπορεί να είναι από απλή γαστρεντερίτιδα, μέχρι σοβαρή εγκεφαλίτιδα. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organisation-WHO), ως κοινά παθογόνα χαρακτηρίζονται οι Νοροϊοί (Noroviruses), οι Ροταϊοί (Rotaviruses), ο ιός της ηπατίτιδας Α, (HAV), οι οποίοι ταξινομήθηκαν ως ιοί πρωτίστης σημασίας με βασικό κριτήριο την επικινδυνότητά τους, ενώ ο ιός της ηπατίτιδας Ε (HEV) κατατάχθηκε ως αναδυόμενος κίνδυνος χωρίς όμως να σημαίνει ότι δεν υπάρχει λόγος ανησυχίας.

Οι δευτερογενείς μολύνσεις από ιούς μέσω των τροφίμων, μπορεί να οδηγήσουν σε μεγάλες εξάρσεις κρουσμάτων (WHO, 2008; Scallan *et al.* 2011). Η συχνότητα των κρουσμάτων των ιογενών τροφιμογενών λοιμώξεων, έχει αυξηθεί σε μεγάλο βαθμό, λόγω της παγκοσμιοποίησης της αγοράς και μεταφοράς τροφίμων, καθώς και της αλλαγής των καταναλωτικών συνηθειών (Rodriguez-Lazaro *et al.* 2009).

Τα τρόφιμα, μπορούν να μολυνθούν σε οποιοδήποτε στάδιο της αλυσίδας παραγωγής, επεξεργασίας και διακίνησης τους. Οι λόγοι μπορεί να είναι οι κακές πρακτικές στην πρωτογενή παραγωγή όπως είναι η άρδευση με μολυσμένο νερό, ή η επαφή των προϊόντων με ανθρώπινα κόπρανα και υλικά μολυσμένα, όταν οι χειριστές που εργάζονται στον τομέα της συγκομιδής φρέσκων προϊόντων, δεν τηρούν τους κανόνες υγιεινής. Επιπλέον μόλυνση μπορεί να προκύψει από ακατάλληλες πρακτικές κατά τη διαδικασία επεξεργασίας ή μετά από διασταυρούμενη μόλυνση

από μολυσμένα σκεύη εργασίας, επιφάνειες ή επαφή με μολυσμένους χειριστές (*Boxman et al. 2009b; D'Souza et al. 2009*).

Τροφιμογενής λοίμωξη ιογενούς προέλευσης μπορεί να συμβεί με τα οστρακοειδή, τα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα και νωπά- φρέσκα προϊόντα τα οποία έχουν μολυνθεί άμεσα ή έμμεσα με ανθρώπινα περιττώματα ή περιέχουν ιούς ζωονοσογόνους, όπως έχει αποδειχτεί για τον HEV με το κρέας του αγριογούρουνου ή του ελαφιού (*Takahashi et al. 2004*).

Οι ιοί που μεταδίδονται μέσω τροφίμων, είναι αρκετά ανθεκτικοί στο περιβάλλον και τα τρόφιμα γι' αυτό θεωρούνται επιβεβλημένες κάποιες μέθοδοι εξυγίανσης των τροφίμων. Οι μέθοδοι που εφαρμόζονται μπορεί να είναι η θερμική επεξεργασία, η ακτινοβολία, η οξίνιση, μέθοδος υψηλής πίεσης, και η επιλογή γίνεται ανάλογα το είδος και τη σύσταση του τροφίμου.

Οι μέθοδοι ανίχνευσης των ιών που βρίσκονται στα τρόφιμα, είναι πολλές και ιδιαίτερα πολύπλοκες. Πολύ σημαντικό βήμα και σχεδόν καθοριστικό στην ανίχνευση των ιών στα τρόφιμα, είναι η στρατηγική δειγματοληψίας και η ευαισθησία της μεθόδου που θα επιλεγεί (*Le Guyader & Atmar, 2008*). Η Ευρωπαϊκή Αρχή Τυποποίησης (European Committee of Standardisation, CEN), ανέπτυξε πρότυπη μέθοδο για την ανίχνευση του Νοροϊού και του HAV στα τρόφιμα, η οποία βασίζεται στη μέθοδο της PCR (*Lees, 2010*).

Όσον αφορά την πρόληψη των τροφιμογενών λοιμώξεων, μπορεί να επιτευχθεί σε μεγάλο βαθμό, με τη διενέργεια εμβολιασμών όπου είναι εφικτό, τη λήψη προστατευτικών μέτρων μετά την έκθεση (*Post Exposure Prophylaxis-PEP*) (*CDC 2007b*), την υγιεινή καλλιέργεια τροφίμων από τη συγκομιδή έως το σερβίρισμα, καθώς επίσης και με τον σωστό καθαρισμό των επιφανειών και υλικών (*USDA, 1999 U.S. Department of Agriculture*). Όλα αυτά κάτω από το ευρύ φάσμα των κανονισμών της Ε.Ε. και των κατευθυντήριων αρχών του *Codex Alimentarius* που αφορούν στην υγιεινή τροφίμων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

### ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΡΟΦΟΛΟΙΜΩΞΕΩΝ

#### 1 Α. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ

Οι ιογενείς τροφιμογενείς λοιμώξεις αποκτούν συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη δημόσια υγεία παγκοσμίως. Οι ιοί έχουν αναδεχθεί ως σημαντικό αίτιο στην πρόκληση τροφιμογενών νοσημάτων τα τελευταία χρόνια. Το 2007 εκτιμήθηκε ότι οι ιοί ήταν υπεύθυνοι σχεδόν για το 12% όλων των δηλωμένων εξάρσεων κρουσμάτων τροφιμογενών νοσημάτων στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων ανέφερε ότι το νούμερο αυτό είχε αυξηθεί στο 14% το 2012 (*EFSA 2011, 2014*).

Οι ιοί ευθύνονται για το 67% των τροφιμογενών λοιμώξεων στην Αμερική κάθε χρόνο. Στις αναπτυγμένες χώρες, οι ιογενείς λοιμώξεις είναι συνήθως σχετικά ήπιες και αντιπροσωπεύουν περίπου το 34% των νοσηλειών, και το 7% των θανάτων που σχετίζονται με τροφιμογενές νόσημα (*Mead et al., 1999*). Η συχνότητα των κρουσμάτων τροφιμογενών νόσων ιογενούς προέλευσης έχει αυξηθεί σημαντικά κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, πιθανώς λόγω της ταχείας παγκοσμιοποίησης της αγοράς τροφίμων, της αύξησης των προσωπικών μετακινήσεων και των μεταφορών τροφίμων, και οι βαθιές αλλαγές στις καταναλωτικές συνήθειες (*Rodriguez-Lazaro et al., 2009*).

Το 1914 ήταν η πρώτη φορά που καταγράφηκε τροφική ασθένεια η οποία πιθανώς προήλθε από ιό και σημειώθηκαν 4 κρούσματα παιδιών με παραλυτική ασθένεια, τα οποία είχαν καταναλώσει γάλα απ' το ίδιο σημείο πώλησης. Τα επόμενα χρόνια παρουσιάστηκαν σε Η.Π.Α. και Ηνωμένο Βασίλειο, νέα κρούσματα τροφιμογενούς πολιομυελίτιδας για τα οποία ευθυνόταν το φρέσκο γάλα. Τα πιο συχνά αναφερόμενα τρόφιμα ήταν το φρέσκο γάλα και οι κρέμες γλυκισμάτων. Το πρώτο κρούσμα ηπατίτιδας Α συνέβη το 1943 επίσης από γάλα, και το 1955 από κατανάλωση οστρακοειδών. Η ανάπτυξη των διαγνωστικών μεθόδων έχει οδηγήσει τα τελευταία χρόνια στην αυξημένη ανίχνευση ιογενών τροφολοιμώξεων (*Cliver, 2008*).

Οι Νοροϊοί και ο ιός της ηπατίτιδας Α είναι οι πιο κοινοί αιτιολογικοί παράγοντες τροφιμογενών ιογενών λοιμώξεων. Για το λόγο αυτό δίνεται ύψιστη

προτεραιότητα για τη δημόσια υγεία, στην παρουσία τους σε οστρακοειδή, φρέσκα προϊόντα και έτοιμα προς κατανάλωση φαγητά, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization-W.H.O.)(FAO-WHO, 2008).

Ένας μεγάλος αριθμός ανθρώπινων εντεροϊών, μπορούν να είναι παρόντες στα τρόφιμα. Χειριστές τροφίμων που έχουν μολυνθεί, είναι υπεύθυνοι για εστίες τροφικής ασθένειας δεδομένου ότι μολύνουν οι ίδιοι τα τρόφιμα με βακτήρια και ιούς. Τα τρόφιμα μπορούν επίσης να μολυνθούν με κόπρανα μέσω του εδάφους που χρησιμοποιείται για λίπασμα, ή με το νερό (Grieg, 2007). Οι ιοί που προέρχονται από ζώα, μπορούν να προσβάλουν και τον άνθρωπο, αλλά σπάνια. Αυτοί βρίσκονται στους στο γάλα, στους σκελετικούς μύες, και σ' άλλους ιστούς που καταναλώνονται (Wooldridge, 2007).

Η πρόληψη της μόλυνσης από τους ιούς, κυριότερα τους Νοροϊούς και τον HAV, πρέπει να επικεντρώνονται σε αποτελεσματικές στρατηγικές ελέγχου. Η πρόληψη επιτυγχάνεται με την εφαρμογή των κατευθυντήριων αρχών του CODEX, που αφορούν την υγιεινή των τροφίμων σε όλα τα στάδιά τους, από την παραγωγή στην κατανάλωση. Η εφαρμογή εμβολιασμών, όπου είναι εφικτή, η λήψη προστατευτικών μέτρων μετά την έκθεση (*Post Exposure Prophylaxis-PEP*) (CDC 2007b), η υγιεινή καλλιέργεια τροφίμων από το τη συγκομιδή έως το σερβίρισμα, και ο σωστός καθαρισμός των επιφανειών και υλικών (USDA, 1999 U.S. Department of Agriculture), είναι ορισμένες πρακτικές που κρίνονται απαραίτητες για την εξασφάλιση σε μεγάλο βαθμό, ασφαλών τροφίμων.

## **1 Β. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΩΝ ΙΩΝ**

Οι ιοί που μεταδίδονται μέσω τροφίμων, είναι μικρού μεγέθους, δεν διαθέτουν περίβλημα λιπιδίων και μπορούν να αναπαραχθούν στα ανθρώπινα κύτταρα. Επιπλέον, είναι σε θέση να επιβιώσουν σε τρόφιμα, και είναι αρκετά σταθεροί σε συνθήκες αποθήκευσης για μεγάλο χρονικό διάστημα. Οι ιοί υπόκεινται πολύ συχνά μεταλλάξεις στην παραγωγή του γονιδιώματος του RNA κατά τη διαδικασία της αντιγραφής. Αυτό πολύ συχνά, έχει σαν αποτέλεσμα, την αποδοτικότερη αντιγραφή σε νέους ξενιστές ή τύπους κυττάρων, και την αύξηση της αντίστασης των ιών σε περιβαλλοντικές συνθήκες (Duizer & Koopmans, 2008).

Οι ιοί που ανιχνεύονται στα τρόφιμα, είναι εντερικοί ιοί που μολύνουν κυρίως τους ανθρώπους. Η μετάδοση μπορεί να γίνει άμεσα από άτομο σε άτομο, ή μέσω των τροφίμων, εφόσον εκτεθούν σε ανθρώπινα περιττώματα. Αν και έχουν ανιχνευτεί κυρίως σε οστρακοειδή, ένας χειριστής τροφίμων, θα μπορούσε να μολύνει ένα ευρύ φάσμα τροφίμων. Οι ιοί που προκαλούν λοιμώξεις σε ζώα, μπορεί να είναι παρόντες σε διάφορους ιστούς, στο γάλα, το κρέας, τα αυγά. Ωστόσο λίγοι είναι εκείνοι που προσβάλλουν τον άνθρωπο. Δεν είναι σαφές αν οι ιοί αυτοί προκαλούν λοιμώξεις στον άνθρωπο επειδή δεν μπορούν να επιβιώσουν στα τρόφιμα, ή αν γι' αυτό ευθύνεται η έλλειψη αναλυτικών μεθόδων (Duiser & Koopmans, 2008).

Οι ιοί που μπορούν να μολύνουν τους ανθρώπους, κατηγοριοποιούνται σε 22 οικογένειες. Επιπλέον πολλοί καινούριοι ιοί έχουν πλέον ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί πλήρως, χάρη στην εξέλιξη νέων μοριακών τεχνικών, που επιτρέπουν τον πλήρη χαρακτηρισμό του γενετικού υλικού ενός δείγματος (Allander et al. 2005; Briese et al. 2009; Jones et al. 2007). Πολλοί από αυτούς τους ιούς, σχετίζονται με τροφικές μεταδόσεις και οι λοιμώξεις τους μπορεί να είναι από απλή γαστρεντερίτιδα, μέχρι σοβαρή εγκεφαλίτιδα. Η μετάδοση είναι δυνατόν να συμβεί είτε από τους χειριστές τροφίμων σε κάποιο στάδιο επεξεργασίας, ενώ σπανιότερα από προϊόντα ζωικής προέλευσης, εφόσον φέρουν ζωνοσογόνο παράγοντα (Jones et al. 2007). Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τρόποι τροφιμογενούς μετάδοσης και παραδείγματα εμπλεκόμενων ιών.

## Πίνακας 1. Τύποι τροφιμογενούς μετάδοσης και εμπλεκόμενοι ιοί

(<http://apps.who.int/>)

	<b>ΠΗΓΗ ΜΟΛΥΝΣΗΣ</b>		
	Πρωτογενής παραγωγή ζωικών προϊόντων	Πρωτογενής παραγωγή φρέσκων προϊόντων και οστρακοειδών	Χειριστές τροφίμων
<b>ΤΡΟΠΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ</b>	Κρέας, γάλα, αίμα,	Απόβλητα, νερό άρδευσης	Χέρια, περιβάλλον, κοπρανοστοματική οδός
<b>ΤΡΟΦΙΚΗ ΑΣΘΕΝΕΙΑ</b>	Σπάνια	Συχνά	Συχνά Norovirus, HAV, HEV
<b>ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ</b>	SARS, Coronaviru sHEV, Ιός εγκεφαλίτιδας, Nipah virus	Norovirus, HAV, HEV	

Πολλοί είναι οι ιοί οι οποίοι μπορούν να μεταδοθούν μέσω τροφίμων. Ιδιαίτερης σημασίας όμως είναι εκείνοι που προσβάλλουν ανθρώπους και μεταδίδονται όταν εφαρμόζονται κακές πρακτικές υγιεινής είτε από χειριστές τροφίμων, είτε κατά τη διαδικασία παραγωγής (Mead *et al.*, 1999). Αυτό ισχύει για εκείνους τους ιούς που μεταδίδονται μέσω της κοπρανοστοματικής οδού. Οι ιοί αυτοί εισέρχονται στον οργανισμό με την κατάποση, εισβάλλουν στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και μετέπειτα αντιγράφονται και παραμένουν στο ίδιο ή σε κάποιο άλλο σημείο του οργανισμού.



Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (*World Health Organisation-WHO*), ως κοινά παθογόνα χαρακτηρίζονται οι Νοροϊοί (*Noroviruses*), οι Ροταϊοί (*Rotaviruses*), ο ιός της ηπατίτιδας Α, (HAV), οι οποίοι ταξινομήθηκαν ως ιοί πρωτίστης σημασίας με βασικό κριτήριο την επικινδυνότητά τους. Οι ιός της ηπατίτιδας Ε (HEV) οι ιοί Nipah, ο ιός της γρίπης H5N1, και ο ιός SARS, κατατάχθηκαν ως αναδυόμενοι κίνδυνοι χωρίς όμως να σημαίνει ότι δεν υπάρχει λόγος ανησυχίας.

Βάσει διαθέσεων πληροφοριών έχει γίνει μια συσχέτιση των συγκεκριμένων κατηγοριών τροφίμων με συγκεκριμένες τροφικές ασθένειες. Ο συνδυασμός τροφίμου-ασθένειας που δημιουργήθηκε, μπορεί να συμβάλει στη λήψη συγκεκριμένων μέτρων πρόληψης και ελέγχου. Οι συσχετισμοί είναι: (<http://apps.who.int/>)

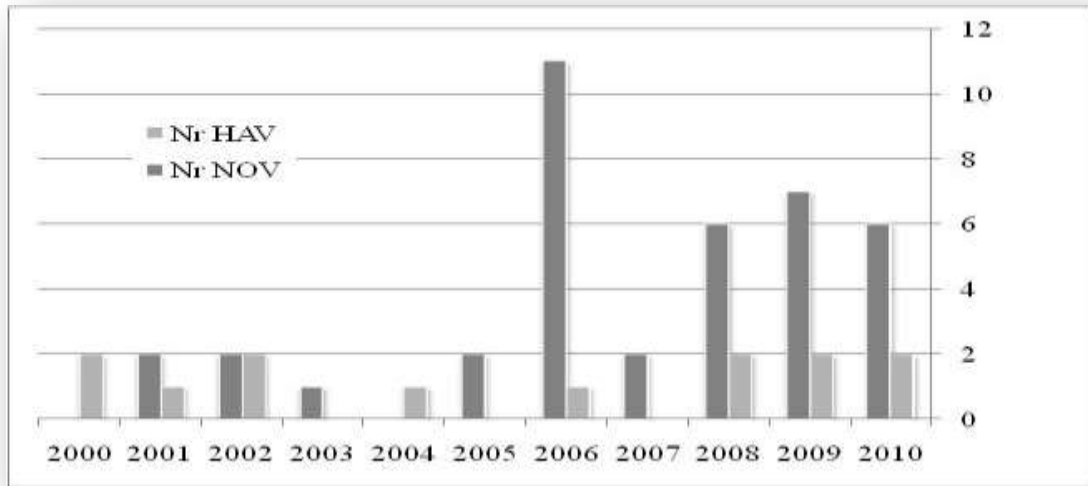
- *NoV* και *HAV* σε μαλάκια και οστρακοειδή.
- *NoV* και *HAV* σε φρέσκα προϊόντα
- *NoV* και *HAV* σε έτοιμα προϊόντα
- *Rotaviruses* σε νερό παρασκευής τροφίμων
- *HEV* σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης

## 1Γ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

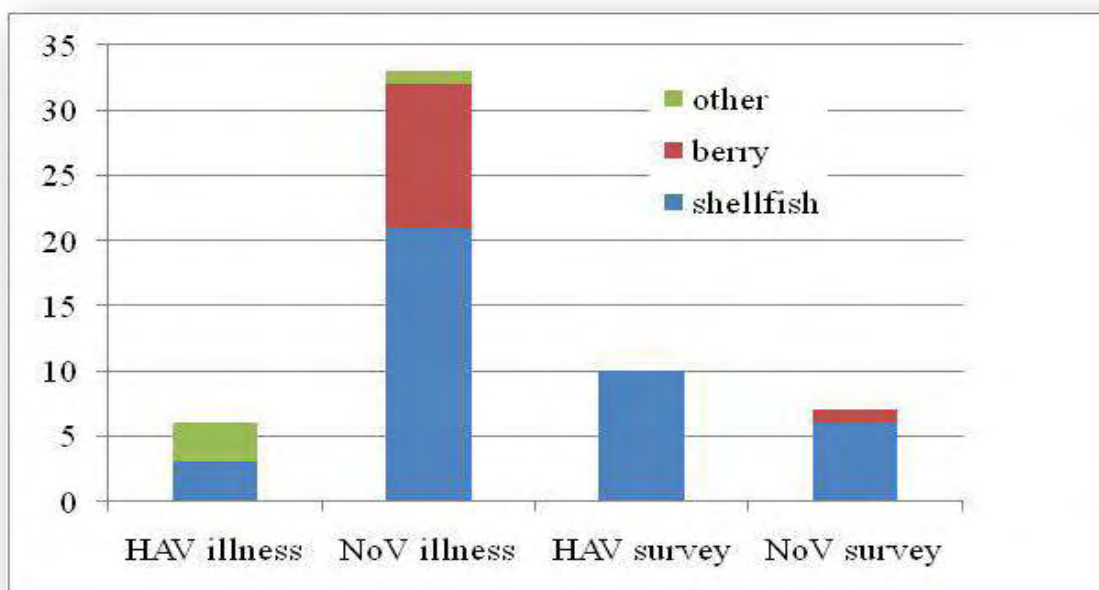
Η πλειονότητα των τροφιμογενών λοιμώξεων ιογενούς αιτιολογίας υποαναφέρονται και υποδιαγιγνώσκονται. Αυτό συμβαίνει διότι τις περισσότερες φορές, τα άτομα που έχουν μια ήπια γαστρεντερίτιδα δεν επισκέπτονται το γιατρό, ενώ μπορεί η γαστρεντερίτιδα να σχετίζεται από ένα τροφιμογενές νόσημα, προερχόμενο από ιό (*EFSA 2011*).

Στην ΕΕ το 2008 τα οστρακόδερμα, τα οστρακοειδή και τα σχετικά προϊόντα ήταν τα πιο συχνά συνδεδεμένα με εξάρσεις κρουσμάτων τροφιμογενών νοσημάτων από ιούς.<sup>1,2</sup> Όμως, το 2013 ένα από τα πιο αξιοσημείωτα θέματα ήταν οι εξάρσεις κρουσμάτων από την παρουσία του ιού της Ηπατίτιδας Α σε μίγματα μούρων και φραουλών, και 315 άτομα μολύνθηκαν σε 11 ευρωπαϊκές χώρες (*EFSA 2014; European Commission 2014, RASFF 2013*).

Το σύστημα έγκαιρης προειδοποίησης για τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές (*Food and Feed Safety Alert-RASFF*) έχει αυξήσει τις κοινοποιήσεις για ύποπτες ιογενείς λοιμώξεις που προκαλούνται από τρόφιμα. Αυτό αντανακλά την ανησυχία και την αύξηση της ευαισθητοποίησης, χωρίς βέβαια να σημαίνει ότι είναι αντιπροσωπευτικά τα στοιχεία, τα οποία πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή (*EFSA Journal, 2011*).



**Διάγραμμα 1.** Αριθμός κοινοποιήσεων ανά έτος για υπόνοιες μόλυνσης από ιό των προϊόντων διατροφής, μέσω του RASFF από το 2000 μέχρι Μάρτιο του 2010 (*EFSA Journal, 2011*).



**Διάγραμμα 2.** Αριθμός κοινοποιήσεων για υποψία μόλυνσης από ιό, σε προϊόντα διατροφής μέσω της RASFF για την περίοδο 2000-2010, με βάση τις εκθέσεις για την ασθένεια ή την ανίχνευση του ιού σε προϊόντα (*EFSA Journal, 2011*).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

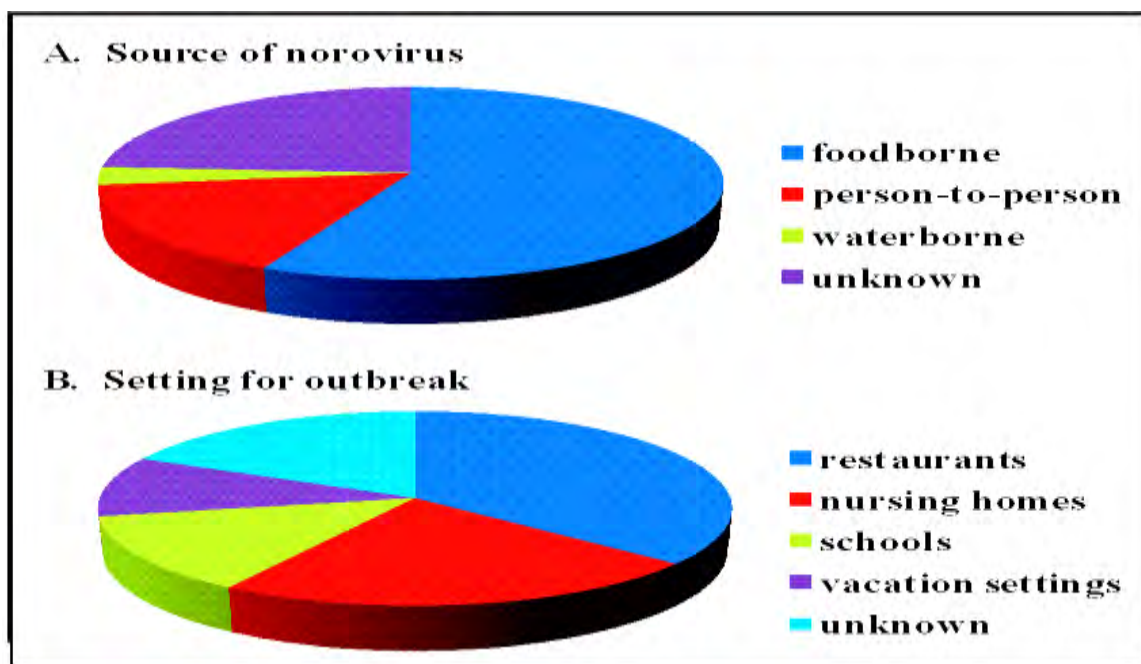
### ΙΟΙ

#### 2.Α. ΝΟΡΟΪΟΙ

Οι Νοροϊοί είναι ιδιαιτέρως λοιμώδη παθογόνα, τα οποία σε οξεία εκδήλωσή τους μπορούν να προκαλέσουν οξεία γαστρεντερίτιδα, σε άτομα όλων των ηλικιών. Η ασθένεια ξεκινάει μετά από περίοδο επώασης 12-48 ώρες και χαρακτηρίζεται κυρίως από οξεία εκδήλωση με διάρροια, έμετο, ναυτίες και κοιλιακό άλγος. Τα συμπτώματα υποχωρούν μετά από 1-3 ημέρες χωρίς θεραπεία. Σε νέα παιδιά και ηλικιωμένους και νοσηλευόμενους όμως διαρκούν 4-6 ημέρες (*Patel et al.2009, Koch et al. 2006*).

Οι Νοροϊοί, είναι εξαιρετικά μεταδοτικοί και μπορούν να μεταδοθούν μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων ή νερού, της επαφής από άτομο σε άτομο και της έκθεσης σε αιωρούμενα σωματίδια εμεσμάτων και διάρροιας. (Σχήμα 1 Α), ενώ σύμφωνα με το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (Centers for Disease Control and Prevention-CDC) θεωρούνται ως η πιο κοινή αιτία τροφιμογενών εξάρσεων (*Patel,M.M.,2008*).

Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά επιδημικών εξάρσεων Νοροϊών, από δεδομένα που έχει συλλέξει το CDC. Τα δεδομένα ελήφθησαν από 232 επιδημικές εξάρσεις μεταξύ Ιουλίου του 1997 και Ιουνίου του 2000. Στο πρώτο γράφημα βλέπουμε την πηγή που βρέθηκε ο Νοροϊός (Α) και στο δεύτερο, πού εκδηλώθηκε η μόλυνση (Β).



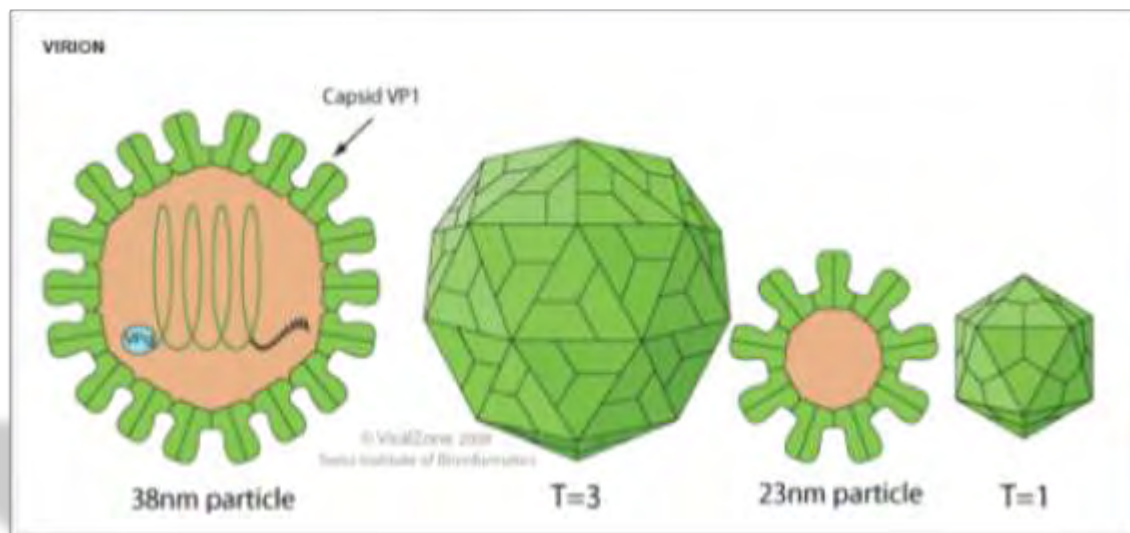
**Διάγραμμα 3.** Χαρακτηριστικά επιδημικής έκρηξης Νοροϊών

<http://www.cdc.gov/ncidod/>

### 2.A.1. Ταξινόμηση

Οι Νοροϊοί είναι μια ομάδα ιών μονόκλωνου RNA χωρίς περίβλημα και ανήκουν στην οικογένεια των *Caliciviridae*, ενώ σύμφωνα με την Διεθνή Επιτροπή για την ταξινόμηση των ιών, ένα από τα είδη του γένους των Νοροϊών, είναι οι *Norwalk* (Marshall & Bruggink 2006). Νοροϊοί και Σαποϊοί, είναι τα ονόματα, δυο από τα πέντε γένη της οικογένειας των *Caliciviridae*, τα οποία επιβεβαιώθηκαν το 2002. Τα υπόλοιπα είναι οι *Lagovirus*, οι *Vesivirus* και οι *Nebovirus*. Οι Νοροϊοί (παλιότερα ονομάζονταν και *Norwalk* τύπου ιοί) είναι ιοί μικροί, δομημένοι κυκλικά (Vasickova et al., 2005).

Το γονιδίωμα των Νοροϊών είναι περίπου 7.6 kb σε μήκος, και τυπικά περιλαμβάνει τρεις ORFs (Open Reading Frame). Η ORF1 κωδικοποιεί τη μη δομική πολυπρωτεΐνη, η ORF2 κωδικοποιεί την κύρια δομή της πρωτεΐνης της κάψας του ιού και η ORF3 κωδικοποιεί ένα βίριο που σχετίζεται με την πρωτεΐνη (Marshall, J.A.; Bruggink, L.D. 2006). Μελέτες έχουν δείξει, ότι Νοροϊοί που βρέθηκαν σε ποντικούς, έχουν μια επιπλέον ORF, την ORF4, η οποία αναδιπλώνει-επικαλύπτει την ORF2 (Thascray et al. 2007).



**Εικόνα 1.** Νοροϊοί - ο λοιμογόνος παράγοντας τους (<http://viralzone.expasy.org/>)

Με βάση την ποικιλομορφία της αλληλουχίας αμινοξέων της ORF2 (ορίζεται και ως VP1), οι Νοροϊοί κατατάσσονται σε πέντε κύριες γενετικές ομάδες, GI έως GVI, οι οποίες διαχωρίζονται περαιτέρω σε γονότυπους (*Kageyama T. et. al 2004*). Οι γενετικές ομάδες GI, GII, GIV είναι γνωστό ότι μολύνουν ανθρώπους (*Zheng et. Al. 2006*). Στη γενετική ομάδα GII ανήκουν και οι Νοροϊοί οι οποίοι έχουν ανιχνευθεί σε χοίρους (*Sugieda et al. 1998*), στην GIII Νοροϊοί βοοειδών (*Oliver et al 2003*), και στην GV ποντικών (*Hsu et al. 2007*).

Σύμφωνα με σημαντική ανασκόπηση για την κατάταξη των Νοροϊών από τους *Zheng et al.(2006)*, εξετάστηκαν 164 αλληλουχίες αμινοξέων από το καψίδιο των Νοροϊών των ζώων και των ανθρώπων και προσδιορίστηκαν πέντε γονοομάδες με 29 γονότυπους, εκ των οποίων οι 8 ανήκουν στην GI, οι 17 στην GII, 2 στην GIII και από ένα στην GIV και την GV(*Zheng et al. 2006*). Σε αντίθεση με τους *Zheng et al.*, οι *Patel et al.* Εντόπισαν 32 γονότυπους μεταξύ των πέντε γονοομάδων.

## 2 A.2 Μετάδοση

Οι Νοροϊοί βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα κόπρανα ή τον εμετό ατόμων που έχουν μολυνθεί. Η μολυσματική τους δόση είναι χαμηλή (18 έως 1000 σωματίδια) (*Teunis PF et al. 2008*). Ο κύριος τρόπος μετάδοσης είναι από άτομο σε άτομο (*Kaplan JE et al.1982*), είτε μέσω της κοπρανοστοματικής οδού, ή με αερόλυμα εμετού. (*Gallimore CI et al. 2005*). Περίπου το 50% του συνόλου των

γαστρεντερίτιδων στις αναπτυγμένες χώρες οφείλονται στους Νοροϊούς. (Patel et al. 2009), ενώ έχει εκτιμηθεί ότι το 30% περίπου του συνόλου των περιπτώσεων που έχουν νοσήσει από Νοροϊούς, είναι οι δευτερογενείς περιπτώσεις, αυτές δηλαδή που έχουν έρθει σε άμεση επαφή με τις πρωτογενείς περιπτώσεις (π.χ. στενές επαφές και μέλη οικογένειας) (Glass, et al., 2009).

Οι Νοροϊοί, είναι συχνά η αιτία σποραδικών περιπτώσεων και εξάρσεων της οξείας γαστρεντερίτιδας στα παιδιά και στους ενήλικες, ιδιαίτερος σε κλειστό περιβάλλον, όπως σχολεία, νοσοκομεία, παιδότοποι, ξενοδοχεία. Οι παράγοντες που συμβάλλουν στην σημαντική επίδραση των Νοροϊών περιλαμβάνουν (Mattison, 2011) :

- Την τεράστια ανθρώπινη δεξαμενή,
- Την χαμηλή δόση μόλυνσης (μόνο 18 με 1000 σωματίδια μπορούν να προκαλέσουν την νόσο),
- την περιβαλλοντική ευρωστία τους,
- την προσωρινή ανοσία στους νοροϊούς (18 μήνες το μέγιστο)
- την ικανότητα τους να μεταδίδονται με διάφορους τρόπους.

Η κλινική εκδήλωση της μόλυνσης από τον Νοροϊό είναι σχετικά ήπια. Τα συμπτώματα είναι εμετός και διάρροια και σπάνια σπασμοί. Οι μη-συμπτωματικές μολύνσεις είναι συχνές και συμβάλλουν στην εξάπλωση της μόλυνσης (Koo et al., 2002).

Η είσοδος των Νοροϊών σε μια κοινότητα, ή γενικότερα σε κάποιο πληθυσμό, μπορεί να ακολουθηθεί από επιπλέον εξάπλωση της ασθένειας, εξαιτίας της ιδιαίτερα μολυσματικής φύσης τους, με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός μεγάλου αριθμού δευτερογενών μολύνσεων, έως το 50% του πληθυσμού (Koo et al., 2010).

### **2.A.3 Επιδημιολογικά στοιχεία**

Σύμφωνα με το CDC οι Νοροϊοί είναι ο πιο κοινός αιτιολογικός παράγοντας τροφιμογενών εκρήξεων στις Ηνωμένες Πολιτείες. Εκτιμάται ότι ετησίως νοσούν 19

με 21 εκατομμύρια, 56.000 με 71.000 νοσηλεύονται, ενώ υποκύπτουν 570 με 800 άτομα. (<http://www.cdc.gov/Features/Norovirus/>). Σε παγκόσμιο επίπεδο, ο γονότυπος (G) II-4 ήταν το κυρίαρχο στέλεχος στις εστίες (*Green et al.2002, Hale et al. 2000, Schreier et al. 2000, Ozawa et al. 2007*). Περιστατικά μόλυνσης από Νοροϊούς, έχουν σχετιστεί πολλές φορές με χώρους σίτισης όπως εστιατόρια, κυλικεία (*Parashar et al. 2001*).

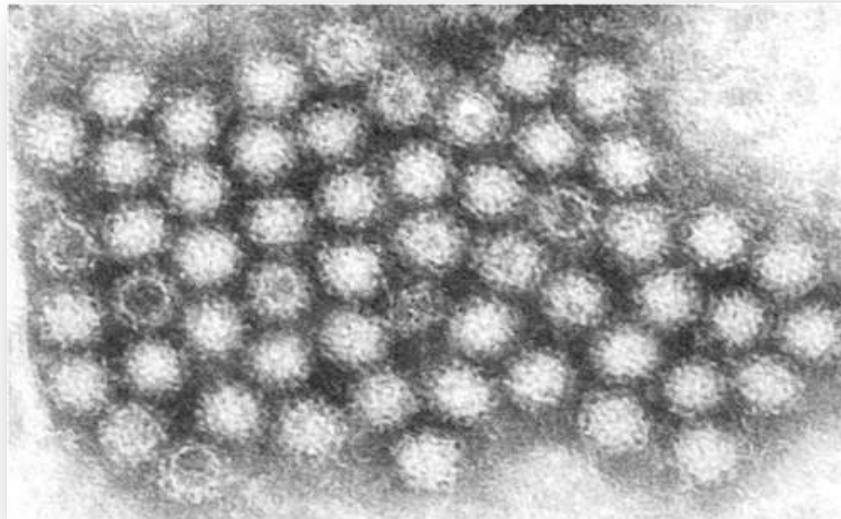
Κάποια δεδομένα του δικτύου NoroNet, δείχνουν την αύξηση της δραστηριότητας του Νοροϊού τον τελευταίο καιρό, και η οποία συσχετίζεται με την παρουσία μια νέας παραλλαγής του γονότυπου GII.4. Οι διαφοροποιήσεις που έχουν προκύψει οδηγούν στην μείωση του επιπέδου της ανοσίας των ανθρώπων και έτσι εξηγούν την αύξηση των επιδημιών. Η πρώτη αναφορά της συγκεκριμένης παραλλαγής αυτού του γονότυπου παρατηρήθηκε στην Αυστραλία τον Μάρτιο του 2012, για αυτό και ονομάστηκε GII.4 Sydney 2012. Επίσης, παρατηρήθηκε στις ΗΠΑ σε 5 από τις 22 επιδημίες τον Σεπτέμβριο του 2012, ενώ τον Νοέμβριο του ίδιου έτους εμφανίστηκε στις 37 από τις 71 επιδημίες (52%). Επίσης, αυτή η παραλλαγή παρουσιάστηκε και στο Βέλγιο αλλά και στην Δανία (*Koo et al., 2010*).

#### **2.A.4 Ανάπτυξη και βιολογικοί παράγοντες**

Πριν από την ανάπτυξη των μοριακών μεθόδων, η γνώση για τους ιούς, ήταν περιορισμένη και αυτό οφειλόταν στην δυσκολία ταυτοποίησής τους. Η ανικανότητα καλλιέργειας των Νοροϊών σε συνδυασμό με τη δυσκολία ταυτοποίησης του ιού με τη βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, καθιστούσαν περιορισμένη την ανίχνευσή τους για πολλά χρόνια. Οι Νοροϊοί είναι πολύ δύσκολο να προσδιοριστούν σε δείγματα κοπράνων ή τροφίμων λόγω του μεγέθους και της φύσης τους. Η ανάπτυξη μεθόδων όπως η πραγματικού χρόνου αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (RealTime-PCR), έχει διευκολύνει την ανίχνευση των Νοροϊών και ο ρόλος τους σε εστίες γαστρεντερίτιδας έχει αποσαφηνιστεί. Η ποικιλομορφία των Νοροϊών καθιστά δύσκολη την ταυτοποίηση όλων των στελεχών (*Vinje et al. 2003*).

Οι παραδοσιακές ανοσολογικές και ορολογικές διαδικασίες ανίχνευσης, δεν μπορούν να εξελιχθούν, λόγω έλλειψης ενός συστήματος καλλιέργειας *in vitro* Νοροϊών, για την παραγωγή αντιγόνων, και εν συνεχεία την παραγωγή αντισωμάτων.

Τα τελευταία χρόνια όμως έχει υπάρξει πρόοδος όσον αφορά την ανίχνευση Νοροϊών με τις εμπορικά διαθέσιμες ανοσοενζυμικές μεθόδους ELISA, οι οποίες εμφανίζουν υψηλή ανοσογονικότητα, καθιστώντας τες κατάλληλες για αντιορούς και παραγωγή εμβολίων. Τα μειονεκτήματα βέβαια που παρουσιάζουν είναι ότι έχουν περιορισμένη ευαισθησία και ειδικότητα και ότι δεν μπορούν να ανιχνεύσουν όλα τα στελέχη των Νοροϊών. (Richards et al., 2003; Burton-Mcleod et al.,2004)



**Εικόνα 2.** Σάρωση Νοροϊού από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Αναδημοσίευση από PHIL,<http://phil.cdc.gov/Phil/home.asp>), των Κέντρων Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων της Ατλάντα.

Λόγω της ιδιαιτερότητάς τους, το ότι δηλαδή δε μπορούν να καλλιεργηθούν, η μολυσματικότητά τους μπορεί να εκτιμηθεί μόνο από πειράματα ανθρώπινης δόσης-απόκρισης, γι' αυτό και είναι λίγα τα στοιχεία για τα χαρακτηριστικά επιβίωσής τους. Μελέτες έχουν δείξει ότι διατηρούν τη μολυσματικότητά τους μετά από θέρμανση στους 60°C για 30 λεπτά, πράγμα που σημαίνει ότι δεν αδρανοποιείται μετά από τη διαδικασία της παστερίωσης. Η μολυσματικότητα του ιού επίσης παραμένει και μετά από έκθεση σε θερμοκρασία δωματίου, σε συνθήκες pH 2,7 για διάστημα 3 ωρών. (Dolin et al.,1972;Green et al. 2001).

Οι Hewit και Greening το 2004 είχαν ακόμη περισσότερες ενδείξεις για την ανθεκτικότητα των Νοροϊών στο χαμηλό pH, όταν μύδια που επεξεργάστηκαν



θερμικά και προστέθηκε και μαρινάδα με pH 3,7 για ένα μήνα, παρατηρήθηκε με τη μέθοδο της RT-PCR ότι δεν υπήρξε μείωση. Οι Νοροϊοί όπως και πολλοί άλλοι εντεροϊοί διατηρούν τη λοιμογόνο δράση τους ακόμη και υπό συνθήκες ψύξης και κατάψυξης, ενώ και η ξηρασία φαίνεται να τους ευνοεί. Αυτό φάνηκε όταν καθαριστές χαλιών νόσησαν μετά από άρση χαλιών σε οικία που είχε επίσης εκδηλωθεί γαστρεντερίτιδα δώδεκα ημέρες πριν (*Cheesburg et al. 2000*).

Οι απόρριψη λυμάτων προκαλεί μόλυνση των οστρακοειδών, των υδάτων αναψυχής, άρδευσης αλλά και του πόσιμου. Πολλές φορές οι Νοροϊοί επιμένουν σε αυτά τα περιβάλλοντα για μεγάλες χρονικές περιόδους, και ιδιαίτερα στα οστρακοειδή, μπορεί να ανιχνευτούν μετά από τέσσερις με έξι εβδομάδες σε φυσικές συνθήκες ανάπτυξης. (*Greening et al., 2003*). Οι Νοροϊοί είναι ανθεκτικοί σε ποσότητες χλωρίου 3,75 έως 6,25 mg/l ποσότητα η οποία ισοδυναμεί με 0,5-1 mg/l ελεύθερου υπολειμματικού χλωρίου η οποία βρίσκεται συνήθως στο πόσιμο νερό. Ευτυχώς όμως όπως έχει αποδειχτεί, σε περιπτώσεις μόλυνσης η αύξηση της χλωρίωσης στα 10 mg/l επιτυγχάνει την αδρανοποίηση των ιών (*Green et al., 2001*)

#### **2.4.5 Τρόφιμα που σχετίζονται με εξάρσεις κρουσμάτων Νοροϊών**

Τρόφιμα που είναι άμεσα συσχετισμένα με επιδημικές εξάρσεις Νοροϊών, είναι εκείνα τα οποία η πηγή συλλογής τους είναι επιβαρυμένη με κόπρανα, όπως είναι τα οστρακοειδή. Όλα τα δίθυρα μαλάκια τρέφονται φιλτράροντας-διηθώντας μεγάλες ποσότητες νερού. Μελέτες έχουν δείξει, ότι τα δίθυρα μαλάκια παρουσιάζουν μεγάλο δείκτη βιοσυσσώρευσης. Τα στρείδια για παράδειγμα, μπορούν να συγκεντρώνουν έως και 99 φορές περισσότερους ιούς σε σύγκριση με το νερό στο οποίο περιβάλλονται (*Burkhart W, 2000*).

Ορισμένοι γονότυποι είναι πολύ πιθανό να σχετίζονται με συγκεκριμένους τρόπους μετάδοσης. Στελέχη της GII.4 συνδέονται συνήθως με μετάδοση, η οποία συντελείται πρόσωπο με πρόσωπο, ενώ στελέχη της GI σχετίζονται συνήθως με μολύνσεις από οστρακοειδή (*Siebenga et al. 2007; Le Guyader et al 2006*)

Στις Η.Π.Α. και στην Ευρώπη, μετά από δειγματοληπτικούς ελέγχους που έγιναν σε διάφορα σημεία πώλησης στρειδιών, καθώς επίσης και σε καλλιέργειες στρειδιών, ανιχνεύθηκαν Νοροϊοί σε ποσοστό 5-55% (*Gentry et al. 2009*). Οι εποχές

κατά τις οποίες ανιχνεύονται οι Νοροϊοί στα οστρακοειδή, είναι από τον Οκτώβρη έως το Φεβρουάριο. Ισχύει δηλαδή επιδημιολογικά ό,τι συμβαίνει στο γενικό πληθυσμό (*Burkhardt, 2000*). Επιπλέον η μόλυνση μπορεί να συμβεί μετά από έντονες βροχοπτώσεις, και σε συνδυασμό με υπερχειλίσεις αποχετεύσεων (*Miossec et al. 2000*).

Οι περισσότερες εξάρσεις κρουσμάτων από Νοροϊούς οφείλονται στην κατανάλωση έτοιμων προϊόντων, όπως σαλάτες, σάντουιτς, φρέσκα προϊόντα (*Turcios et al. 2006*). Τα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα, πολύ συχνά μολύνονται από τους χειριστές τροφίμων που νοσούν κατά τη διαδικασία παρασκευής-προετοιμασίας τους, ακόμη και αν η ασθένεια δεν έχει αναφερθεί από κάποιον.

Μια έξαρση της οξείας γαστρεντερίτιδας, που συνδυάστηκε με την παρουσία Νοροϊών, ήταν αυτή που συνέβη στο πανεπιστήμιο του Τέξας το 2000. Σε δείγματα κοπράνων στους 9 από τους 18 ασθενείς φοιτητές (50%), αλλά και σε δείγματα από ζαμπόν της καφετέριας του πανεπιστημίου, φάνηκε παρουσία του Norwalk ιού. Χρησιμοποιώντας την τεχνική της αντίστροφης PCR (reverse Polymerase Chain Reaction), επιβεβαιώθηκε ότι το φαγητό μολύνθηκε από τα άτομα που ετοίμαζαν τα σάντουιτς (CFDP, 2010).

Αρκετά κρούσματα που αφορούν την κατηγορία των berries όπως τα σμέουρα (raspberrries), αποδεικνύουν για ακόμα μια φορά ότι η μόλυνση από Νοροϊούς μπορεί να γίνει στην πηγή προέλευσής τους (*Gaulin et al. 1999*). Πάντα υπάρχει ο κίνδυνος μόλυνσης πριν τη συγκομιδή τους, εάν τα φρούτα είναι ψεκασμένα με νερό άρδευσης που πιθανώς είναι μολυσμένο με περιττώματα. Οι Νοροϊοί στα μούρα, και τα κρούσματα που σχετίζονται με την παρουσία τους σε κατεψυγμένα σμέουρα και φράουλες είναι ένας αναδυόμενος κίνδυνος για τη δημόσια υγεία

Μεταξύ του 2007 και του 2011, υπήρχαν 27 κρούσματα Νοροϊών που σχετίζονται με σμέουρα (19 από τα κρούσματα σχετίζονται με κατεψυγμένα σμέουρα) και ένα κρούσμα που συνδέονται με φράουλες αναφέρθηκε στην ΕΕ. Επιπλέον, αναφέρθηκε και άλλη εστία Νοροϊού το 2011 στη Φινλανδία (9 περιπτώσεις) που σχετίζεται με μούρα. Σε μια μεγάλη επιδημία γαστρεντερίτιδας που εκδηλώθηκε στη Γερμανία το 2012 με 10.952 κρούσματα, ανιχνεύθηκαν τρεις γονότυποι Νοροϊών, σε δείγματα φράουλας (*Mäde et al. 2013*). Το γεγονός αυτό

ενισχύει την πιθανότητα τα φρούτα να είχαν εκτεθεί σε απόβλητα πριν τη συγκομιδή τους.

Δεν είναι γνωστό εάν σε αυτά τα κρούσματα μόλυνσης από Νοροϊό συνέβησαν μετά από ελάχιστη επεξεργασία ή εάν συνέβησαν κατά τη διάρκεια της πρωτογενούς παραγωγής. Ο Stals και συν. (2013) απέδειξαν ότι ο Νοροϊός GII4, θα μπορούσε να μεταδοθεί και μέσω εξοπλισμού των χειριστών τροφίμων, όπως είναι τα γάντια, σε μία επιφάνεια ανοξειδωτου χάλυβα και στη συνέχεια στα τρόφιμα και το αντίστροφο.

Ακόμη μία έξαρση κρουσμάτων πό Νοροϊό σημειώθηκε στην Αυστρία το Δεκέμβριο του 2007, σε Χριστουγεννιάτικη γιορτή. Από τα 63 άτομα που παρευρίσκονταν στη γιορτή προσεβλήθησαν τα 21, ενώ σε τρία δείγματα κοπράνων εντοπίστηκε Νοροϊός τύπου II. Μετά από έρευνα που διενεργήθηκε με ερωτηματολόγια και προσωπικές συνεντεύξεις, διαπιστώθηκε ότι η μόλυνση προήλθε από ρολλάκια χοιρινού, που επιμολύνθηκαν από βοηθό κουζίνας του οποίου ο υιός νόσησε από γαστρεντερίτιδα (εργαστηριακά τεκμηριωμένη από Νοροϊό), δύο ημέρες πριν τη γιορτή (*Kuo et al. 2009*)

## 2.B. ΙΟΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Α

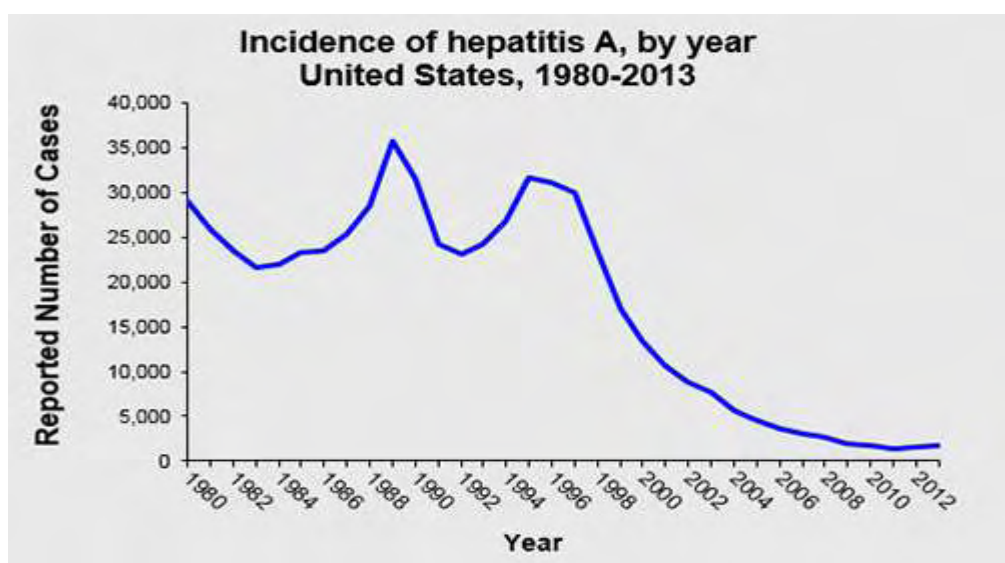
Σύμφωνα με τον Cliver (1997), πολλοί είναι οι ηπατοϊοί οι οποίοι μπορούν να προκαλέσουν ηπατίτιδα. Από όλους αυτούς όμως, μόνο δύο εμφανίζονται ως οι σοβαρότεροι κίνδυνοι και μεταδίδονται μέσω της στοματοεντερικής οδού. Αυτοί είναι ο HAV και ο HEV. Οι ιοί της ηπατίτιδας ονομάζονται έτσι διότι προσβάλλουν το ήπαρ. Παρά το γεγονός ότι έχουν ορισμένες φυλογενετικές και μορφολογικές ομοιότητες, κάθε ένας από τους πέντε διαφορετικούς ιούς, κατατάσσεται σε διαφορετική οικογένεια. Ο ιός της ηπατίτιδας Α προκαλεί σοβαρή ασθένεια, η οποία μεταδίδεται τροφιμογενώς ή υδατογενώς, γνωστή και ως λοιμώδη ηπατίτιδα.

Η ιογενής ηπατίτιδα εμφανίζεται με διάφορες μορφές, οι οποίες αντιπροσωπεύουν ένα σοβαρό παγκόσμιο πρόβλημα δημόσιας υγείας, προκαλώντας σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα (*Bell, 2002*). Η μετάδοσή της γίνεται μέσω της στοματοεντερικής οδού αλλά και μέσω της επαφής από άτομο σε άτομο, ενώ η λοιμογόνος δράση του ιού μπορεί να παραμείνει ενεργή για μεγάλο χρονικό διάστημα σε επιφάνειες και ωμά τρόφιμα (*Bell BP, 2004*). Η λοίμωξη συμβαίνει παγκοσμίως

και είναι ιδιαίτερα συχνή στις αναπτυσσόμενες χώρες, ενώ από το 90% των παιδιών που αναφέρθηκαν ότι έχουν μολυνθεί, τα περισσότερα είναι ηλικίας κάτω των έξι ετών (Cromeans et.al. 2001).

Τα τελευταία χρόνια, η βελτίωση των πρακτικών επεξεργασίας των λυμάτων, συνετέλεσε στη μείωση της συχνότητας εμφάνισης της ηπατίτιδας Α σε πολλές χώρες. Αυτό βέβαια οδήγησε και στην μείωση της ανοσίας σε αυτούς τους πληθυσμούς, με συνακόλουθη την αύξηση της ευαισθησίας στη νόσο. Ο κίνδυνος πλέον έχει αυξηθεί και εντοπίζεται στις εισαγωγές προϊόντων, όπως φρούτων και λαχανικών, από χώρες που χαρακτηρίζονται από υψηλό συγχρωτισμό, χαμηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο και ανεπαρκές δίκτυο ύδρευσης-αποχέτευσης, στις οποίες ο ιός ενδημεί (Fiore, 2004).

Στις Η.Π.Α. το 2013 αναφέρθηκαν 1781 κρούσματα ηπατίτιδας Α, αριθμός που φανερώνει αύξηση σε σχέση με τα 1562 δηλωμένα περιστατικά του 2012. Το ποσοστό αυξήθηκε το 2013, λόγω της επιδημίας που εκδηλώθηκε από την κατανάλωση εισαγόμενου ροδιού. Μετά από προσαρμογή για ασυμπτωματική μόλυνση και αδήλωτων περιστατικών, ο εκτιμώμενος αριθμός ήταν 3473. Τα Κέντρα Πρόληψης Νοσημάτων (CDC) αναφέρουν ότι για τη χρονική περίοδο 1980-2001 κατά μέσο όρο παρατηρούνται 25000 περιστατικά ανά έτος αλλά μετά από διορθώσεις των δεδομένων εκτιμάται ότι τα περιστατικά είναι περίπου 260000 ανά έτος (Fiore, 2004).



**Διάγραμμα 4.** Αναφερόμενα περιστατικά Ηπατίτιδας Α στις Η.Π.Α. 1980-2013. (<http://www.cdc.gov/hepatitis/hav/havfaq.htm#general> )

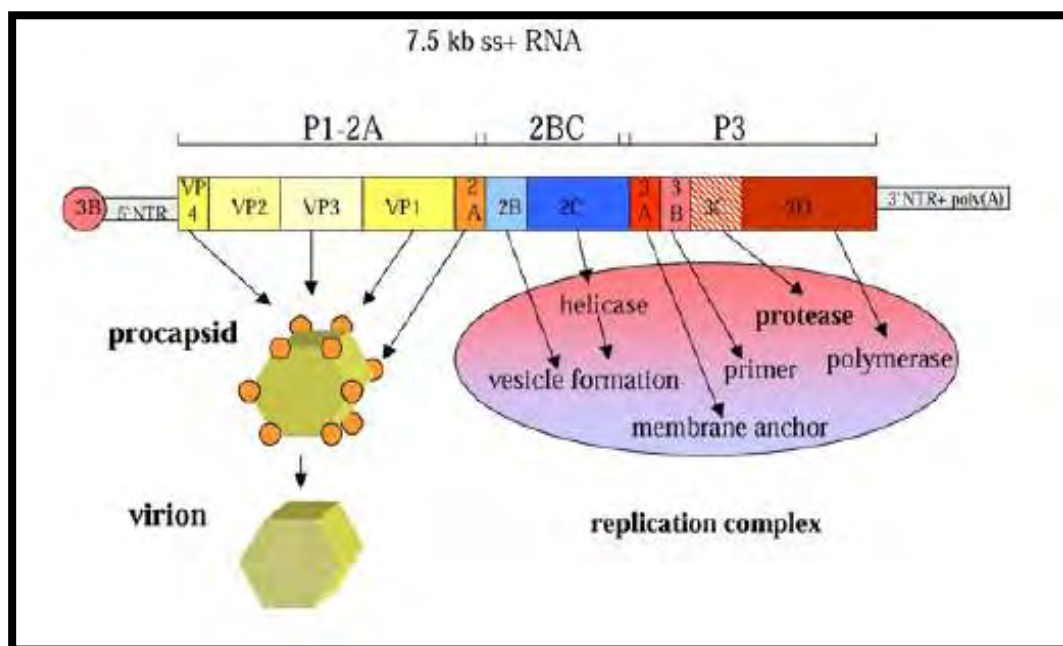
### **2.B.1. Μορφολογία και Ταξινόμηση**

Ο HAV, είναι ένας ιός μονόκλωνου RNA θετικής κατεύθυνσης χωρίς περίβλημα, μεγέθους 27 έως 32nm, με γονιδίωμα 7,5 kb. Η σύνθεσή του αποτελείται εξ' ολοκλήρου από πρωτεΐνη 70% και ριβονουκλεϊκό οξύ 30% (Koff, 1998). Το καψίδιο του είναι συμμετρικό εικοσαεδρικό και έχει χαρακτηρίζεται από μεγάλη πυκνότητα σε χλωριούχο καΐσιο 1,33 έως 1,34 g/ml. Αρχικά ο HAV είχε χαρακτηριστεί ως εντεροϊός *Enterovirus* (ορότυπος 72) οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των Πικορναϊών (*Picornavaridae*). Δεδομένου όμως της μοναδικής του δομικής σύνθεσης του τροπισμού του ιστού του και της γενετικής του απόστασης από τους άλλους πικορναϊούς, κατατάσσεται πλέον και ταξινομείται ως ένα ξεχωριστό γένος ηπατοϊών (*Hepatovirus*) (Rueckert & Wimmer, 1984; Melnick, 1992).

### **2.B.2 Γονιδίωμα και πρωτεΐνες HAV**

Το γονιδίωμα του ιικού σωματιδίου αποτελείται από θετικού κλώνου RNA με μήκος 7.5 kb. Στα δύο άκρα του ιικού γονιδιώματος υπάρχουν περιοχές μη μεταφρασμένες (NTR). Το έντονα διατηρημένο άκρο 5' εκτείνεται στο 10% του συνολικού γονιδιώματος, και συνδέεται ομοιοπολικά με την ιική πρωτεΐνη VPg. (Brown et al., 1991; Melnick, 1992). Από την άλλη, το άκρο 3' τερματίζεται με μία σειρά νουκλεοτιδίων περίπου 40 με 80. Η ORF (Open Reading Frame) κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη, η οποία περιλαμβάνει 2220 αμινοξέα, χωρίζεται σε τρεις λειτουργικές περιοχές: P1, P2, και P3. Η P1, κωδικοποιεί για τα πολυπεπίδια τα οποία ασχολούνται με τη διαδικασία της μεταγραφής μέσα στο καψίδιο. Οι P2, και P3 κωδικοποιούν τα μη δομικά πολυπεπίδια, των οποίων αρμοδιότητα είναι η αντιγραφή (Tochuka και Moritsugu, 1999). Οι ιικές πρωτεΐνες VP1 έως VP4 καθώς επίσης και οι μη δομικές πρωτεΐνες οι οποίες παράγονται από την πολυπρωτεΐνη, αφού όμως προηγηθεί η διάσπαση της ιικής πρωτεΐνης (3Cpro) (Toyoda et al. 1986; Sommergruber et al., 1989).

Κατά την αντιγραφή, μετά την είσοδο στον ξενιστή, ο ιός χάνει το καψίδιό του, και πλέον το «ακάλυπτο» RNA προκαλεί τον ξενιστή να παράγει την ική πολυπρωτεΐνη, χωρίς την διακοπή της σύνθεσης της πρωτεΐνης του κυττάρου. Μεταξύ των ικών πρωτεϊνών, υπάρχει μια πρωτεάση, η οποία βοηθά για την σύνθεση των δομικών πρωτεϊνών, και μια πολυμεράση, που βοηθά για την αντιγραφή του RNA, το οποίο αμέσως ενθυλακώνεται στους νέους ιούς (Vasickova et al. 2005, Hutin et al., 1999).



**Εικόνα 3.** Οργάνωση γονιδιώματος του HAV (<http://viralzone.expasy.org/>)

### 2.B.3 Γονότυπος HAV

Μόνο ένας ορότυπος ηπατίτιδας A έχει τεκμηριωθεί που παρέχει μετά από λοίμωξη δια βίου ασυλία. Η γενετική ετερογένεια του HAV, συνετέλεσε στην περαιτέρω ταξινόμηση σε επτά γονότυπους, οι οποίοι καταγράφονται με λατινική αρίθμηση από το I έως το VII. Η ταξινόμηση προκύπτει βάσει της ανάλυσης της αλληλουχίας των γονιδίων της VP1 και VP3 οι οποίες κωδικοποιούν για επιφανειακές πρωτεΐνες (Robertson και συν. 1991,1992)

Οι γονότυποι I, III, VII, σχετίζονται με ασθένεια που προσβάλλει τους ανθρώπους. Η πλειονότητα των ανθρώπινων στελεχών ανήκουν στους γονότυπους I και III, και το 80% περίπου στο γονότυπο I. Οι γονότυποι I και III χωρίζονται στους

τύπους Α και Β. Όσον αφορά τους γονότυπους ΙΙ και VII περιλαμβάνουν μόνο ένα στέλεχος που προσβάλλει τους ανθρώπους, ενώ οι IV,V,VI περιλαμβάνει στελέχη που προσβάλλει τους χιμπατζήδες (*Patricia Arauz-Ruiz, 2001*)

#### **2.B.4 Ανάπτυξη και βιολογικοί παράγοντες**

Ο HAV μπορεί να καλλιεργηθεί σε αρκετές και διαφορετικές κυτταρικές σειρές όπως BSC-1 από νεφρό πιθήκου, FRhK-4 FRhK-6 εμβρυικά κύτταρα πιθήκου ρέζους και ανθρώπινους ινοβλάστες HF. Ο ιός συνήθως αναπτύσσεται με αργό ρυθμό και από την καλλιέργειά του προκύπτει η πιο χαμηλή απόδοση σε σχέση με τους υπόλοιπους πικορναϊούς γεγονός που κάνει πολύ δύσκολο τον προσδιορισμό του σε πηγές από κλινικές, τρόφιμα και περιβάλλοντος ιδιαίτερα αν καλλιεργηθεί μόνος του.

Ο ιός της ηπατίτιδας Α είναι υψηλής αντοχής σε φυσικοχημικούς παράγοντες όπως είναι η θερμότητα, η ξηρασία, το χαμηλό pH και οι διάφοροι διαλύτες. Η επιβίωση του στο περιβάλλον, ακόμα και στο θαλασσίνο νερό και τα θαλάσσια ιζήματα, μπορεί να ανέλθει σε περισσότερο από τρεις μήνες (*Sobsey et al., 1988*). Μετά από επώαση 60 λεπτών στους 60 °C, ο ιός διατηρεί τη μολυσματικότητά του, ενώ μετά από επώαση στους 56 °C για 10-12 ώρες είναι εν μέρει αδρανοποιημένος. Στα τρόφιμα και ιδιαίτερα τα οστρακοειδή, η ανθεκτικότητα του ιού είναι μεγαλύτερη. Ο εμβολιασμός στρειδιών με HAV, και η μετέπειτα θέρμανσή τους στους 60 °C για 19 λεπτά, έδειξε ότι ο ιός στο δείγμα δεν είχε αδρανοποιηθεί πλήρως (*Hollinger & Emerson, 2001*).

Ο HAV παραμένει λοιμώδης μετά από ψύξη αλλά και κατάψυξη. Εκτός βέβαια από τη θερμότητα και την ψύξη, χημικές ουσίες όπως είναι το χλώριο, το οποίο είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες απολύμανσης, είναι μερικώς αποτελεσματικό στην απομάκρυνση του ιού. Αυτό βέβαια μπορεί να οφείλεται και σε διαφορετικές πρακτικές χειρισμού στα πλαίσια των πειραμάτων. Ωστόσο ο HAV αδρανοποιείται με ιονίζουσα ακτινοβολία, φαινόλη και φορμαλδεΰδη (*Siegel & et al.1984*).

Ο HAV μπορεί να παραμείνει βιώσιμος σε κόπρανα μετά από 30 ημέρες σε συνθήκες που προσομοιώνουν μία τυπική περιβαλλοντική έκθεση (*McCausland et al., 1982*). Σε μελέτες που έχουν γίνει, βρέθηκε ότι ο HAV μπορεί να επιβιώσει σε ορισμένες επιφάνειες όπως για παράδειγμα από ανοξειδωτο χάλυβα οι οποίες είναι

μολυσμένες με κόπρανα, για τουλάχιστον τέσσερις ώρες. Αυτό ενέχει τον κίνδυνο της μόλυνσης των δακτύλων από τις επιφάνειες αλλά και το αντίστροφο (*Mbithi et al., 1991*). Η μεταφορά αυτή επηρεάζεται θετικά από την υγρασία. Επιπλέον η ικανότητά του να μεταφέρεται σε διαφορετικά περιβάλλοντα τον καθιστά ιδιαίτερα σημαντικό στην εξάπλωσή του σε στάδια παρασκευής τροφίμων. Ενδεικτικό των παραπάνω είναι η έξαρση ηπατίτιδας που ξέσπασε από τους δίσκους καφετέριας. Οι δίσκοι είχαν μολυνθεί από νοσούντα χειριστή τροφίμων και στη συνέχεια τα τρόφιμα ήρθαν σε άμεση επαφή με τους δίσκους (*Cliver 1985*).

Ο HAV έχει την ιδιότητα να επιβιώνει σε θαλασσινά νερά για αρκετές εβδομάδες και ακόμη περισσότερο όταν οι θερμοκρασίες είναι πιο χαμηλές (*Bosch, 1995; Crance et al., 1998; Callahan et al., 1995*). Για το λόγο αυτό μπορεί να επιβιώσει για αρκετές εβδομάδες στα οστρακοειδή. Το ίδιο μπορεί να συμβεί και με τα γλυκά ύδατα, όπου έχει παρατηρηθεί ότι η απώλεια της μολυσματικότητάς του είναι πολύ μικρή, μετά από 48 ημέρες (*Springthorpe et al., 1993*).

Στο νερό της βρύσης ο ιός μπορεί να παραμείνει ενεργός μετά από 60 ημέρες (*Enriquez et al., 1995*). Όσον αφορά την άρδευση των καλλιεργειών, σε περίπτωση που αυτή γίνει με μολυσμένο νερό, όπως για παράδειγμα οργανικά απόβλητα, τότε πολύ εύκολα μπορούν να επιμολυνθούν και τα τρόφιμα με εντερικούς ιούς (*Rzezutka & Cook, 2004*). Σε μελέτη που έγινε από τον Stine και τους συνεργάτες του το 2005, διαπιστώθηκε ότι μετά από εμβολιασμό φρούτων και λαχανικών με τον ιό της ηπατίτιδας A, η επιβίωσή του ήταν σαφώς μεγαλύτερη σε εκείνα που είχαν λιγότερη υγρασία. Επιπλέον το γεγονός ότι έχουν αναφερθεί αρκετά κρούσματα ηπατίτιδας A σε κατεψυγμένα φρούτα και γενικότερα κατεψυγμένα τρόφιμα, υποδεικνύει ότι ο ιός μπορεί να είναι ενεργός ακόμη και σε συνθήκες κατάψυξης (*Hutin et al., 1999; Ramsey & Upton, 1989*).

### **2.B.5 Μετάδοση και εκδήλωση νόσου**

Η ηπατίτιδα A είναι μία νόσος η οποία είναι αυτοπεριοριζόμενη σε μερικές εβδομάδες και ποτέ δεν οδηγεί σε χρόνια ηπατίτιδα.. Πρόκειται για μία οξεία λοιμώδη νόσο που προκύπτει από μόλυνση με τον ιό της ηπατίτιδας A (APV) (*Ryan KJ, Ray CG 2004*).

Ο HAV μολύνει τα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου και τα κύτταρα του ήπατος προκαλώντας αύξηση των ηπατικών ενζύμων και φλεγμονή στο ήπαρ. Ο



ιός αποβάλλεται από τα κόπρανα μολυσμένων ατόμων, με το μέγιστο της μολυσματικότητας μία με δύο εβδομάδες πριν την έναρξη των κλινικών συμπτωμάτων, όπως είναι η εμφάνιση του ίκτερου, ή η αύξηση των ηπατικών ενζύμων, κατά τα οποία η συγκέντρωση του ιού στα κόπρανα και τον ορό είναι αυξημένη. Στα παιδιά κάτω των 6 ετών η νόσος περνάει υποκλινικά, ενώ οι ενήλικες εμφανίζουν συμπτώματα σε ποσοστό 70% (<http://www.keelpno.gr/>)

Οι περισσότερες μολύνσεις συμβαίνουν στα παιδιά στα οποία η νόσος, στις περισσότερες περιπτώσεις, είναι είτε ασυμπτωματική ή συμπτωματική χωρίς ίκτερο. Στους ενήλικες, η μόλυνση είναι πιο σοβαρή, με γενικά συμπτώματα αδιαθεσίας και ίκτερο (70%). Ωστόσο, τα συμπτώματα της ηπατίτιδας Α είναι ήπιας μορφής, ακόμη και υπό την παρουσία ίκτερου (*Hutin et al., 1999*). Το ποσοστό θνησιμότητας είναι 0,3% αλλά σε ηλικίες άνω των 50 ανέρχεται σε 1,8% (<http://www2.keelpno.gr/>)

#### **2.B.6. Επιδημιολογικά στοιχεία**

Κάθε χρόνο καταγράφονται σε όλο τον κόσμο περίπου 1,5 εκατομμύρια περιστατικά ΗΑV. Το κατά πόσο σε μία περιοχή ενδημεί η νόσος, εκτιμάται από οροεπιδημιολογικές μελέτες, οι οποίες εκτιμούν το ποσοστό των ατόμων κάθε ηλικιακής ομάδας του πληθυσμού, που έχει αποκτήσει ανοσία έναντι του ιού. Αυτό εκτιμάται από την παρουσία IgA anti- ΗΑV στον ορό (*WHO, 2000*).

Το 2010 σημειώθηκε μικρή αύξηση των θανάτων της οξείας ηπατίτιδας Α σε σχέση με το 1990. Συγκεκριμένα, από τους 99.000 θανάτους, αυξήθηκαν και ανήλθαν σε 102.000 το 2010 (*Lozano, R., 2012*). Ο ιός της ηπατίτιδας Α είναι συνηθισμένος σε περιοχές με ανεπαρκή υγιεινή, όπου η πρόσβαση σε καθαρό νερό είναι περιορισμένη. Οι περιοχές οι οποίες χαρακτηρίζονται ως υψηλής ενδημικότητας, είναι αυτές που βρίσκονται σε εκείνα τις γεωγραφικά μέρη, με χαμηλά επίπεδα κοινωνικής οικονομίας και υγιεινής. Τέτοιες είναι ορισμένες περιοχές της Ασίας, της Αφρικής και της Νότιας και Κεντρικής Αμερικής. Στις περιοχές αυτές η μόλυνση που έχει προκληθεί είναι ασυμπτωματική και στις λίγες περιπτώσεις που υπάρχουν συμπτώματα είναι πολύ ήπια.

Στις υψηλά ενδημικές περιοχές οι ενήλικες παρουσιάζουν ανοσία στον ΗΑV και οι επιδημίες ηπατίτιδας Α δεν είναι συνηθισμένες. Σε λιγότερο ενδημικές

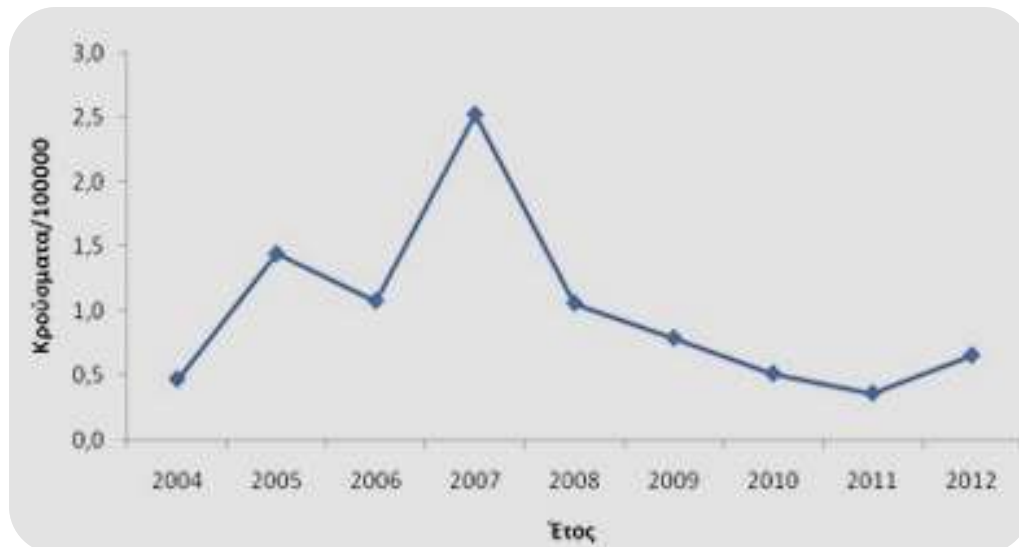
περιοχές, η μετάδοση του ιού είναι πιο συχνή σε εφήβους, ενήλικες και όχι τόσο σε παιδιά. Στις περιοχές χαμηλής ενδημικότητας, η μόλυνση είναι λιγότερο συχνή, αλλά η ασθένεια εμφανίζεται σε άτομα υψηλού κινδύνου.

Η ηπατίτιδα Α είναι μία από τις ασθένειες που μπορείς να προλάβεις μέσω εμβολιαστικής κάλυψης (*Jacobsen, KH; Wierma, ST, 2010*). Στις Η.Π.Α. και όχι μόνο εκεί, ένας πολύ σημαντικός παράγοντας κινδύνου είναι τα διεθνή ταξίδια. Στις αναπτυγμένες χώρες, περιπτώσεις ηπατίτιδας Α, σχετίζονται με ταξιδιώτες που κάνουν συγκεκριμένες τουριστικές διαδρομές, με ιδιαίτερες προτιμήσεις και συμπεριφορές όσον αφορά τη διαμονή και σίτιση, ειδικά όταν επισκέπτονται περιοχές υψηλού συγχρωτισμού, με κακές συνθήκες υγιεινής.

#### **2.B.7. Επιδημιολογικά στοιχεία στην Ελλάδα**

Η Ελλάδα πριν χρόνια θεωρούνταν χώρα υψηλής ενδημικότητας για την ηπατίτιδα Α. Μετά όμως από μελέτες που έγιναν τη δεκαετία του '80, χαρακτηρίστηκε ως ενδιάμεσης ενδημικότητας για τη νόσο (*Kremastinou et al., 1984*). Ωστόσο από το 1990 και μετά παρουσιάστηκε μεγάλη εισροή μεταναστών, από χώρες με ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό ενδημικότητας. Οι μετανάστες αυτοί έχουν αποκτήσει ανοσία. Τα παιδιά τους όμως τα οποία είναι επίνουσα μπορούν να ταξιδέψουν στην πατρίδα τους, να μολυνθούν και να μεταδώσουν τη νόσο σε άλλα επίνουσα άτομα, κατά την επιστροφή τους στη χώρα που τους φιλοξενεί (*Baaten GG. et al., 2007*). Παρόλο που το ποσοστό της συχνότητας της νόσου στο γενικό πληθυσμό έχει μειωθεί, παραμένει υψηλό σε ομάδες ατόμων όπως είναι οι αθίγγανοι και οι υπάλληλοι καθαριότητας.

Τη χρονική περίοδο 2004- 2012, στο Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων, δηλώθηκαν περίπου 995 κρούσματα ηπατίτιδας Α, μέσω του Συστήματος Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων. Στο γράφημα 1 παρουσιάζεται η επίπτωση της νόσου για τη χρονική αυτή περίοδο.



**Διάγραμμα 5.** Εξέλιξη δηλούμενης επίπτωσης (κρούσματα/ 100000 πληθυσμού) ηπατίτιδας Α, στον ελλαδικό χώρο. Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων 2004-2012. (<http://www2.keelpno.gr/blog/?p=3793>)

Την περίοδο 2004-2012, δηλώθηκαν 20 συρροές/επιδημίες ηπατίτιδας Α. Ο αριθμός των καταγεγραμμένων κρουσμάτων σε επιδημία του 2007, ήταν 124. Το 82% ήταν αθίγγανοι και το 78% ήταν παιδιά ηλικίας 2-10 ετών. Το 2013 δηλώθηκε επιδημία σε καταυλισμό αθιγγάνων στο Νομό Κορινθίας. Τα δηλωμένα κρούσματα ήταν ηλικίας 1 έως 15 ετών και ο συνολικός τους αριθμός 14, εκ των οποίων τα 8 ήταν εργαστηριακά επιβεβαιωμένα. Μετά την επεξεργασία δεδομένων διαπιστώθηκε ότι η επιδημία ήταν ενδεικτική μετάδοσης από άτομο σε άτομο. Οι κακές συνθήκες διαβίωσης, υγιεινής και η χαμηλή εμβολιαστική κάλυψη, ήταν οι παράγοντες που υποβοήθησαν στην εκδήλωση της επιδημίας.

Μετά από εκπόνηση μελέτης που έγινε από τον Παναγιωτόπουλο και τους συνεργάτες του (2012), για την εμβολιαστική κάλυψη σε εθνικό επίπεδο έναντι της νόσου, διαπιστώθηκε ότι ήταν αρκετά υψηλή. Το 88% των παιδιών ήταν εμβολιασμένα με μία δόση και το 82% με δύο δόσεις. Σαν συμπέρασμα της μελέτης, ήταν επίσης το γεγονός ότι τα παιδιά των αθιγγάνων εμβολιάζονται με μία δόση,

χωρίς όμως να κάνουν τη δεύτερη, μη ολοκληρώνοντας μ' αυτό τον τρόπο το εμβολιαστικό σχήμα..

### **2.B.8. Τρόφιμα που σχετίζονται με HAV**

Ο HAV έχει σχετιστεί πολλές φορές με εξάρσεις κρουσμάτων που προέρχονται από τρόφιμα. Η μόλυνση τις περισσότερες φορές προκαλείται είτε κατά τη συγκομιδή είτε κατά τη διάρκεια χειρισμού των τροφίμων. Αρκετές από τις επιδημικές εκρήξεις που έχουν συμβεί, είναι εργαστηριακά τεκμηριωμένες και προέρχονται από την κατανάλωση μολυσμένων οστρακοειδών.

Η μεγαλύτερη συνέβη στην Κίνα το 1988, όταν 300.000 άτομα μολύνθηκε με HAV μετά από κατανάλωση ατελώς μαγειρεμένων μυδιών, τα οποία είχαν συλλεχθεί από περιοχή με ακατέργαστα λύματα (*Halliday et al., 1991*). Άλλες επιδημικές εκρήξεις που προκλήθηκαν από οστρακοειδή είναι στην Αυστραλία και Βραζιλία από στρείδια (*Conaty et al. 2000; Coelho et al., 2003*), στην Ιταλία και Ισπανία από μύδια και άλλα οστρακοειδή (*Crosi et al., 2000; Bosch et al., 2001*). Στην Ιταλία, την Ισπανία και άλλες ευρωπαϊκές χώρες είναι ένα πολύ κοινό και συνηθισμένο πρόβλημα τα μολυσμένα με HAV οστρακοειδή. Τις περισσότερες φορές η κύρια πηγή μόλυνσης είναι τα λύματα.

Πολλές φορές έχουν αναφερθεί περιπτώσεις μόλυνσης τροφίμων φρούτων και λαχανικών πριν από τη συγκομιδή. Φράουλες (*Niu et al., 1992*) σμέουρα (*Reid & Robinson, 1987; Ramsay και Upton, 1989*), μύρτιλλα (*Calder και συν., 2003*), μαρούλι (*Pebody et al., 1998*), και πράσινα κρεμμυδάκια (*CDC, 2003*) ενοχοποιήθηκαν για κρούσματα ηπατίτιδας Α σε χώρες όπως η Φινλανδία και η Νέα Ζηλανδία, στις οποίες τα ποσοστά ανοσίας στην ασθένεια είναι πολύ χαμηλά (*Pebody et al., 1998 Calder et al., 2003*). Η αιτία αυτών των τροφολοιμώξεων προήλθε είτε από τα άτομα που συνέλλεξαν τη σοδειά, είτε από μολυσμένα ύδατα άρδευσης.

Μια ακόμη κύρια πηγή μόλυνσης με HAV, είναι μέσω των χειριστών τροφίμων. Ο HAV αποβάλλεται από τα κόπρανα πριν γίνουν εμφανή τα συμπτώματα. Έτσι λιγότερα από  $10^6$  σωματίδια του ιού μπορούν να αποβληθούν στα κόπρανα μολυσμένων χειριστών τροφίμων, χωρίς αυτοί να το αντιληφθούν. Σε χώρες με κακές συνθήκες υγιεινής, αυτό μπορεί να είναι μείζον πρόβλημα. Στις χώρες αυτές τα

ποσοστά ανοσίας είναι υψηλά, ο κίνδυνος όμως ελλοχεύει για τους τουρίστες και όσους δεν είναι εμβολιασμένοι.

### 2.B.9. Ανίχνευση HAV

Ο ιός της ηπατίτιδας Α αρχικά ανιχνεύτηκε στα κόπρανα, με τη βοήθεια των αντισωμάτων ορού τα οποία περιέχει (*Feinstone et al., 1973*). Τα κόπρανα είχαν συλλεχθεί από φυλακισμένους εθελοντές (*Boggs et al., 1970*) που εμβολιάστηκαν από τον Krugman και τους συνεργάτες του με το στέλεχος MS-1 του ιού της ηπατίτιδας Α (*Krugman et al., 1967*). Η τεχνική με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο χρησιμοποιήθηκε για τη δοκιμασία ειδικών αντισωμάτων anti-HAV στον ορό, σε καταστάσεις ανάρρωσης μετά από μόλυνση, για τη διερεύνηση της μετάδοσης του ιού (*Dienstag et al., 1975*).

Ο HAV μπορεί να ανιχνευτεί με τη βοήθεια ποικίλων μοριακών και ανοσολογικών τεχνικών, όπως είναι η ραδιοανοσοδοκιμασία (RIA), η υβριδισμού DNA-RNA (*Ticehurst και συν., 1987*) και η μέθοδος της αντίστροφης μεταγραφάσης PCR (RT-PCR). Το γεγονός ότι έχουν αναγνωριστεί νέα στελέχη τα οποία εμπλέκονται στην παρεντερική μετάδοση του ιού, οφείλεται στην RT-PCR (*Mannucci et al. 1994*).

## 2.Γ. ΙΟΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Ε

Η ηπατίτιδα Ε είναι από παλιά γνωστή ως «εντερικά μεταδιδόμενη μη-Α, μη-Β, μη-С ηπατίτιδα». Πρόκειται για λοιμώδη ιογενή νόσο, της οποίας τα μορφολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά είναι κοινά με της οξείας ηπατίτιδας. Η νόσος για όσους έχουν προσβληθεί απ' τον ιό εξελίσσεται ήπια, εκτός απ' τις εγκυμονούσες στις οποίες το ποσοστό θνησιμότητας μπορεί να ανέλθει στο 20% (*Aggarwal & Jameel, 2011*). Όπως αναφέρεται από τους Emerson και Purcell (2003), το 1980, εντοπίζεται για πρώτη φορά ο αιτιολογικός παράγοντας της νόσου, η οποία οφείλεται στον HEV.

Η ηπατίτιδα Ε είναι μια σοβαρή νόσος ιδιαίτερης σημασίας για τη δημόσια υγεία και πλήττει κυρίως τις αναπτυσσόμενες χώρες, όπως είναι η κεντρική και

νοτιοανατολική Ασία, η Μέση Ανατολή και ορισμένες περιοχές της Αφρικής και της Αμερικής. Στις χώρες αυτές η νόσος εκδηλώνεται τις περισσότερες φορές με τη μορφή επιδημίας και μεταδίδεται κυρίως μέσω τροφίμων ή νερού (*Emmerson & Purcell 2003; Wibawa et al., 2004; Aggarwal 2011*).

Χώρες που είναι αναπτυγμένες κυρίως βιομηχανικά, όπως ο Καναδάς, η Ιαπωνία και οι Η.Π.Α., είχε επικρατήσει η άποψη εξαίρεσής τους από τον HEV, επειδή είχαν ελάχιστα περιστατικά μολύνσεων και αυτά προέκυπταν από τουρίστες ενδημικών χωρών στην ηπατίτιδα Ε. Τα τελευταία χρόνια όμως, έρευνες έδειξαν ότι έχουν καταγραφεί περιστατικά μόλυνσης σ' αυτές τις χώρες, όπως στις Η.Π.Α., τα οποία δεν είχαν στο ιστορικό τους ταξίδια σε ενδημικές για ηπατίτιδα Ε χώρες (*Aggarwal & Jameel, 2011*).

Στις αρχές της δεκαετίας του 1990 υπήρχαν πολλές ορολογικές ενδείξεις για λοιμώξεις από HEV. Πολλές φορές ανιχνεύτηκε ο ιός σε είδη ζώων όπως σε πιθήκους, χοίρους, βοοειδή, πρόβατα, πουλερικά, σκύλους, γάτες, κουνέλια, νυχτερίδες και τρωκτικά. Αυτό συνέβη σε αναπτυγμένες και αναπτυσσόμενες χώρες, γεγονός που υποδηλώνει ότι πολλά είδη μπορούν να μολυνθούν από τον HAV (*Huang et al., 2002; Emerson & Purcel, 2003*).

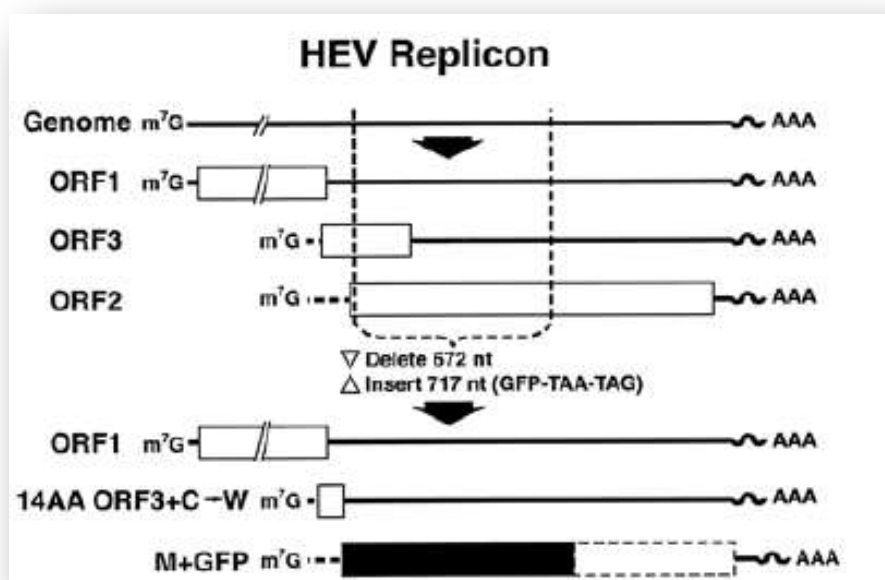
Σε ορισμένα ζώα όμως όπως στις αίγες και τις γάτες, δεν εντοπίστηκε ο ιός και είναι πολύ δύσκολη η κατανόηση της οροθετικότητας. Για πρώτη φορά εντοπίστηκε το 1997 στις Η.Π.Α. ένα στέλεχος HEV σε χοίρου, και ονομάστηκε ιός ηπατίτιδας Ε χοίρων (swine HEV). Ο ιός της ηπατίτιδας των χοίρων, σχετίζεται με ορισμένα ανθρώπινα στελέχη, που απομονώθηκαν σε ασθενείς στις Η.Π.Α.. Οι άνθρωποι που είχαν προσβληθεί, δεν είχαν ταξιδέψει σε ενδημικές χώρες (*Meng et al., 1997*). Στελέχη HEV των χοίρων, έχουν απομονωθεί σε όλο τον κόσμο. Αυτό συνετέλεσε στην αυστηρή γενετική συσχέτιση και απόδειξη, ότι μπορεί να γίνει μετάδοση ανθρώπινων στελεχών HEV σε χοίρους, και στελέχη HEV χοίρων μπορούν να προσβάλλουν τον άνθρωπο (*Meng et al., 1998; Williams et al., 2001; Matsuura et al. 2007*).

Αρκετές επιδημιολογικές μελέτες έχουν αναφερθεί στον υψηλό αριθμό αντισωμάτων, σε άτομα που απασχολούνται και έρχονται σε άμεση επαφή με χοίρους και αγριόχοιρους (*Drobeniuc et al. 2001, Withers et al. 2002, Carpentier et al., 2012*). Οι πρώτες και πολύ σοβαρές ενδείξεις για μετάδοση ζωνοσογόνων HEV ήρθαν από

τη Ιαπωνία, όταν μετά από κατανάλωση ωμού κρέατος ή οργάνων ελαφιού, χοίρου και αγριόχοιρου, εκδηλώθηκε η νόσος (Tei *et al.*, 2003; Tamada *et al.*, 2003; Yazaki *et al.*, 2003). Επιπλέον, σε μία πρόσφατη επιδημιολογική μελέτη που διενεργήθηκε στη Γαλλία, με τη βοήθεια ιολογικών και επιδημιολογικών δεδομένων, επιβεβαιώθηκαν 13 ανθρώπινες περιπτώσεις ηπατίτιδας E μετά από κατανάλωση αλλαντικού παρασκευαζόμενου από συκώτι χοίρου (Colson *et al.*, 2010). Η ηπατίτιδα E έχει αναγνωριστεί πλέον ως μία πάρα πολύ σοβαρή αναδυόμενη ζωνόσος.

### 2.Γ.1. Δομή και οργάνωση γονιδιώματος – ταξινόμηση ιού

Ο ιός της ηπατίτιδας E είναι ένας ιός, μικρός, χωρίς περίβλημα, θετικού μονόκλωνου RNA. Το μέγεθος του γονιδιώματος είναι περίπου 7,2 kb (Tam AW και συν., 1991). Έχει οριστεί ως το μοναδικό μέλος των ηπατοϊών της οικογένειας *Heperviridae*. (Emerson & Purcel, 2003). Το γονιδίωμα περιλαμβάνει τρία ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs). Η ORF1 κωδικοποιεί τη μη δομική πολυπρωτεΐνη NSP, η ORF2 κωδικοποιεί την ιϊκή πρωτεΐνη του καψιδίου, και η ORF3 κωδικοποιεί μια μικρή φωσφοπρωτεΐνη με ρυθμιστικό παράγοντα ( Chandra V. *et al.*, 2008).



Εικόνα 4. HEV αντιγραφή (Hutin *et al.*, 1999)

Το συγκεκριμένο διάγραμμα παρουσιάζει πως ο HEV αντιγράφεται. Ο αντιγραφέας του HEV εκφράζει το GFP. Το τερματικό 5' του κάθε υπογονιδιωματικού RNA είναι ακόμα άγνωστο. Το ORF1 παραμένει άθικτο, το mRNA του ORF3 κωδικοποιεί τα πρώτα 14 αμινοξέα του ORF3, το οποίο ακολουθείται από τρυπτοφάνη και ένα κωδικό τερματικού. Το mRNA του ORF2 κωδικοποιεί το GFP, το οποίο ακολουθείται από 2 τερματικούς κωδικούς (Hutin et al., 1999).

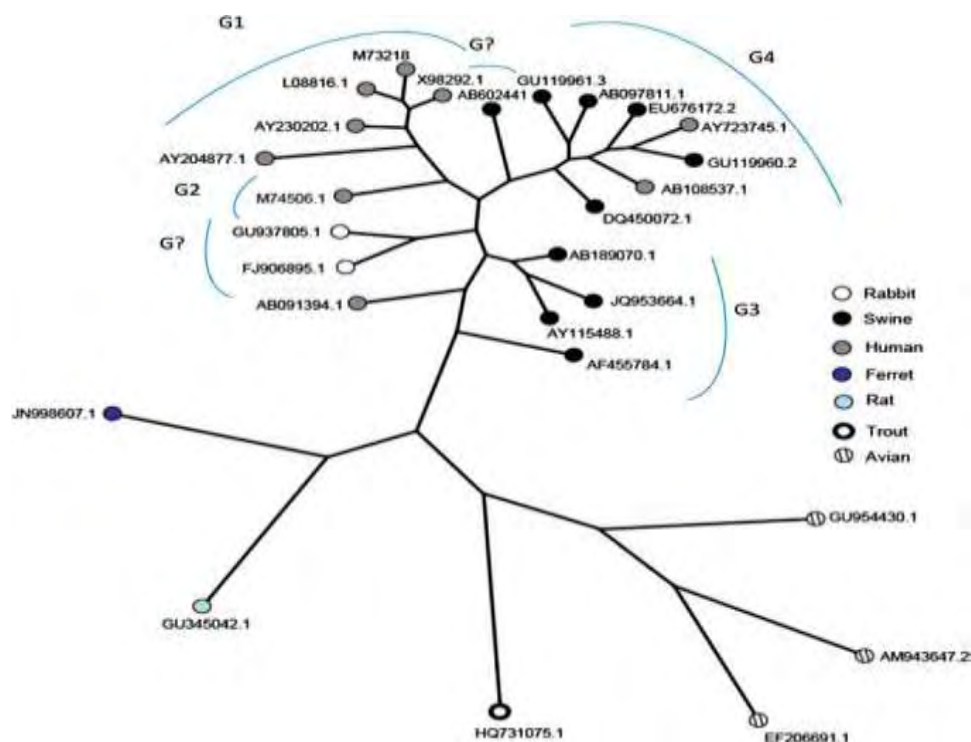
Τα κύτταρα του HEV θεωρούνται ως κύτταρα στόχος, στα οποία ο ιός αναπαράγεται στο κυτταρόπλασμα. Επειδή όμως δεν υπάρχει ένα αποτελεσματικό και αξιόπιστο σύστημα καλλιέργειας, είναι ασαφής ο τρόπος- μηχανισμός που εισέρχεται ο ιός στα κύτταρα, καθώς επίσης και πώς απελευθερώνεται στη συνέχεια απ' αυτά. Στους ανθρώπους που έχουν προσβληθεί με HEV, η κατάστασή τους αρχικά είναι ασυμπτωματική. Εφόσον περάσει όμως η περίοδος επώασης των 4-5 εβδομάδων, τότε εκδηλώνεται ως οξεία ιογενής λοίμωξη. Τα συμπτώματα μπορεί να είναι ίκτερος, πυρετός, ανορεξία, ναυτία και κοιλιακό άλγος (Aggarwal et al. 2000). Τα ποσοστά θνησιμότητας της νόσου είναι πολύ χαμηλά (κάτω από 0,5%). Ωστόσο στις έγκυες μπορεί να ανέλθει ακόμη και στο 25%, ιδιαίτερα αν έχουν προσβληθεί απ' το γονότυπο I (Kumar A. et al. 2004).

Οι γονότυποι του HEV μπορούν να χωριστούν σε τουλάχιστον 4 βασικές κατηγορίες οι οποίες μολύνουν κυρίως τους ανθρώπους, και έως 6 κατηγορίες γονοτύπων που αποκλίνουν απ' αυτούς των ανθρώπων, και έχουν ανιχνευτεί στους αγριόχοιρους (Panda SK. 2007). Στους γονοτύπους του γονιδιώματος απ' το 1-4 έχει προταθεί να υπάρξουν επιπλέον υποδιαίρεσεις, είτε με βάση την ολική (ή μερική) αλληλουχία του γονιδιώματος, είτε με βάση την αλληλουχία που προέρχεται από διαφορετικά ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs) του γονιδιώματος του ιού (Smith DB et al., 2013 ).

Όλο και περισσότερες αλληλουχίες και σειρές HEV εντοπίζονται και αναφέρονται σε μεγάλο ποσοστό ζώων, γεγονός που καθιστά σοβαρό το ενδεχόμενο της περαιτέρω υποδιαίρεσης όσον αφορά την ταξινόμηση και το γένος (Smith DB et al. 2013; Oliveira-Filho EF et al., 2013). Οι γονότυποι 1 και 2, φαίνεται να έχουν περισσότερα κοινά απ' τους 3 και 4. Οι 1 και 2 προσβάλλουν κυρίως τους ανθρώπους. Ο γονότυπος 1 έχει απομονωθεί από σποραδικά κρούσματα στην Ασία



και την Αφρική, και ο 2 σε Μεξικό και Αφρική. Στο σχήμα 2 απεικονίζονται οι γονότυποι του HEV με βάση την αλληλουχία πλήρους μήκους στελεχών του HEV ανθρώπινης και ζωικής προέλευσης.



**Εικόνα 5.** Φυλογενετικό δέντρο απεικόνισης διαφορετικών γονότυπων του HEV (Meng, 2011).

Οι βιομηχανικές χώρες, μέχρι πριν λίγα χρόνια θεωρούνταν μη ενδημικές για την ηπατίτιδα Ε. Αυτό όμως έχει αρχίσει να αλλάζει μετά την εκδήλωση κρουσμάτων με HEV ενοχοποιώντας τα στελέχη 3 και 4 (Emerson & Purcel, 2003; Okamoto 2007; Kamar et al. 2012; Scobie & Dalton 2013). Οι γονότυποι 3 και 4, είναι κυρίως ζωνοσογόνοι και παρατηρούνται σε διάφορα είδη ζώων και σπάνια εμφανίζονται κρούσματα σε ανθρώπους. Ο γονότυπος 3 εντοπίστηκε για πρώτη φορά σε δύο άτομα στις Η.Π.Α. όταν δύο ανθρώπινα στελέχη τα US-1 και US-2 έδειξαν να ταυτίζονται κατά 74 με 75% με τα νουκλεοτίδια των γονότυπων 1 και 2. Αυτό οδήγησε στον χωριστό χαρακτηρισμό του γονότυπου 3. Από τότε απαντάται παγκοσμίως ενώ ο 4 κυρίως σε χώρες της Ασίας. Οι γονότυποι 5 και 6 έχουν ανιχνευτεί μόνο σε αγριόχοιρους της Ιαπωνίας (Meng et al. 1997).

Οι τέσσερις γονότυποι, υποδιαιρούνται περαιτέρω σε υποτύπους. Στελέχη που ανήκουν στον γονότυπο 1 μπορούν να ταξινομηθούν σε 5 υπότυπους (1a-1e). Στελέχη του 2, χωρίζονται σε 2 (2a-2b). Οι γονότυποι 3 και 4 παρουσιάζουν μεγάλη

ποικιλομορφία και χωρίζονται σε 10 (3a-3j) και 7 υπότυπους (4a-4g) αντίστοιχα. Έτσι οι υπότυποι του HEV είναι τουλάχιστον 24 και βρίσκονται στη φύση ( *Lu et al., 2006*).

### **2.Γ.2 Επιδημιολογικά στοιχεία**

Η μόλυνση από τον ιό της ηπατίτιδας E συνήθως εμφανίζεται στις αναπτυσσόμενες και τροπικές χώρες, όπως το μεγαλύτερο μέρος της Ασίας, της Βόρειας Αφρικής , της Μέσης Ανατολής και της Κεντρικής και Νότιας Αμερικής ( *Emerson & Purcell, 2003; Panda et al. 2007*). Στις περισσότερες αναπτυγμένες χώρες, θεωρούνταν ως μια ασθένεια η οποία συνδεόταν με ταξίδια σε ενδημικές χώρες. Αυτή η άποψη την τελευταία δεκαετία άρχισε να αναθεωρείται, όταν παρουσιάζονταν κρούσματα, τα οποία δεν είχαν ταξίδι στο ιστορικό τους. Αυτό το γεγονός υποδηλώνει την αφθονία σε στελέχη HEV.

Σε χώρες όπου ο HEV ενδημεί, στα στελέχη του γονότυπου 1 και 2, οφείλονται τα περισσότερα περιστατικά σε ανθρώπους. Η μόλυνση γίνεται από άνθρωπο σε άνθρωπο από την κοπρανοστοματική οδό. Η κατανάλωση μολυσμένου νερού, προκαλεί ιδιαίτερα ξεσπάσματα. Για τους γονότυπους 1 και 2 δεν υπάρχει καμία δεξαμενή του ιού σε ζώο, εκτός από ένα υπότυπο στελέχους, που βρέθηκε σε ίππους (*Saad et al., 2007*).

Σε περιοχές που συναντώνται περιπτώσεις με κρούσματα HEV, σε περιοχές βιομηχανοποιημένες, συνδέονται κυρίως με τους γονότυπους 3 και 4. Από αυτούς τους δύο γονότυπους, η κατανομή του γονότυπου 3 είναι πιο συχνή παγκοσμίως σε ευρωπαϊκές χώρες, αλλά και την Κίνα και την Ιαπωνία. Ο γονότυπος αυτός μολύνει κυρίως ζώα (χοίρους, ελάφια, αγριογούρουνα, τρωκτικά., μαγκούστες). Ο γονότυπος 4 επηρεάζει κυρίως τους ανθρώπους και τους χοίρους σε περιοχές της Ασίας, αλλά πρόσφατα συνδέθηκε με περιστατικά σε ανθρώπους και χοίρους στην Ευρώπη (*Hakze-van der Honing et al., 2011; Garbuglia et al., 2013*).

### **2.Γ.3. Μετάδοση ιού ηπατίτιδας E**

Ο τρόπος μετάδοσης του ιού δεν είναι ακόμη κατανοητός. Μπορεί να γίνει με κατάποση μολυσμένων τροφίμων ή νερού, από πρόσωπο σε πρόσωπο, με κάθετη μετάδοσή του από τη μητέρα στο βρέφος, αλλά δεν έχει τεκμηριωθεί επιστημονικά η μετάδοση μέσω της σεξουαλικής επαφής (*Kamar et al., 2012; Scobie & Dalton 2013*). Η μετάδοση από τα ζώα έχει εκτιμηθεί αν και είναι αβέβαιη διαδρομή

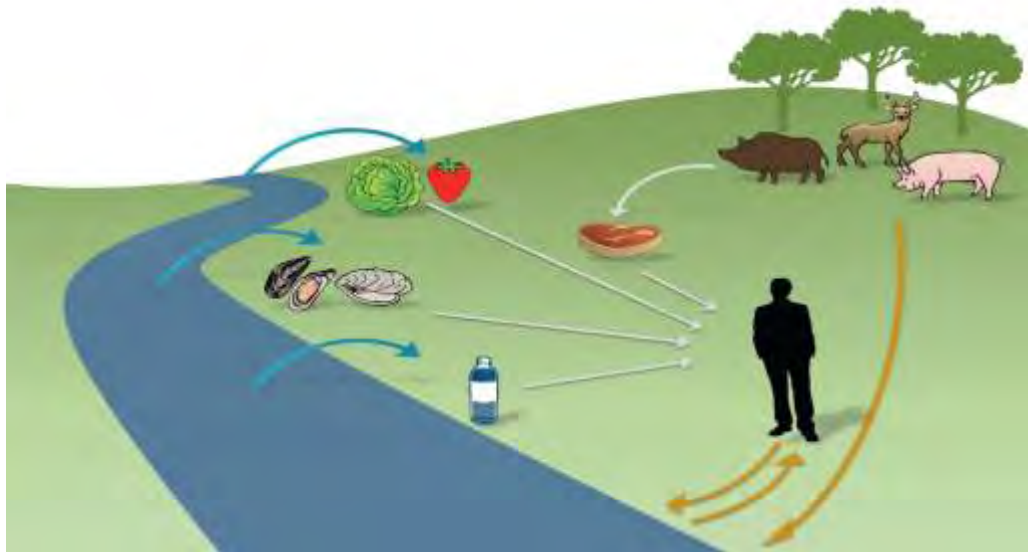
εξάπλωσης της νόσου. Ως παράγοντες κινδύνου μπορεί να θεωρηθούν η άμεση ή έμμεση επαφή με μολυσμένα υλικά ζώων που έχουν προσβληθεί, (κτηνίατροι, αγρότες, υπάλληλοι σφαγείων, ατόμων που φροντίζουν ζώα είναι σε κίνδυνο), είτε η κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων που έχουν (νερό, φυτά, προϊόντα κρέατος, οστρακοειδή), είτε παρεντερική μετάδοση (*Meng et al., 2003*).

#### **2.Γ.4. Τροφιμογενής μετάδοση HEV**

Πολλές φορές έχουν ανιχνευτεί στελέχη HEV σε ιστούς και όργανα χοίρων ελαφιών και αγριογούρουνων (*Bouwknegt et al. 2009*), καθώς επίσης και σε δίθυρα μαλάκια, όπως μύδια στρείδια και κυδώνια (*Namsai et al. 2011; Crossan et al. 2012*). Για πρώτη φορά τροφιμογενής μετάδοση του ιού της ηπατίτιδας Ε παρατηρήθηκε σε ασθενείς στην Ιαπωνία, οι οποίοι είχαν καταναλώσει ωμό ή ελλιπώς μαγειρεμένο κρέας από χοίρους, αγριόχοιρους ή ελάφι (*Tei et al., 2003; Takahashi et al. 2013*). Οι γονιδιωματικές αλληλουχίες που βρέθηκαν στους ασθενείς, προσδιορίστηκαν και ήταν ίδιες με αυτές που ανακτήθηκαν από το περίσσιο κρέας που είχε καταναλωθεί και είχε καταψυχθεί.

Με τη συμβολή της ανίχνευσης και των επιδημιολογικών μελετών, όλο και περισσότερο ενισχύεται η συσχέτιση μόλυνσης με τον ιό HEV μέσω τροφίμων. Οι περιπτώσεις ασθενών που έχουν συνδεθεί με κατανάλωση ειδών διατροφής, έχουν αυξηθεί. Η μόλυνση τις περισσότερες φορές προκύπτει από κατανάλωση τοπικών προϊόντων με βάση το κρέας (*Colson et al., 2010*) και των θηραμάτων, επεξεργασμένου χοιρινού (*Legrand-Abravanel et al., 2011*) μυδιών στρειδιών και άλλων οστρακοειδών (*Takahashi et al. 2013; Donia et al. 2012*). Τα δίθυρα μαλάκια άλλωστε είναι γνωστοί πομποί εντεροϊών και ιδιαίτερα τα στρείδια που καταναλώνονται ωμά.

Η κατανάλωση ωμών και ελλιπώς ψημένων προϊόντων κρέατος είναι ο υψηλότερος παράγοντας κινδύνου. Αυτό διαπιστώθηκε και σε επιδημιολογική μελέτη που διεξήχθη από τον Wichman και τους συνεργάτες του, στη Γερμανία (*Wichman O et al., 2008*). Η κατανάλωση των ασθενών με κρέας αγριόχοιρου, ήταν στατιστικά σημαντικά σχετιζόμενη με την μόλυνση με τον HEV. Πρόσφατα ανιχνεύτηκε ο ιός σε μαλακά φρούτα και λαχανικά. Σε αυτή την περίπτωση το νερό άρδευσης θεωρήθηκε η αιτία μόλυνσης των προϊόντων (*Brassard J. et al., 2012; Kokkinos et al., 2012* )



**Εικόνα 6.** Πιθανές οδοί μετάδοσης τροφιμογενούς και περιβαλλοντικής μόλυνσης HEV (Wim, 2014)

Άλλο ένα γεγονός που υπογραμμίζει ότι τα ατελώς μαγειρεμένα προϊόντα διατροφής που περιέχουν χοιρινό αποτελούν υψηλό κίνδυνο για τη μετάδοση HEV, είναι η βιωσιμότητα του ιού, σε παραδοσιακό λουκάνικο της Νότιας Γαλλίας που περιείχε καπνιστό χοιρινό, μετά από καλλιέργεια, χρησιμοποιώντας ένα σύστημα 3D κυττάρων (Berto *et al.* 2013).

### 2.Γ.5. Περιβαλλοντική μετάδοση HEV

Ο κύριος τρόπος μετάδοσης του HEV μέσω του περιβάλλοντος, γίνεται όταν εντερικά απεκκρίματα, καταλήγουν σ' αυτό. Ιδιαίτερα για τα στελέχη του ιού που προσβάλλουν τους ανθρώπους, δηλαδή του γονότυπου 1 και 2, σε περιοχές χωρίς καλής ποιότητας νερό και μολυσμένο από αποχετεύσεις, έχει ταυτοποιηθεί ως ο κύριος τρόπος μόλυνσης (Aggawal & Naik, 2009). Η υπόθεση ότι το νερό παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάδοση του ιού, πρέπει να μελετηθεί για να αποδειχτεί η βιωσιμότητα του HEV σε πόσιμο και επιφανειακά ύδατα, ιδιαίτερα στις αναπτυσσόμενες χώρες.

Ο HEV μπορεί να μολύνει επιφανειακά ύδατα και να εισχωρήσει στην τροφική αλυσίδα ιδιαίτερα σε περιοχές με οστρακοκαλλιέργειες. Έχουνε βρεθεί επίσης, πολλά κρούσματα χοίρων με HEV, ενώ στην ίδια γεωγραφική περιοχή με τους χοίρους, έχουνε ανιχνευτεί τα ίδια στελέχη που πρόσβαλλαν τα ζώα, σε επιφανειακά ύδατα και λύματα. Ο ιός του HEV μπορεί να εισχωρήσει στο σύστημα άρδευσης και στο πόσιμο νερό και να μολύνει φρούτα, λαχανικά ή οστρακοειδή, από τα φίλτρα στο κεντρικό σύστημα παροχέτευσης (*Brassard et al. 2012; Kokkinos et al. 2012*).

Σε πρόσφατες μελέτες που έχουν γίνει, έχουν ανιχνευτεί στελέχη του ιού της ηπατίτιδας E, σε στραγγίσματα χωραφιών, στα οποία είχε γίνει ρήψη κοπριάς από χοίρους. Το κατά πόσο το περιβάλλον μπορεί να επηρεάσει στην μετάδοση και μόλυνση με HEV, εξαρτάται από το βαθμό συγκέντρωσης του ιού, την σταθερότητα και τη μολυσματική δόση του ιού. Αυτό μπορεί να διαφέρει, ανάλογα με το είδος του γονότυπου.

#### **2.Γ.6. Ομάδες υψηλού κινδύνου και πρόληψη.**

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας οι ομάδες ατόμων που είναι ευαίσθητοι στην λοίμωξη από ηπατίτιδα E είναι οι εξής:

- Άνθρωποι που ταξιδεύουν σε χώρες που ενδημεί η νόσος.
- Άτομα που ζούνε σε περιοχές που έχουν παρουσιαστεί κρούσματα ηπατίτιδας E
- Άτομα που βιώνουν σε μέρη υψηλού συγχρωτισμού, όπως είναι τα υπερπλήρη καταστήματα κράτησης προσφύγων, στο Σουδάν, τη Σομαλία, την Αιθιοπία και την Κένυα.
- Άτομα που χειρίζονται ζωικά προϊόντα χοίρων, αγελάδων, προβάτων αιγών.

Επειδή η ηπατίτιδα E μεταδίδεται και εξαπλώνεται μέσω της κοπρανοστοματικής οδού, έχει συσταθεί στις αναπτυσσόμενες χώρες, η καλή προσωπική υγιεινή των πολιτών, η μέριμνα για καλής ποιότητας υψηλών προτύπων αποθέματα πόσιμου νερού και η σωστή διαχείριση των αποβλήτων.

Στους ταξιδιώτες προς ενδημικές χώρες συστήνεται να πίνουν εμφιαλωμένο νερό, να αποφεύγουν την κατανάλωση πάγου αμφιβόλου ποιότητας, καθώς επίσης τα φρούτα να καταναλώνονται χωρίς τη φλούδα και τα οστρακοειδή να μαγειρεύονται από τους ίδιους για να είναι βέβαιοι για το ορθό τους ψήσιμο. ([http://www.who.int/disease/ηπατίτιδα/HepatitisE\\_whocdscsredc2001\\_12.pdf](http://www.who.int/disease/ηπατίτιδα/HepatitisE_whocdscsredc2001_12.pdf)).

## **2.Γ.7. Διαγνωστικές μέθοδοι**

### **A. Μοριακή ανίχνευση**

Οι τεχνικές που βασίζονται στο νουκλεϊκό οξύ και ιδιαίτερα η RT-PCR και η εστιασμένη πραγματικού χρόνου αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (nested RT-PCR) έχουν αναδειχτεί ως οι πιο αξιόπιστες μέθοδοι στην ανίχνευση των RNA-ιών, λόγω της υψηλής ευαισθησίας. Πρόκειται για μεθόδους απαραίτητες στην έρευνα για το χαρακτηρισμό ορισμένων στελεχών HEV, τα οποία δεν έχουν ανταποκριθεί ορολογικά, δηλαδή δεν ανιχνεύονται μετά από άλλες ορολογικές δοκιμές. Οι μέθοδοι αυτές είναι ιδιαίτερα χρήσιμες σε περιοχές χαμηλής ενδημικότητας του ιού (*Hsieh et al. 1988; Schlaunder et al. 1999; Wang et al. 1999; Worm et al. 2000,2002*).

Η μέθοδος RT-PCR είναι μια μέθοδος συμβατική, για την ανίχνευση ικών στελεχών όχι μόνο στον ορό ή τα κόπρανα των ανθρώπων κατά τη διάρκεια οξείας λοίμωξης, αλλά και για κλινικά δείγματα χοίρου, ελαφιού, κοτόπουλου, καθώς επίσης και για δείγματα μολυσμένου νερού (*Pina et al. 2000; Grimm & Fout, 2002*). Η RT-PCR είναι μέθοδος που επηρεάζεται σε μόλυνση από τον ιό, με αποτέλεσμα να μην καθίσταται δυνατή η ποσοτικοποίησή του. Η μέθοδος της RT-PCR έχει αναπτυχθεί αρκετά ώστε να είναι ικανή στην ανίχνευση του HEV (*Ahn et al., 2006; Enfu et al. 2006; Jothikumar et al. 2006*). Η μέθοδος που θα χρησιμοποιηθεί, είναι πολύ σημαντική για την επιτυχή ανίχνευση του ικού γενώματος.

### **B. Ανοσολογική διάγνωση**

Η ενζυμική ανοσοδοκιμασία, είναι μέθοδος ανίχνευσης αντισωμάτων anti-HEV. Είναι μεγίστης σημασίας λόγω της ευαισθησίας αλλά και της οικονομικής της

υπόστασης. Έχουνε βρεθεί πολλές αντιγονικές περιοχές σε όλες τις ORF πρωτεΐνες του HEV όπως (*Khudyakov et al.1999*):

- i. 12 αντιγονικές περιοχές στην ORF1
- ii. 6 αντιγονικές περιοχές της πρωτεΐνης ORF2
- iii. 3 αντιγονικές περιοχές της πρωτεΐνης ORF3.

Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που προέρχονται από τα άκρα της ORF2 και ORF3, ή από μεγαλύτερα τμήματα της ORF2 που συμπληρώνουν την ORF3, χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση IgG και IgM anti-HEV. Πολλές φορές, τα μεγάλα τμήματα της ORF2 βοηθούν σε μεγαλύτερο βαθμό στην καλύτερη έκφραση μεγάλου φάσματος αντιγόνων και εν τέλει στην ανίχνευση αντισωμάτων (*Ghabrah et al. 1998*). Επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιγόνα, συνθετικά πεπτίδια. Ο τρόπος ανίχνευσης των αντισωμάτων, μπορεί όμως να μην είναι αξιόπιστος κατά το στάδιο της ανάρρωσης λόγω της χαμηλής ευαισθησίας.

Υπάρχουν τρεις εμπορικές δοκιμές (tests) για την ανίχνευση αντισωμάτων IgG και IgM. Όλες οι εμπορικές δοκιμές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη συνήθη διάγνωση. Ωστόσο επειδή η ευαισθησία και η ειδικότητα δεν έχουν καθοριστεί με ακρίβεια, η χρήση τους για οροεπιδημιολογικές μελέτες είναι περιορισμένες (*Worm et al. 2000, 2002*). Ο προσδιορισμός και η αξιολόγηση της ευαισθησίας, της ειδικότητας, της θετικής και αρνητικής προγνωστικής αξίας, κάνει δύσκολο τον ορολογικό έλεγχο, διότι δεν είναι σαφές, ποια είναι αληθώς θετικά. Ο συνδυασμός όλων των εμπορικών δοκιμών, δίνει πολύ ικανοποιητικές τιμές: ευαισθησία 100%, ειδικότητα 99,5%, θετική προγνωστική αξία 75%, αρνητική προγνωστική αξία 100%.

### ***Γ. Ανίχνευση με μικροσκόπηση ανοσοφθορισμού (Immune fluorescence microscopy IFE)***

Πολύ λίγα και καλά εξειδικευμένα εργαστήρια χρησιμοποιούν αυτή την τεχνική για την ανίχνευση αντισωμάτων. Η μέθοδος αυτή ανιχνεύει αντισώματα που αντιδρούν με τον HEV. Η συγκέντρωση των anti-HEV αντισωμάτων, εκτιμάται ημιποσοτικά. Η μέθοδος αυτή είναι δύσκολη και δαπανηρή και γι 'αυτό δεν χρησιμοποιείται για διάγνωση ρουτίνας (*Krawczynski & Bradley, 1989*).

#### **Δ. Απομόνωση ιού**

Η δημιουργία ενός συστήματος κυτταρικής καλλιέργειας που να επιτρέπει την *in vitro* καλλιέργεια του ιού HEV είναι ζωτικής σημασίας για τον ιολογικό χαρακτηρισμό την διάγνωση και πρόληψη του HEV. Έχουν αναφερθεί αρκετές *in vitro* καλλιέργειες από ανθρώπινο πνεύμονα, νεφρό ή ήπαρ, χωρίς ωστόσο να μπορούν να αναπαραχθούν αυθεντικά ιικά σωματίδια ή υψηλό τίτλο VLP's, και παρουσιάζουν χαμηλή αναπαραγωγικότητα. Προς το παρόν δεν υπάρχει κάποιο αξιόπιστο σύστημα καλλιέργειας για τον HEV (*Tam et al.1997; Wei et al. 2000*).

#### **Ε. Ανοσοηλεκτρονική μικροσκόπηση**

Με τη βοήθεια της ανοηλεκτρονικής μικροσκόπησης, ανιχνεύονται VLP's σε κλινικά δείγματα. Τα ιικά σωματίδια καθιζάνουν με τα αρχικά αντισώματα του HEV, που προέρχονται από τη φάση ανάρρωσης. Η συγκέντρωση των αντισωμάτων μπορεί να προσδιοριστεί ημιποσοτικά, αναλόγως τον βαθμό που καλύπτουν στο επίστρωμα. Η ανοσοηλεκτρονική μικροσκόπηση είναι μια τεχνική ανώτερη όσον αφορά την ευαισθησία και την ειδικότητα του προσδιορισμού, είναι όμως ανεπαρκής για αναλύσεις ρουτίνας. Είναι δύσκολη στο να εκτελεστεί, γιατί τα περισσότερα κλινικά δείγματα, δεν περιέχουν επαρκείς ποσότητες VEP ώστε να επιτευχθεί η ανίχνευση (*Yarborough, 1999*).

### **2.Δ. Εμπλεκόμενοι ιοί σε τροφιμογενείς λοιμώξεις**

Πολλοί ιοί έχουν τη δυνατότητα να εξαπλωθούν μέσω της τροφιμογενούς οδού, συμπεριλαμβανομένων και παραγόντων οι οποίοι δεν είναι ιδιαίτερα γνωστοί, αλλά συνδέονται με συγκεκριμένες πρακτικές παρασκευής τροφίμων που εφαρμόζονται σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές. Ένα παράδειγμα είναι ο ιός Ebola (συχνά θανατηφόρα αιμορραγική ιογενής ασθένεια) η οποία προσβάλλει ανθρώπους και μεταβιβάζεται κατά τη διάρκεια προετοιμασίας και κατανάλωσης αφρικανικών θηραμάτων (*Chastel & Charmot, 2004*).



Μία ακόμη θανατηφόρα τις περισσότερες φορές νόσος, είναι αυτή που προκαλείται από τον ιό Nipah. Είναι νόσος που προσβάλλει το αναπνευστικό σύστημα και πολύ συχνά μεταβάλλει την εγκεφαλική λειτουργία. Γι' αυτό έχει ενοχοποιηθεί η κατανάλωση χουρμάδων, οι οποίοι μολύνονται πιθανώς από τις νυχτερίδες, που τρέφονται με τους χυμούς τους κατά τη διάρκεια της νύχτας (*Luby et al. 2006*).

Όλο και συχνότερα επίσης εκδηλώνονται επιδημικές εκρήξεις από ροταϊό, με εκδήλωση οξείας γαστρεντερίτιδας. Τα κρούσματα είναι επιβεβαιωμένα όπως για παράδειγμα η επιδημία που καταγράφηκε από το CDC σε πανεπιστήμιο των Η.Π.Α. το 2000 καθώς επίσης και σε ένα Ιαπωνικό εστιατόριο. Όσον αφορά τους Σαποϊούς (*Sapoviruses*), της οικογένειας των *Caliciviruses*, στην οποία ανήκουν οι Νοροϊοί, σπάνια έχουν εμπλακεί σε τροφιμογενείς επιδημίες (*Gaulin et al. 1999; Blanton et al. 2006*).

Μία πιθανή εξήγηση της μειωμένης μετάδοσης τροφιμογενών εκρήξεων από ιούς που προκαλούν οξεία γαστρεντερίτιδα, είναι το γεγονός ότι προσβάλλει κυρίως παιδιά. Δεδομένου ότι τα παιδιά δεν ασχολούνται με την προετοιμασία φαγητού για άλλους, και είναι λιγότερο πιθανό να καταναλώσουν τρόφιμα που ενδεχομένως έχουν μολυνθεί στο περιβάλλον, οι ευκαιρίες τροφικής μετάδοσης είναι περιορισμένες. Αυτό όμως δεν υφίσταται και για τους Νοροϊούς, διότι ποικίλουν αντιγονικά και παρέχουν βραχυπρόθεσμη ανοσία. Έχουν μεγάλη δυνατότητα μετάδοσης γιατί είναι κοινά παθογόνα τόσο για τους ενήλικες όσο και για τα παιδιά.

## 2.E. ΝΕΟΕΜΦΑΝΙΖΟΜΕΝΟΙ ΙΟΙ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΡΟΦΙΜΑ

Πολλοί είναι οι νεοεμφανιζόμενοι ιοί. Η πιθανότητα να σχετίζονται με τρόφιμα δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλη, αλλά ασκούν εν δυνάμει μεγάλη επιρροή. Ορισμένα παραδείγματα, είναι του ιού *SARS* και της γρίπης των πτηνών, καθώς επίσης και η ανεξέλεγκτη τροφιμογενής μετάδοση λιγότερο επικίνδυνων ιών όπως οι Νοροϊοί. Πρέπει να είμαστε προετοιμασμένοι λοιπόν να αντιμετωπίσουμε μία πιθανή λοίμωξη, η οποία θα προέρχεται από ένα νέο παθογόνο που θα μεταδίδεται μέσω τροφίμων.

Ο ιός *SARS* της οικογένειας των *Coronaviruses*, μπορεί να μεταδοθεί στον ανθρώπινο οργανισμό με τρόφιμα κυρίως ζωϊκής προέλευσης, τα οποία μολύνθηκαν

πρωτίστως από την κύρια δεξαμενή του ιού που είναι πιθανώς οι νυχτερίδες (*Lau et al. 2004b*). Όσον αφορά τον ιό της γρίπης, H5N1, έχει επιτευχθεί η καλλιέργειά του από το κρέας της πάπιας, και έτσι η κατανάλωση αίματος πάπιας, μπορεί να μεταδώσει τη λοίμωξη στον άνθρωπο (*Tumpey et al., 2003*). Σύμφωνα με τον πίνακα BIOHAZ που εξέδωσε η Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων (*EFSA*), επανεξέτασε θέματα ασφάλειας όσον αφορά τον ιό της γρίπης των πτηνών αλλά και του καινούριου ιού pH1N1, και θεωρεί πλέον απίθανη την μετάδοσή τους μέσω τροφίμων, χωρίς όμως να αποκλείει εντελώς το ενδεχόμενο. Ο ιός SARS, καθώς και άλλοι παρόμοιοι με αυτόν ιοί, έχουν εντοπιστεί σε νυχτερίδες. Αυτό όμως δεν αποτελεί προς το παρόν κίνδυνο μετάδοσης με τα τρόφιμα. Το ίδιο συμβαίνει και με τον ιό H5N1, ο οποίος μολύνει σπάνια τους ανθρώπους και συνδέεται συχνά με άμεση επαφή με άρρωστα πουλερικά.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO), δείχνει την ανησυχία του για ένα καινούριο παθογόνο, τον ιό *Nipah*. Έχει παρατηρηθεί ότι άνθρωποι μολύνθηκαν μετά την κατανάλωση φρούτων που έφεραν τον ιό από τις νυχτερίδες που τρέφονταν μ' αυτά (*Luby et al., 2006*). Η ανησυχία είναι μεγάλη διότι, αυτοί οι ιοί, σχετίζονται με γνωστούς ιούς που προσβάλλουν τον άνθρωπο, αλλά είναι πιο μεταδοτικοί και προέρχονται από τον πληθυσμό των ζώων.

Οι φλαβοϊοί (*Flavivirus*), είναι ιοί που μεταδίδονται με τα αρθρόποδα. Έχουν όμως αναφερθεί περιστατικά ζωνοσογόνου τροφικής μετάδοσης. Ο ιός της εγκεφαλίτιδας (*TBEV*), μεταδίδεται κυρίως από τους φυσικούς του ξενιστές, που είναι τα κυρίως τα τσιμπούρια των τρωκτικών. Μ' αυτό τον τρόπο μέσω των αρθροπόδων μπορεί να προσβληθεί ο άνθρωπος. Ένας άλλος τρόπος είναι να προσβάλλει άλλα ζώα όπως αίγες, αγελάδες, και μέσω του παραγόμενου μολυσμένου νωπού γάλακτος να προκαλέσει στον άνθρωπο ασθένεια γνωστή ως «διφασικός πυρετός γάλακτος». Επιπλέον ο ιός *TBEV* έχει βρεθεί σε γιαούρτι βούτυρο και τυρί, αφού η ανθεκτικότητά του είναι μεγάλη, καθώς μπορεί να επιβιώσει σε γαστρικά υγρά για δύο ώρες. Το γεγονός βέβαια ότι είναι ανθεκτικός στο όξινο περιβάλλον δε σημαίνει ότι δεν αδρανοποιείται εύκολα. Το χαρακτηριστικό λιπιδικό του περίβλημα, τον κάνει ιδιαίτερα ευαίσθητο στις υψηλές θερμοκρασίες και τους οργανικούς διαλύτες. Έτσι, είναι σχεδόν απίθανο να συμβεί τροφική μετάδοση όταν έχει προηγηθεί θερμική επεξεργασία με υψηλές θερμοκρασίες στο τρόφιμο.

Ο *TBEV* μπορεί να προκαλέσει ποικίλα συμπτώματα κατά τη χρονική περίοδο της επώασης μεταξύ 7<sup>ης</sup> και 14<sup>ης</sup> μέρας, όπως πονοκέφαλος, πόνος σε λαιμό,

πλάτη και ώμους. Η εξέλιξη των συμπτωμάτων αυτών μπορεί να οδηγήσει σε εγκεφαλίτιδα. Το ποσοστό θνησιμότητας είναι 0,5 - 1,55% το οποίο βέβαια ποικίλει ανάλογα την γεωγραφική περιοχή και το στέλεχος του ιού.

Οι παραπάνω αναδυόμενες λοιμώξεις μεταδιδόμενες από τρόφιμα είναι σπάνιες. Ωστόσο προκαλεί ανησυχία το γεγονός ότι ανιχνεύτηκαν σε ασυμπτωματικούς χοίρους στις Φιλιππίνες. Λόγω των κοινωνικών οικονομικών και δημογραφικών αλλαγών, θα πρέπει να δημιουργηθεί ένας μηχανισμός, που θα είναι σε εγρήγορση και ικανός να αντιμετωπίσει τις συνέπειες μιας καινούριας τροφικής μετάδοσης ιών οι οποίοι μπορεί να είναι νέοι ή παλαιότεροι αλλά εξελιγμένοι.

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.**

#### **3.Α. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΞΥΓΙΑΝΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Οι ιοί που μεταδίδονται μέσω τροφίμων, όπως ήδη έχει αναφερθεί, είναι αρκετά ανθεκτικοί στο περιβάλλον και τα τρόφιμα. Εν αντιθέσει με τα περισσότερα μικρόβια, οι ιοί αδυνατούν να αναπτυχθούν στα τρόφιμα με αποτέλεσμα να μην αποτελεί πρόβλημα η αύξηση στα τρόφιμα κατά τη διαδικασία της επεξεργασίας ή αποθήκευσης, αλλά το πρόβλημα εντοπίζεται στην υψηλή μολυσματικότητα που τους διακρίνει (*Carter 2005; Korpans & Duizer 2004*).

Κάποιες μέθοδοι εξυγίανσης των τροφίμων από τους ιούς παρατίθενται στη συνέχεια. Αρχικά, η επίδραση της οξίνισης στην αναστολή της μικροβιακής ανάπτυξης, οι μέθοδοι συντήρησης για μικροβιακή αναστολή και εξάλειψη των ιών που παρουσιάστηκαν. (θερμική επεξεργασία, ακτινοβολία, υψηλή υδροστατική πίεση). Τέλος η συμβολή της απολύμανσης και το κατά πόσο είναι αποτελεσματική στα φρέσκα προϊόντα καθώς επίσης τις διαδικασίες που εφαρμόζονται στα δίθυρα μαλάκια για τη μείωση του ιικού φορτίου.

### 3.A.ΝΟΡΟΪΟΙ

#### A. Οξίνιση

Μετά από επώαση δύο ειδών καλικοϊών (*Caliciviruses Feline και Canine*), σε χαμηλότερο από pH 2 για 30 λεπτά στους 37 °C, η απενεργοποίηση ήταν περισσότερο από 5 log (Duizer et al. 2004). Νοροϊός ποντικού, MNV-1 (*murine Norovirus*), όταν εκτέθηκε για 30 λεπτά σε pH 2 στους 37°C, παρατηρήθηκε λογαριθμική μείωση λιγότερο από 1. Παράλληλα ο FNV μειώθηκε κατά 4,4 log μετά από έκθεση στις ίδιες ακριβώς συνθήκες. Ίικά σωματίδια έχουν βρεθεί, ακόμα και μετά από διήθημα Νοροϊών, το οποίο υποβλήθηκε σε pH 2,7 για τρεις ώρες (Cannon et al.2006).

#### B. Θερμική επεξεργασία

Οι Duizer και συνεργάτες (2004), μετά από θερμική επεξεργασία, σε βαθμούς που κυμαίνονταν από 37 ° C έως 100 ° C, παρατήρησαν παρόμοια αδρανοποίηση για τους FCV και CaCV ενώ περίπου η ίδια αδρανοποίηση παρατηρήθηκε ανάμεσα στους FCVκαι MNV-1, στις θερμοκρασίες των 63°C και 72°C. Οι MNV-1 έδειξαν μείωση 2,81 log μετά από έκθεση σε 75°C για 0, 25 λεπτά, σε 10 γραμμάρια προθερμασμένου πουρέ βατόμουρου (Baert et al. 2008 b). Οι Slomka και Appleton, (1998), ερεύνησαν την αδρανοποίηση του FNV με εμπάπτιση κυδωνιών σε βραστό νερό για 0,5 λεπτά, και διαπίστωσαν λογαριθμική μείωση του ιού 1,7.

#### Γ. Υψηλή πίεση HPP (High Pressure Processing)

Ο FCV μειώθηκε κατά 4 έως 5 log όταν υποβλήθηκε σε επεξεργασία σε πίεση 200 MPa (4 min) σε χαμηλές θερμοκρασίες (-10 ° C), ωστόσο η ίδια επεξεργασία σε 20 ° C μείωσε τον τίτλο του ιού με 0.3 log (Chen et al., 2005). Οι Kingsley et al., (2007) βρήκαν μόνο 1,15 log μείωση όταν ο MNV-1 υποβλήθηκε σε επεξεργασία με μία δόση των 350 MPa (5 min), ενώ παρατηρήθηκε στους 5 ° C μείωση 5,56 log.

#### *Δ. Ακτινοβολία*

Η μέθοδος της UV ακτινοβολίας με δόση 40 mWs/cm<sup>2</sup> (micro-Watt-Second/cm<sup>2</sup>) σε ποσότητα μαρουλιού, κατάφερε να μειώσει κατά 3,5 log τον FNV (*Fino και Kniel, 2008*). Σε δεκαπλάσια αραιωμένη καλλιέργεια κυττάρων FCV και CaCV εφαρμόστηκε ακτινοβολία UV σε μία δόση, 12 και 20 mW s / cm<sup>2</sup> αντίστοιχα και παρατηρήθηκε μείωση κατά 3 λογαρίθμους. Επιπλέον μετά από εφαρμογή της ακτινοβολίας Gamma, με δόση 200 Gy, στους CaCV και FCV, παρατηρήθηκε μείωση σε 2,4 και 1,6 λογαρίθμους αντίστοιχα (*de Roda et al. 2004*).

#### *Ε. Αποτελεσματικότητα μεθόδων απολύμανσης σε φρέσκα προϊόντα*

Ο τύπος των προϊόντων, καθορίζει τον βαθμό απομάκρυνσης των ιών απ' αυτά. Μόνο κατά 1 με 2 log μπορεί να απομακρυνθεί το μικροβιακό φορτίο μετά από πλύσιμο με νερό, το οποίο ισχύει και για τους ιούς. Μετά από προσθήκη 200 ppm χλωρίου σε μαρούλι, παρατηρήθηκε μείωση μόνο κατά 1 log του MNV-1, σε σχέση με το απλό πλύσιμο με τρεχούμενο νερό (*Baert et al. 2009*). Η ίδια ποσότητα χλωρίου εφαρμόστηκε σε φράουλες και μαρούλι για το FCV, χωρίς όμως αποτέλεσμα, καθώς κρίθηκε αποδοτικότερο το τρεχούμενο νερό (*Gulati et al. 2001*).

Υψηλά επίπεδα χλωρίου μπορούν να επιτύχουν μόνο 2-3 log μείωση του ιικού φορτίου στα φρέσκα προϊόντα. Έρευνες που έγιναν, απέδειξαν, ότι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, καθώς και παρατεταμένη παραμονή του χλωρίου στα προϊόντα πάνω από 10 λεπτά, δεν αυξάνουν την αποτελεσματικότητα μείωσης του ιικού φορτίου (*Gulati et al. 2001; Duizer et al. 200;*).

Μικρή όμως ήταν και η μείωση που παρατηρήθηκε, μετά την εφαρμογή υπεροξυακετικού οξέος (PPE) σε συγκέντρωση 150 mg, σε φράουλες και μαρούλι. Η μείωση ήταν της τάξης του 1 με 2 log σε σύγκριση με το νερό. Το ηλεκτρολυμένο οξειδωτικό νερό (EOW), είναι μία νέα τεχνολογία απολύμανσης, η οποία χρησιμοποιείται στην Ιαπωνία. Είναι οικονομική, αποτελεσματική και φιλική προς το περιβάλλον, αν και τα δεδομένα για αδρανοποίηση των ιών χρησιμοποιώντας ηλεκτρολυμένο νερό στην παραγωγή τροφίμων είναι ασαφή (*Huang, 2008*).

### 3.B. HAV

#### A. Οξίνιση

Ο ιός διαπιστώθηκε ότι παραμένει μετά από 5 ώρες έκθεσης σε pH1 σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ η μολυσματικότητά του είναι αμείωτη ακόμα και μετά από 90 λεπτά σε pH 1 στους 38 °C ( *Scholz et al., 1989*).

#### B. Θερμική επεξεργασία

Για τη μείωση των ιών στα τρόφιμα, μια αρκετά αποτελεσματική μέθοδος είναι η θερμική επεξεργασία. Αυτό είναι δύσκολο να εφαρμοστεί σε προϊόντα όπως τα οστρακοειδή, διότι αλλοιώνεται η γεύση και η σύστασή τους. Μια θερμική επεξεργασία της τάξης των 85-90 °C, για 90 δευτερόλεπτα, μπορεί να καταστρέψει τους ιούς, στα μαλάκια, αλλά θα πρέπει ο χειρισμός της επεξεργασίας να γίνει πολύ προσεκτικά, έτσι ώστε να μη σκληρύνει η σάρκα τους. Οι Hewit και Greening (2006), έδειξαν τη διαφορά ανάμεσα στη θερμική επεξεργασία με ατμό και με βρασμό, σε δείγμα πράσινων στρειδιών στη Νέα Ζηλανδία. Παρατηρήθηκε ότι ο βρασμός για 3 λεπτά κρίθηκε πιο αποτελεσματικός στην αδρανοποίηση του HAV έναντι του ατμού, για το ίδιο χρονικό διάστημα έκθεσης. Μύδια από το Περού έχουν ενοχοποιηθεί για ηπατίτιδα Α.

Οι Bidawid και συν. (2000c), μελέτησαν την αδρανοποίηση του HAV σε τρία προϊόντα: αποβουτυρωμένο γάλα 0% λιπαρών, ομογενοποιημένο γάλα 3,5% λιπαρών και κρέμα γάλακτος 18% λιπαρών. Εκτέθηκαν όλα τα τρόφιμα στους 71 °C, για 16, 18 και 52 δευτερόλεπτα αντίστοιχα με αποτέλεσμα τη μείωση του ιού κατά 1 log. Η μείωση που απαιτείται είναι 4 log. και επιτυγχάνεται με έκθεση στους εξής χρόνους: 6,55 λεπτά για το αποβουτυρωμένο, 8,31 για το ομογενοποιημένο και 12,67 για την κρέμα γάλακτος. Η υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος, πιθανώς προστατεύει την αδρανοποίηση του ιού.

#### Γ. HPP (High Pressure Processing)

Οι Kingzley και συν. ( 2005), μελέτησαν την ανθεκτικότητα και επιμονή του HAV σε φέτες πράσινων κρεμμυδιών και σμέουρα. Μετά από έκθεση για 5 λεπτά σε πίεση 375 Mpa στους 21° C, η μείωση του ιικού φορτίου που παρατηρήθηκε για τον

πουρέ φράουλας και τις φέτες κρεμμυδιών ήταν 4,3 και 4,7 log. αντίστοιχα. Επίσης παρατηρήθηκαν δομικές και οργανοληπτικές μεταβολές. Μπορούν όμως τα προϊόντα αυτά να διατίθενται στους καταναλωτές ως ενισχυτικά γεύσης ή κύρια συστατικά για κρέμες, χυμούς. HPP εφαρμόστηκε και σε στρείδια για μείωση του φορτίου του HAV, το οποίο επιτεύχθηκε κατά 3 log. Με πίεση 400 MPa για ένα λεπτό σε θερμοκρασία 9° C (Calci et al. 2005).

#### *Δ. Ακτινοβολία*

Σε ακτινοβολία UV και δόση 240 mWs/cm<sup>2</sup> εκτέθηκε δείγμα μαρουλιού και η μείωση του HAV ήταν 4,3log (Fino και Kniel, 2008). Επιπλέον 3 kGy ακτινοβολίας Gamma είναι απαραίτητα για μείωση κατά 1 log. του HAV σε μαρούλι και φράουλες, και 2kGy είναι αναγκαία για μείωση κατά 1 log του HAV σε μύδια και στρείδια.

#### *Ε. Αποτελεσματικότητα μεθόδων απολύμανσης σε φρέσκα προϊόντα*

Ο Casteel και συν. (2008), μετά από απολύμανση με χλώριο 20 ppm, σε φράουλες ντομάτες και μαρούλι, διαπίστωσαν μείωση του HAV 1,7log. η αποτελεσματικότητα της χλωρίωσης δεν είναι βέβαιη, διότι τα τελευταία χρόνια γίνεται απλή πλύση με νερό.

### **3.Γ. HEV**

Όπως αναφέρουν οι Emerson και συν (2005), χρησιμοποιώντας κύτταρα του γονότυπου 1 του HEV, μετά από θερμική επεξεργασία στους 56 ° C με 60° C για μία ώρα, η αδρανοποίηση του ιού ήταν σχεδόν πλήρης, σε αντίθεση με στελέχη του γονότυπου 2, που αδρανοποιήθηκε μόνο το 80%, μετά από μία ώρα στους 60° C. Οι έρευνες δείχνουν ότι ο HEV είναι σχετικά σταθερός στη θερμική επεξεργασία, και οι διαφορές μεταξύ των στελεχών, είναι αξιοσημείωτες. Ωστόσο, η θέρμανση στους 71° C για 10 λεπτά ή 95° C για ένα λεπτό, φαίνεται πως είναι η κατάλληλη για την αδρανοποίηση του HEV (Feagins et al., 2008).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### 4.A. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΙΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

Οι μέθοδοι ανίχνευσης των ιών που βρίσκονται στα τρόφιμα, είναι πολλές και ιδιαίτερα πολύπλοκες. Ένα τρόφιμο, μπορεί να έρθει σε επαφή με τον ιό ανά πάσα στιγμή. Από το στάδιο της συγκομιδής, αλλά και σε οποιοδήποτε στάδιο επεξεργασίας και ετοιμασίας του τροφίμου (*Mattison & Bidawid, 2009*). Οι ιοί μπορούν να μεταδοθούν σε οποιοδήποτε τρόφιμο, ωστόσο είναι περιορισμένος ο αριθμός των τροφίμων που συνδέονται με συγκεκριμένες επιδημικές εξάρσεις, γεγονός που οδήγησε στο αναπτυχθούν περαιτέρω οι μέθοδοι ανίχνευσης.

Πολύ σημαντικό βήμα και σχεδόν καθοριστικό στην ανίχνευση των ιών στα τρόφιμα, είναι η στρατηγική δειγματοληψίας: η επιλογή δηλαδή αντιπροσωπευτικών δειγμάτων (*Pinto και Bosch, 2008*). Το δεύτερο σημαντικό βήμα στη ανίχνευση των ιών, είναι η ευαισθησία της μεθόδου που θα επιλεγεί, καθώς το επίπεδο της μόλυνσης αναμένεται να είναι χαμηλό. Η επιφάνεια των τροφίμων πολύ συχνά φέρει ιικά σωματίδια. Σκοπός είναι λοιπόν να μην επηρεαστεί από διαφορετικούς παράγοντες που συνυπάρχουν ή από την ειδικότητα του ιού που επίσης μπορεί να επηρεάσει (*Le Guyader & Atmar, 2008*). Γνωρίζοντας λοιπόν κάποια σημαντικά στοιχεία, μπορούμε εύκολά να προβούμε σε επιτυχή ανάκτηση των ιών από τα τρόφιμα (*Mattison & Bidawid, 2009*).

### 4.B. ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΙΩΝ

Οι περισσότεροι ιοί που μεταδίδονται μέσω τροφίμων, δε μπορούν να καλλιεργηθούν αποτελεσματικά *in vitro* (*Straub et al. 2007*). Η κλωνοποίηση του γονιδιώματος των τροφιμογενών ιών, οδήγησε στην ανάπτυξη μοριακών μεθόδων ανίχνευσης, εκτός από τη μέθοδο της ανοσοενζυμικής δοκιμασίας (EIA) ή της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Η γενική στρατηγική της ανίχνευσης των ιών που βρίσκονται στα τρόφιμα, αποτελείται από τρία στάδια: 1. την εκχύλιση του ιού, 2. τον καθαρισμό του ιικού RNA, 3. την μοριακή ανίχνευση του καθαρού RNA.

Κατά τη διάρκεια του πρώτου σταδίου, τα ιικά σωματίδια διαχωρίζονται από τη μάζα του τροφίμου, συμπυκνώνονται σε μικρότερο όγκο, και απομακρύνεται κάθε



ανασταλτικός παράγοντας. Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να είναι μόρια πολυσακχαριτών, πρωτεΐνες και λιπαρά οξέα, που μπορούν να βλάψουν τη διαδικασία του καθαρισμού του RNA και τη μετέπειτα μοριακή ανίχνευση (*Escobar-Herrera et al. 2006; Demeke και Jenkins 2010*).

Οι ιοί πρέπει να συγκεντρώνονται, επειδή είναι σε πολύ χαμηλά επίπεδα στα τρόφιμα. Φυσικά μολυσμένα δείγματα οστρακοειδών, περιέχουν τροφιμογενείς ιούς, που κυμαίνονται μεταξύ  $10^2$ - $10^4$  αντιγράφων του ιικού γονιδιώματος ανά γραμμάριο πεπτικού ιστού (*Nishida et al. 2007; Le Guyader et al. 2009*). Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας του ιού, μπορεί να προκύψουν αποτελέσματα ψευδώς θετικά, ψευδώς αρνητικά ή ακόμη και τα δύο. Τα ψευδώς αρνητικά, μπορεί να προκύψουν από την αναστολή, ενώ τα ψευδώς θετικά από κάποια επιμόλυνση. Ο κίνδυνος της επιμόλυνσης ελλοχεύει όταν η μοριακή μέθοδος η οποία επιλέγεται για την ανίχνευση του ιού, είναι υψηλής ευαισθησίας (*Rijpens & Herman, 2002*). Για το λόγο αυτό πρέπει να επιλεγούν προσεκτικά οι θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες που θα χρησιμοποιηθούν.

#### **4.Γ. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΝΟΡΟΪΩΝ & HAV**

Ένας σημαντικός παράγοντας που περιορίζει την ανίχνευση των δοκιμών των ιών στα τρόφιμα, είναι η έλλειψη τυποποιημένων και επικυρωμένων μεθόδων. Η Ευρωπαϊκή Αρχή Τυποποίησης (European Committee of Standardisation, CEN), ανέπτυξε πρότυπη μέθοδο για την ανίχνευση του Νοροϊού και του HAV στα τρόφιμα, η οποία βασίζεται στη μέθοδο της *PCR* (*Lees, 2010*).

Σκοπός της μεθόδου είναι να εξάγει χαμηλά επίπεδα μολυσματικού ιού και την παρουσίασή του σε ένα μη ανασταλτικό εκχύλισμα μέσω μιας δοκιμασίας PCR μεγάλης ευαισθησίας και ισχυρής απόδοσης. Προς ανάλυση είναι τρόφιμα υψηλής επικινδυνότητας όπως μαλάκια, μαλακά φρούτα, σαλάτες καθώς επίσης επιφάνειες των τροφίμων και οι επιφάνειες που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή αυτών. Στα δίθυρα μαλάκια γίνεται τεμαχισμός του πεπτικού αδένου και εν συνεχεία χρησιμοποιείται ως αρχικό υλικό, με επιπλέον ενζυματική πέψη, προσθέτοντας πρωτεϊνάση K (*Jothikumar et al. 2005*).

Για τα επιχρίσματα επιφανειών των τροφίμων, ακολουθείται έκλουση του δείγματος με ρυθμιστικό διάλυμα. Τα δείγματα των φρούτων και λαχανικών,

εκλούνται με ανάδευση, και ακολουθείται η ανάκτηση μετά από καθίζηση, με τη βοήθεια της PEG (πολυαιθυλενογλυκόλη) σε NaCl (Dubois et al. 2009). Ο Loisy et al. (2005) ανέπτυξε μια μέθοδο RT-PCR η οποία βασιζόταν σε ένα στάδιο ανίχνευσης χρησιμοποιώντας μόνο σετ εκκινητών και ανιχνευτών, για την ανίχνευση των Νοροϊών με γονότυπους I και II, σε τεχνητώς μολυσμένα στρείδια..

#### A. mPCR

Η μέθοδος Multiplex RT-PCR (MRT-PCR), μπορεί να εφαρμοστεί για τη ανίχνευση αρκετών ιών. Στο παρελθόν, έχει περιγραφεί ταυτόχρονη ανίχνευση ιού πολιομυελίτιδας (PV1), HAV και NV, χρησιμοποιώντας τρία είδη εκκινητών (Rosenfield & Jaykus, 1999). Οι Formiga-Cruz και συν. (2005) ανέπτυξαν μία άλλη μέθοδο MRT-PCR, για την ανίχνευση αδενοϊού, εντεροϊών και HAV σε αστικά λύματα και οστρακοειδή. Ο στόχος τους επετεύχθη, αφού κατάφεραν να εντοπίσουν και τους τρεις ιούς, παρόλο που η συγκέντρωσή τους ήταν ιδιαίτερα χαμηλή (χαμηλότερη από 1000 αντίγραφα ανά αντίδραση PCR)

#### B. NASBA

Η αλληλοεξαρτώμενη αντίδραση νουκλεϊκού οξέος (*Nucleic acid sequence-based amplification*), βασίζεται στη συμβολή τριών ενζύμων (αντίστροφη μεταγραφάση, RNaseH, και RNA πολυμεράση), και έχει σχεδιαστεί για να ανιχνεύει μονόκλωνο RNA. Το 2002 Ο Jean και συν. Ανέπτυξε μια μέθοδο NASBA η οποία στόχευε στην VP2 πρωτεΐνη του HAV. Κατάφερε λοιπόν να ανιχνεύσει τον ιό, με τον οποίο είχαν εμβολιάσει επιφάνειες μαρουλιών και βατόμουρων. Το μειονέκτημα της μεθόδου, είναι η δυσκολία ανεύρεσης τροφίμων, που μπορούν να υποστούν επεξεργασία και να δοκιμαστούν.

Σε μεταγενέστερη έρευνα, ο Jean et al., (2004) ανέπτυξαν μια πολυπλοκότερη μέθοδο NASBA, η οποία μπορούσε να ανιχνεύσει τον HAV και τους γονότυπους I, II των NV. Έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα, συγκεκριμένα φέτες γαλοπούλας και μαρούλι, είχαν εμβολιαστεί, και η μέθοδος κατάφερε να ανιχνεύσει και τους τρεις ιούς, και στα δύο τρόφιμα.

#### 4.Α. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ & HEV

Δεν υπάρχουν πολλές τυποποιημένες μέθοδοι για την ανίχνευση του ιού *HEV* στο κρέας και τα προϊόντα κρέατος. Είναι όμως ορισμένες αναφορές που βασίζονται στην επιτυχή απομόνωση και διάδοση του ιού σε ιστοκαλλιέργεια, αν και περιορισμένες (*Chandra et al. 2008*). Επειδή η ιστοκαλλιέργεια είναι πολύ δύσκολη, προτιμώνται οι μοριακές μέθοδοι για την ανίχνευση του *HEV* στα τρόφιμα. Σημαντικό βήμα είναι η τήρηση του πρωτοκόλλου που θα πρέπει να ακολουθείται σε κάθε ανάλυση.

Οι διάφορες τεχνικές που ακολουθούνται για την εκχύλιση του RNA του ιού από το μυϊκό ιστό, δεν έχουν αξιολογηθεί επαρκώς. Σε γενικές γραμμές, ο ιστός τεμαχίζεται, ομογενοποιείται, και στη συνέχεια χρησιμοποιούνται διάφορα άλατα όπως ισοθειοκυανική γουαδινίνη για τη λύση του ιστού. Στη συνέχεια γίνεται καθαρισμός του δείγματος με την προσθήκη εκχυλίσματος φαινόλης ή διοξειδίου του πυριτίου, ενώ υπάρχουν και έτοιμα ΚΙΤ για την απομόνωση του RNA. Το καθαρό πλέον RNA είναι διαθέσιμο για ανάλυση με τη μέθοδο της PCR. Υπάρχουν αρκετά πρωτόκολλα για ανίχνευση του *HEV*, και συγκεκριμένα για τους γονότυπους 1-4 σε ζώα και ανθρώπους, με συμβατικές μεθόδους (*Preiss et al., 2006*) ή με τη μέθοδο της RT-PCR (*Gyarmati et al., 2007; Bouwknegt et al., 2009*).

Ορισμένα από τα *kit ELISA* μπορούν να ανιχνεύσουν ανοσοσφαιρίνες *anti-HEV*. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί ανεξάρτητα από το είδος που έχει αναλυθεί, επιτρέποντας έτσι τη δοκιμή ακόμα και για χοίρους ή άλλα είδη ζώων. Αντιγόνα που προσδιορίζονται από ανθρώπους, έχουν χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με συγκεκριμένα είδη δευτερογενών αντισωμάτων, για ορολογικές δοκιμές άλλων ειδών ζώων. Η μέθοδος αυτή δεν έχει επιτυχία, γιατί έχει παρατηρηθεί μεγάλη απόκλιση των αποτελεσμάτων με πανομοιότυπα δείγματα χοίρου, με τη χρήση διαφορετικών ορολογικών δοκιμασιών (*Bachlein & Grummer, 2010*).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΩΝ ΙΩΝ

#### *A. Εμβόλια*

Αν και πολλά εμβόλια είναι υπό ανάπτυξη και δοκιμή, ωστόσο κανένα δεν είναι διαθέσιμο για την πρόληψη της μόλυνσης από Νοροϊό. Είναι πολύ δύσκολη τεχνικά η ανάπτυξη ενός τέτοιου εμβολίου, γιατί η φυσική λοίμωξη από τον ιό, δεν εξασφαλίζει διαρκή ανοσία. Η ανοσία στη μόλυνση από Νοροϊό, είναι πολύπλοκη, και εκεί επικεντρώνεται η έρευνα για την ανάπτυξη αποτελεσματικού εμβολίου, με τη συλλογή δεδομένων και υποβολή εκθέσεων. Όσον αφορά τον ιό της ηπατίτιδας Α, την περίοδο 1995-1996 στις Η.Π.Α., δόθηκε στη διάθεση ένα ασφαλές και αποτελεσματικό εμβόλιο. Μέχρι σήμερα, η χρήση του συνιστάται σε άτομα ηλικιών έως 40 ετών (CDC 2007b; Fiore et al. 2006) από την ACIP (*Advisory Committee on Immunization Practices*).

Στις Η.Π.Α. ο ετήσιος αριθμός των συμπτωματικών περιπτώσεων έχει μειωθεί σημαντικά λόγω της αύξησης της ανοσοποίησης για τον HAV. Στις Η.Π.Α. υπάρχει εμβόλιο κατά του HEV, το οποίο έχει ελεγχθεί για την ασφάλεια και την ανοσογονικότητά του, αλλά δεν είναι ακόμη διαθέσιμο, καθώς επίσης και στην Κίνα βρίσκεται στο στάδιο ΙΙΙ των δοκιμών. Δυστυχώς κανένα δεν έχει πάρει ακόμη άδεια. Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται οι ιοί και τα μέτρα πρόληψης και ελέγχου που λαμβάνονται, όπου είναι εφικτό.

**Πίνακας 2.** Εφαρμογή συγκεκριμένων μέτρων πρόληψης Νοροϊών, *HAV*, *HEV* που μεταδίδονται με τρόφιμα

Πρόληψη/μέτρα ελέγχου	Νοροϊοί	HAV	HEV
Εγκεκριμένα εμβόλια	Όχι	Ναι	Όχι
Μέτρα προφύλαξης μετά από γνωστή έκθεση	Όχι	Ναί	Όχι
Υγιεινή χειριστών τροφίμων	Ναί	Ναί	Ναί
Υγιεινή ανάπτυξης/συλλογής τροφίμων	Ναί	Ναί	Ναί
Ενδεικτικές μέθοδοι καθαρισμού μολυσμένων υλικών-αντικειμένων	Ναί	Ναί	Ναί

### *B. Προστατευτικά-παρεμβατικά μέτρα μετά την έκθεση*

Τα προστατευτικά μέτρα μετά την έκθεση, απευθύνονται κυρίως σε επαγγελματίες υγείας, οι οποίοι προσπαθούν να αποτρέψουν ή να παράσχουν έγκαιρη θεραπεία έναντι μιας ασθένειας που κάποιος έχει προσβληθεί. Δυστυχώς τα μέτρα αυτά δεν αποτελούν επιλογή, για πολλά παθογόνα, όπως είναι οι Νοροϊοί. Για τον ιό της ηπατίτιδας Α, η διενέργεια των εμβολιασμών και η ανοσοσφαιρίνη, αποτελούν μέτρα κατά της μετάδοσης. Εάν ο κίνδυνος μετάδοσης είναι ορατός, τότε μπορεί να θεωρηθεί ως μέτρο προστασίας η κοινοποίηση του γεγονότος από ΜΜΕ.

Παρεμβατικά μέτρα μπορεί να περιλαμβάνουν την επιθεώρηση σε ένα εστιατόριο, τις πρακτικές χειρισμού τροφίμων την εκτίμηση και κοινοποίηση του κινδύνου στα Μέσα, τη σύσταση κλινικών ανοσοποίησης και τη μετέπειτα επιτήρηση των δευτερογενών περιπτώσεων. Άτομα που έχουν εκτεθεί πρόσφατα σε HAV και τα οποία δεν είχαν προηγουμένως εμβολιαστεί κατά της ηπατίτιδας Α θα πρέπει να χορηγείται μία εφάπαξ δόση του εμβολίου μονού αντιγόνου ή IG<sup>54</sup>, το συντομότερο δυνατό. Ένα εμβόλιο σε δόση ανάλογα με την ηλικία, η οποία προτιμάται της IG

λόγω των πλεονεκτημάτων (συμπεριλαμβανομένων των μακροχρόνια προστασία, ευκολία χορήγησης, και υψηλότερη διαθεσιμότητα) (CDC 2007b).

### *Γ. Υγιεινή χειρισμού τροφίμων (επεξεργασία, προετοιμασία, σερβίρισμα)*

Άτομα τα οποία εργάζονται στον τομέα των τροφίμων και νοσούν με γαστρεντερίτιδα οφειλόμενη σε Νοροϊό, είναι ιδιαίτερα μεγάλος κίνδυνος για τη δημόσια υγεία, διότι χειρίζονται φαγητό και τρόφιμα, που θα καταναλωθούν από άλλους. Ελάχιστα ιικά σωματίδια μπορούν να προκαλέσουν μόλυνση, ενώ ο ιός χαρακτηρίζεται από μεγάλη σταθερότητα στο περιβάλλον, και ένας χειριστής τροφίμων, μπορεί πολύ εύκολα να μολύνει τα τρόφιμα με τα οποία έρχεται σε επαφή. Πολλοί λοιπόν καταναλωτές, τρώγοντας μολυσμένα τρόφιμα αρρωσταίνουν, προκαλώντας ικό ξέσπασμα.

Στις Η.Π.Α., οι χειριστές συστήνεται να αποκλείονται από την εργασία τους (επεξεργασία, προετοιμασία τροφίμων), για τουλάχιστον μία ημέρα μετά την επίλυση των συμπτωμάτων, ενώ πολλές τοπικές και κρατικές υπηρεσίες, συνιστούν αποχή δύο με τρεις ημέρες. Επιπλέον λόγω της μεγάλης σταθερότητας του ιού, συνεχίζει να είναι παρών στα κόπρανα του ασθενή για 2-3 εβδομάδες αφού το άτομο αισθανθεί καλύτερα. Αυτό συνιστά καλό πλύσιμο των χεριών μετά τη χρήση της τουαλέτας και ιδιαίτερα πριν το χειρισμό τροφίμων. Οι χειριστές που νόσησαν πρόσφατα, καλό είναι να τοποθετούνται σε θέσεις που να απέχουν από τα τρόφιμα (χώρος της υποδοχής, τμήμα κρατήσεων).

Παρά το γεγονός ότι κρούσματα Νοροϊών και ηπατίτιδας Α σχετίζονται με κατανάλωση στρειδιών και άλλων οστρακοειδών (Hewitt & Greening 2004; David et al. 2007; Huppertz et al. 2008), εστίες μόλυνσης, μπορούν να παρατηρηθούν και από σαλάτες, σάντουιτς, προϊόντα αρτοποιείου, τα οποία επιμολύνθηκαν λίγο πριν το σερβίρισμα από μολυσμένους χειριστές (Greig et al., 2007).

Ένα τρόφιμο μπορεί να μολυνθεί από χειριστή τροφίμων, χωρίς ωστόσο να πολλαπλασιαστεί ο αριθμός των ιικών σωματιδίων, όπως συμβαίνει με τα βακτήρια, λόγω της ιδιότητάς τους να μη αντιγράφονται, απλά να παραμένουν σταθερά. Παρ'όλα αυτά, λίγα μόνο ιικά σωματίδια μπορούν να προκαλέσουν μόλυνση, ενώ ιδιαίτερα επικίνδυνα στην ηπατίτιδα Α, είναι τα ασυμπτωματικά άτομα και τα παιδιά.

Μολυσμένα άτομα είναι μπορούν να μεταδώσουν τη νόσο έως και δύο εβδομάδες πριν την εμφάνιση του ίκτερου, ή την αύξηση των ηπατικών ενζύμων. Το καλό μαγείρεμα μπορεί να καταστρέψει τους Νοροϊούς, αν και μερικοί δείχνουν σταθερότητα ακόμη και σε θερμοκρασίες 140° F για 30 λεπτά (*Mc Donnell et al. 1997*).

Εργαστηριακές μελέτες που έχουν διεξαχθεί με τη χρήση υποκατάστατων ιών, λόγω της αδυναμίας καλλιέργειάς τους, επιδεικνύουν απενεργοποίηση στους 145 ° F μετά από λιγότερο από 30 δευτερόλεπτα (*Cannon et al. 2006*). Οι Νοροϊοί μπορούν να επιβιώσουν σε θερμοκρασίες ψύξης και κατάψυξης, και μπορούν να παραμείνουν σε σκληρές επιφάνειες παρασκευής τροφίμων για μία εβδομάδα σε θερμοκρασία δωματίου (*D'Souza et al. 2006*).

Ομοίως με τους Νοροϊοί, ο HAV μπορεί να ζήσει στο περιβάλλον για μήνες, ανάλογα με τις συνθήκες που θα επικρατούν. Σκοτώνεται με θέρμανση στους 185 ° F (85 ° C) για 1 λεπτό (*CDC 2009b*) και εξακολουθεί να μεταδίδεται από μαγειρεμένα τρόφιμα αν μολυνθούν μετά το μαγείρεμα. Ο HAV παραμένει στην επιφάνεια του τροφίμου, (μαρούλι, καρότα, και μάραθο) για 4 έως 9 ημέρες, ενώ το πλύσιμο δεν εξαλείφει την ανίχνευσή του (*Croci et al. 2002*).

Οι περισσότερες τροφιμογενείς επιδημικές εξάρσεις, σχετίζονται με τον ιό της ηπατίτιδας Α από μολυσμένους χειριστές τροφίμων. Ο μολυσμένος χειριστής, μπορεί να μολύνει πολλά άτομα. Η Επιτροπή Ελέγχου Τροφιμογενών Νοσημάτων, (*Committee on Control of Foodborne Illnesses*), αναφέρει ότι σε 816 εστίες σχετίζονταν με χειριστές τροφίμων, ο HAV ήταν ο δεύτερος ιός σαν αιτιολογικός παράγοντας, με πρώτο τους Νοροϊούς, και τα κρούσματα ανήλθαν σε 84 μεταξύ 5,046 περιστατικών τη χρονική διάρκεια 1927-2006 (*Greig et al. 2007*).

**Πίνακας 3.** Προτεινόμενα μέτρα για την πρόληψη και τον έλεγχο των Νοροϊών σύμφωνα με την EPA ( *Environmental Protection Agency*) (<http://www.epa.gov>)

---

1. Τήρηση των κανόνων σωστής υγιεινής των χεριών

- Πλύσιμο χεριών με σαπούνι και τρεχούμενο νερό για 20 δευτερόλεπτα
- Αν είναι διαθέσιμο, να χρησιμοποιείται μετά το σωστό πλύσιμο, απολυμαντικό με βάση το οινόπνευμα (70% αιθανόλη).

2. Καθαρισμός και απολύμανση επιφανειών.

- Χρήση διαλύματος χλωρίνης με συγκέντρωση 1.000-5.000 ppm [1: 50-1: 10 αραίωση οικιακής χλωρίνης (5,25%)] ή κάποιο άλλο εγκεκριμένο απολυμαντικό.

- Στους χώρους υγειονομικής περίθαλψης, τα προϊόντα καθαρισμού πρέπει να είναι εγκεκριμένα και με την κατάλληλη σήμανση.

- Άτομα που ασχολούνται με περιβαλλοντικές υπηρεσίες, θα πρέπει να συμμορφώνονται με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ως προς την αραίωση και το χρόνο εφαρμογής.

3. Να απομακρύνεται το προσωπικό που νοσεί από ευαίσθητες θέσεις εργασίας (τρόφιμα, περίθαλψη, φροντίδα παιδιών) για 48-72 ώρες από την υποχώρηση των συμπτωμάτων.

- Σε κλειστές εγκαταστάσεις ( νοσοκομεία, ιδρύματα χρόνιων παθήσεων, κρουαζιερόπλοια) Θα πρέπει τα περιστατικά να απομονώνονται για 24-72 ώρες από την εκδήλωση των συμπτωμάτων.

- Σε κάποιες επιχειρήσεις τροφίμων, μπορεί να είναι απαραίτητη άδεια από την τοπική ρυθμιστική αρχή μπορεί να είναι απαραίτητη πριν την απομάκρυνση ενός υπαλλήλου από την εργασία του.

4. Ενίσχυση αποτελεσματικών προληπτικών ελέγχων και πρακτικών των εργαζομένων, όπως η εξάλειψη επαφής με γυμνά χέρια σε έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα και το σωστό καθαρισμό και απολύμανση του εξοπλισμού και των επιφανειών

5. Αναφορά όλων των εστιών οξείας γαστρεντερίτιδας σε κρατικές και τοπικές υπηρεσίες υγείας σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς, και το υπουργείο Υγείας εν συνεχεία, να ενημερώσει το CDC, μέσω του Εθνικού Συστήματος Αναφοράς Επιδημιών (*NORS*).

---

#### *4. Υγιεινή καλλιέργεια τροφίμων και συγκομιδή.*

Η έρευνα των τροφιμογενών εστιών της νόσου έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη, εφαρμογή και συνεχιζόμενη λήψη μέτρων πρόληψης και ελέγχου στη βιομηχανία τροφίμων. Υπάλληλοι της δημόσιας υγείας και των υπευθύνων οργανισμών,



εντοπίζουν τα κρίσιμα σημεία ελέγχου, στην διαδρομή από το αγρόκτημα στο τραπέζι και την κατά συνέπεια παρακολούθηση της μόλυνσης από παθογόνα που προέρχονται από τρόφιμα.

Βελτιώσεις σε όλα τα στάδια εφοδιασμού των τροφίμων, (αγρόκτημα, εργοστάσιο επεξεργασίας, κέντρο διανομής, εστιατόριο, οικία), αναμένεται να μειώσει τη συνολική μόλυνση. Οι περισσότερες λοιμώξεις από τροφιμογενείς ιούς, δεν προέρχονται από ζώα και τα παράγωγά τους δεν μολύνουν άμεσα τον άνθρωπο, σε αντίθεση με τα βακτήρια και τα παράσιτα. Ωστόσο, όταν ανθρώπινα κόπρανα έρχονται σε επαφή με είδη διατροφής, τότε η πιθανότητα μόλυνση με ιούς είναι πολύ πιθανή. Σε γεωργική εκμετάλλευση, αυτό μπορεί να συμβεί με την άρδευση νωπών προϊόντων με μολυσμένο νερό. Στο χειρισμό, μπορεί να συμβεί από μολυσμένους εργάτες κατά τη διάρκεια συγκομιδής, ή ακαθαρσίες από την επιφάνεια της διαλογής και επεξεργασίας του εξοπλισμού ([www.coleacp.org/pip](http://www.coleacp.org/pip)).

Υδατογενείς επιδημίες από Νοροϊούς συμβαίνουν σπάνια, συνήθως όταν προκύπτει κάποια βλάβη στο σύστημα χλωρίωσης του πόσιμου, ή νερού αναψυχής (*Podewils et al. 2006*). Το ίδιο συμβαίνει και με τις υδατογενείς επιδημίες από HAV που είναι σαφέστατα λιγότερες από 'ότι οι τροφιμογενείς. Αυτό έχει παρατηρηθεί στις Η.Π.Α. Σε αντίθεση με τους παραπάνω ιούς, όσον αφορά τον HEV η ποιότητα του νερού μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην εξάπλωση του ιού στις αναπτυσσόμενες χώρες, όταν δεν ακολουθούνται οι απαραίτητες πρακτικές εξυγίανσης του νερού (*Fiore, 2004*).

Τις τελευταίες δεκαετίες οι διαιτητικές ανάγκες των ανθρώπων άλλαξαν, και η ζήτηση σε φρούτα και λαχανικά αυξήθηκε. Οι πολίτες καταναλώνουν όλο και περισσότερες ποσότητες, και παρόλο που τα προϊόντα αυτά είναι ωφέλιμα για τον οργανισμό, είναι ιδιαίτερα ευάλωτα στους ιούς (*Wells & Buzzy, 2009*). Επιπλέον το καταναλωτικό κοινό εξαρτάται όλο και περισσότερο από τρόφιμα που επεξεργάζονται εκτός της οικίας του, και επιδιώκει να λαμβάνει καλύτερη ποιότητα, όσον αφορά την ποικιλία, τη γεύση και να εισπράττει την απόλαυση της ευκολίας (*Frazaio et al. 2008*).

Οι αλλαγές αυτές στις προτιμήσεις και οι απαιτήσεις των ανθρώπων, οδήγησαν την παραγωγή των τροφίμων στην παγκοσμιοποίηση. Για παράδειγμα, η παραγωγή των φρούτων και λαχανικών, μπορεί να γίνεται από διάφορα αγροκτήματα,

να συλλέγονται, συγκεντρώνονται και αποστέλλονται σε διεθνείς προορισμούς. Πολλές τροφιμογενείς επιδημίες έχουν συμβεί παγκοσμίως λόγω της διανομής προϊόντων με μολυσματικούς παράγοντες. Ένα από τα μεγαλύτερα τροφιμογενή περιστατικά ξέσπασε στις Η.Π.Α. με ντομάτες και πιπεριές μολυσμένων με *Salmonella* (CDC, 2008).

Η σύγχρονη βιομηχανία τροφίμων απαιτεί για την πρόληψη τον εντοπισμό και τον περιορισμό της ιογενούς μόλυνσης από τρόφιμα, τη συνεργασία πολλών ρυθμιστικών οργανισμών, τοπικών και ομοσπονδιακών υπηρεσιών δημόσιας υγείας καθώς επίσης και τη βιομηχανία τροφίμων. Τρόφιμα τα οποία εμπλέκονται στη μετάδοση του HAV είναι τα οστρακοειδή, τα φρέσκα φρούτα και σαλάτες, παγωτό, τυρί, ψωμί, σάντουιτς, κέικ και άλλα ωμά ή ελλιπώς μαγειρεμένα τρόφιμα (Cliver, 1997). Δύο μεγάλες επιδημίες ηπατίτιδας Α είχαν ξεσπάσει στην Αμερική, το 1997 η πρώτη, στην οποία ευθύνονταν κατεψυγμένες φράουλες ως η πηγή μόλυνσης 262 ατόμων. Η δεύτερη ξέσπασε το 2003, σε τέσσερις πολιτείες, με 601 άτομα που νόσησαν, τρεις θανάτους και 124 που νοσηλεύτηκαν, για την οποία ευθύνονταν εισαγόμενα πράσινα κρεμμύδια (Wheeler et al. 2005).

Σύμφωνα με το FDA ( U.S. Food and Drug Administration), όσοι εργάζονται σε αγροκτήματα στη συγκομιδή, συσκευασία και διανομή, αλλά και επισκέπτες σε τέτοιες επιχειρήσεις, διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην διασφάλιση των προϊόντων. Γι' αυτό θα πρέπει να πληρούν ορισμένες προϋποθέσεις- απαιτήσεις, και να εφαρμόζουν τις απαραίτητες πρακτικές υγιεινής. Ορισμένες απ' αυτές τις απαιτήσεις είναι:

- Το προσωπικό που χειρίζεται τα προϊόντα αλλά και οι εποπτεύοντες του προσωπικού, θα πρέπει να είναι εκπαιδευμένοι όσον αφορά τις αρχές υγιεινής και ασφάλειας των τροφίμων, την υγεία και προσωπική υγιεινή.
- Η λήψη μέτρων για την πρόληψη μολύνσεων των τροφίμων και των επιφανειών από άτομα που η υγεία τους χρήζει ιδιαίτερη μεταχείριση, όπως είναι οι μολυσματικές ασθένειες, οι ανοιχτές πληγές, ο έμετος και η διάρροια.
- Το προσωπικό που εργάζεται σε τέτοιες επιχειρήσεις τροφίμων όταν βρίσκονται σε κίνδυνο μόλυνσης να χρησιμοποιούν πρακτικές

υγιεινής, στο βαθμό που είναι αναγκαίο για την προστασία απ' τη μόλυνση. Αυτό περιλαμβάνει σωστή ατομική υγιεινή και αποφυγή επαφής με ζώα, λήψη προστατευτικών μέτρων όπως χρήση γαντιών, ελαχιστοποιώντας έτσι την μόλυνση των προϊόντων.

- Λήψη μέτρων και για τους επισκέπτες, οι οποίοι θα πρέπει να γνωρίζουν τις διαδικασίες για την προστασία των τροφίμων και των επιφανειών που έρχονται σε επαφή μ' αυτά, και να συμμορφώνονται με την πολιτική της επιχείρησης, καθώς επίσης η επιχείρηση, θα πρέπει να παρέχει τις απαραίτητες εγκαταστάσεις για την εφαρμογή της σωστής υγιεινής και από τους επισκέπτες (<http://www.fda.gov>)

#### *E. Καθαρισμός μολυσμένων υλικών.*

Τα άτομα που νοσούν από Νοροϊό, παράγουν εμετό και κόπρανα τα οποία είναι μολυσμένα. Για το λόγο αυτό, θα πρέπει να γίνεται ειδική μέριμνα για τον καθαρισμό και την απολύμανση των επιφανειών με τις οποίες έρχονται σε επαφή, με χλωριούχο διάλυμα και ξέπλυμα με άφθονο νερό (*USDA, 1999 U.S. Department of Agriculture*). Τρόφιμα και αντικείμενα που έχουν μολυνθεί θα πρέπει να απορρίπτονται, ενώ λευκά είδη όπως ενδύματα, τραπεζομάντηλα, που έχουν μολυνθεί από εμετό ή κόπρανα, θα πρέπει να πλένονται άμεσα σε πολύ υψηλή θερμοκρασία. Η περιβαλλοντική σταθερότητα των Νοροϊών έχει ήδη αναφερθεί, συνεπώς, είναι δύσκολη η επιλογή των καθαριστικών και απολυμαντικών τα οποία θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Οι τεταρτοταγείς ενώσεις του αμμωνίου και η αιθυλική αλκοόλη, σε πολλές περιπτώσεις κρίθηκαν αναποτελεσματικές. Σύμφωνα με την καταγραφή των Barker και συν. (2004), στο σύστημα περίθαλψης, η ακόλουθες διαδικασίες είναι πιο αποτελεσματικές:

- Καθαρισμός μολυσμένης περιοχής με νερό και απορρυπαντικό και εν συνεχεία απολύμανση με υποχλωριώδες διάλυμα 5ppm για τουλάχιστον 5 λεπτά. Η συγκέντρωση αυτή είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή που συνιστάται από τον Κωδικα τροφίμων των Η.Π.Α., για τις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα, συνεπώς απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή.

- Εάν η περιοχή έρχεται σε επαφή με τρόφιμα, πρέπει πρώτα να ξεπλυθεί το διάλυμα απολύμανσης με καθαρό νερό και κατόπιν, να περαστεί άλλο απολυμαντικό με λευκαντικό διάλυμα που αποτελείται από 200 ppm χλωρίου.
- Η απολύμανση του περιβάλλοντος, θα πρέπει να περιλαμβάνει όλες τις επιφάνειες ενώ σε περιπτώσεις Νοροϊού, οι πρακτικές αύξησης αερολυμάτων όπως η χρήση ηλεκτρικής σκούπας, πρέπει να αποφεύγονται.
- Λοίμωξη HAV μπορεί να προληφθεί με επιμελή καθαρισμό, των χεριών και χρήση απολυμαντικών από όλους.

Ανάλογα με τις διάφορες συνθήκες, ο HAV, μπορεί να επιβιώσει έξω από τον ξενιστή π.χ. σε νερό αποχέτευσης για μήνες, ενώ σε επιφάνειες με χαμηλή υγρασία και θερμοκρασία 5 ° C, μπορεί να επιβιώσει για 7 ημέρες. Ο ιός σκοτώνεται με θέρμανση στους 85 °C για ένα λεπτό, ενώ αποτελεσματική είναι και η απολύμανση των επιφανειών με χλωριούχα διαλύματα, τεταρτοταγείς ενώσεις του αμμωνίου, γλουταραλδεΐδη και φορμαλδεΐδη (*Sattar et al. 2000*).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

### 6.A. ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΣΤΗΝ ΠΡΟΛΗΨΗ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ

Η πιθανότερη πηγή μόλυνσης των έτοιμων προς κατανάλωση προϊόντων, είναι οι χειριστές τροφίμων. Ο καλύτερος τρόπος πρόληψης είναι η αυστηρή εφαρμογή των κανόνων υγιεινής τα οποία καλύπτονται απ' τον κανονισμό Ε.Κ. 852/2004, ο οποίος καλύπτει όχι μόνο τα φρέσκα προϊόντα όπως έχει ήδη αναφερθεί, αλλά παρέχει γενικούς κανόνες για τους υπεύθυνους των επιχειρήσεων, που ασχολούνται με την παραγωγή, επεξεργασία όλων των τροφίμων. Ο μολυσμένος χειριστής που δεν αντιλαμβάνεται τη σοβαρότητα της κατάστασής του και δεν ακολουθεί τους κανόνες υγιεινής, μολύνει τις επιφάνειες εργασίας και τα εργαλεία που χρησιμοποιεί (μαχαίρια, κουτάλια, επιφάνειες κοπής). Η μετάδοση των Νοροϊών μπορεί να είναι συνέπεια κατανάλωσης έτοιμων τροφίμων που ήρθαν σε επαφή με μολυσμένες επιφάνειες. (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/>).

## A. Φρέσκα προϊόντα

Σύμφωνα με την ισχύουσα Νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης, και συγκεκριμένα τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό με αρ. 852/200425, ορίζεται ότι:

- Οι υπεύθυνοι των επιχειρήσεων παραγωγής και καλλιέργειας φυτικών προϊόντων, πρέπει να λαμβάνουν τα κατάλληλα μέτρα, αναλόγως την περίπτωση:
  - Να διατηρούνται καθαρά και να απολυμαίνονται όπου κρίνεται απαραίτητο ο εξοπλισμός, τα δοχεία, τα οχήματα
  - Να διασφαλίζονται οι συνθήκες υγιεινής κατά την παραγωγή μεταφορά και αποθήκευση, καθώς επίσης και η καθαριότητα των φυτικών προϊόντων
  - Να χρησιμοποιείται καθαρό πόσιμο νερό όσες φορές χρειάζεται για την αποφυγή μόλυνσης.
  - Να εξασφαλίζεται η κατάλληλη υγεία του προσωπικού που χειρίζεται τρόφιμα, και να γίνεται μέριμνα για την εκπαίδευσή του, για θέματα που θέτουν σε κίνδυνο την υγεία του.
  - Να εμποδίζονται όσο το δυνατόν περισσότερο τα ζώα και παράσιτα, για την αποφυγή μόλυνσης.
  - Να γίνεται σωστή διαχείριση αποβλήτων και επικίνδυνων ουσιών.
  - Να λαμβάνονται υπ' όψιν αποτελέσματα αναλύσεων δειγμάτων που ελήφθησαν από τα φυτά ή άλλων δειγμάτων που έχουν σημασία για την ανθρώπινη υγεία.
  
- Πρέπει να τηρούνται ορθές γεωργικές πρακτικές - *Good Agricultural Practices (GAP)*.



Εικόνα 7. GAP (<http://www.newenglandvfc.org/gap>)

- Πρέπει να γίνεται χρήση πόσιμου ή καθαρού νερού όταν είναι αναγκαίο για την πρόληψη μολύνσεων (δεν υπάρχουν κριτήρια)
- Είναι δυνατόν να χρησιμοποιούνται κατευθυντήριες γραμμές, που έχουν τεθεί απ 'τον Παγκόσμιο οδηγό *GAP* (δεν έχει νομική υποχρέωση)

Η επεξεργασία νωπών-φρέσκων προϊόντων πρέπει να πληροί προϋποθέσεις σύμφωνα με τον Κανονισμό 852/ 2004.

- Να τηρούνται οι κανόνες ορθής βιομηχανικής πρακτικής - *Good Manufacturing Practices (GMP)*
- Η χρήση καθαρού πόσιμου νερού για αποφυγή μολύνσεων.
- Να τηρείται το σχέδιο *HACCP (Hazard Analysis of Critical Control Points)*- Ανάλυση κινδύνων και κρίσιμων σημείων ελέγχου. (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/>).

## 6.B. ΚΕΝΑ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗΣ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑΣ

Δεν υπάρχει ειδική κοινοτική νομοθεσία που να περιλαμβάνει τους ιούς στα κριτήρια ασφαλείας για τα νωπά τρόφιμα. Οι απαιτήσεις για τους υπεύθυνους στις επιχειρήσεις φυτικών προϊόντων είναι γενικού χαρακτήρα, και αφήνουν περιθώρια για υποκειμενικές πρακτικές. Υπάρχουν ωστόσο κάποιες διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες όπως ο *Codex Alimentarius*, στον οποίο περιέχεται κώδικας υγιεινής για φρούτα και λαχανικά (*CAC/RCP 53-2003*). Οι GMP και BMP, συμβάλλουν στον έλεγχο μικροβιακών κινδύνων σε όλα τα στάδια παραγωγής των φρούτων και λαχανικών. Στον κώδικα περιλαμβάνει ένα γενικό πλαίσιο συστάσεων για

συγκεκριμένες γεωργικές και βιομηχανικές πρακτικές ([www.codexalimentarius.net](http://www.codexalimentarius.net)). Αυτό βοηθάει διότι τα φρέσκα φρούτα και λαχανικά, καλλιεργούνται κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Η βιομηχανία φρούτων και λαχανικών είναι περίπλοκη και αναγνωρίζεται ότι ορισμένες συστάσεις του κώδικα είναι δύσκολο να εφαρμοστούν, ιδιαίτερα σε μικρές παραγωγές αναπτυσσόμενων χωρών. Ως εκ τούτου ο κώδικας, λόγω της ευελιξίας του, επιτρέπει στα διάφορα συστήματα ελέγχου την πρόληψη της ρύπανσης των προϊόντων. Επειδή κατευθύνεται στους μικροβιολογικούς κινδύνους, συνεπάγεται και τον έλεγχο των ιών ανθρώπινης και ζωικής προέλευσης.

Ο HEV μπορεί να μεταδοθεί μέσω της κατανάλωσης προϊόντων ζωικής προέλευσης, κυρίως του κρέατος. Ο ιός είναι παρών στο αίμα κατά τη διάρκεια της σφαγής, και στη συνέχεια, μπορεί να βρεθεί στο κρέας και το ήπαρ. Υπάρχουν ορισμένες κατευθυντήριες οδηγίες για μέτρα υγιεινής που πρέπει να λαμβάνονται για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, χωρίς να υπάρχει νομοθεσία για το συγκεκριμένο ιό.

Η νομοθεσία της Ε.Ε., και συγκεκριμένα οι Κανονισμοί 853/2004 και 854/2004 περιλαμβάνουν κανόνες υγιεινής για τρόφιμα ζωικής προέλευσης και τον έλεγχο αυτών, επικεντρώνοντας την προσοχή στην υποχρεωτική προθανάτια επιθεώρηση και την μετά τη σφαγή επιθεώρηση, για την πρόληψη ορισμένων ζωνόσων, όπως η φυματίωση, βρουκέλλωση, και παρασιτικές νόσοι. Οι έλεγχοι αυτοί δεν είναι αποτελεσματικοί όσον αφορά τον HEV ο οποίος μπορεί να είναι παρών στο κρέας των ζώων τη στιγμή της σφαγής, χωρίς να παρουσιάζουν αλλαγές στα όργανά τους (<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri>)

Δυστυχώς, η επιλογή αποτροπής της μόλυνσης από τον HEV μέσω των χοιροτροφικών εκμεταλλεύσεων και κατά συνέπεια η μείωση των μολυσμένων με τον ιό χοίρων κατά τη διάρκεια της σφαγής, παρεμποδίζεται από ελλιπή και περιορισμένη γνώση, σχετικά με την μετάδοση του ιού σε χοίρους (*Bouwknegt et al. 2009*)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τροφιμογενείς μεταδόσεις που σχετίζονται με τους ιούς έχουν τεκμηριωθεί. Οι ασθένειες που σχετίζονται με τους ιούς, διακρίνονται από ασυμπτωματικές

λοιμώξεις, σε ήπιες διαρροϊκές έως σοβαρές νόσοι, όπως είναι η εγκεφαλίτιδα. Μεγάλης σημασίας είναι οι Νοροϊοί και ο ιός της ηπατίτιδας Α στα δίθυρα μαλάκια, τα νωπά προϊόντα και τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα. Αυτές είναι οι πιο συχνά αναγνωρισμένες αιτίες τροφιμογενούς ασθένειας. Ο ιός της ηπατίτιδας Ε απαντάται σε χοίρους σε όλη την Ευρώπη. Δεν πρέπει να παραληφθεί και ο κίνδυνος τροφικών λοιμώξεων προκαλούμενες από νεοαναδυόμενους ιούς.

Η λοίμωξη από Νοροϊούς είναι η πιο κοινή αιτία της λοιμώδους γαστρεντερίτιδας των ανθρώπων. Αποβάλλονται μεγάλες ποσότητες στα κόπρανα και τον εμετό μολυσμένων ατόμων και χρειάζονται μόνο λίγα ιικά σωματίδια για την πρόκληση της ασθένειας. Η απέκκριση του ιού μπορεί ν' αρχίσει πριν την έναρξη συμπτωμάτων ή να συνεχίσουν μετά την κλινική ανάρρωση. Η ασθένεια είναι ήπια και αυτοπεριοριζόμενη, εκτός από τους ηλικιωμένους και τους ανοσοκατασταλαμένους που είναι σοβαρή.

Ο HAV είναι ο πιο κοινός τύπος της ηπατίτιδας παγκοσμίως. Αποβάλλεται από τα κόπρανα σε υψηλό ποσοστό των συμπτωματικών και ασυμπτωματικών ατόμων. Η μετάδοση του ιού ξεκινάει με την έναρξη των συμπτωμάτων, ενώ η μολυσματικότητά του είναι μεγάλη. Το άτομο που έχει νοσήσει δεν παρουσιάζει χρόνια λοίμωξη αλλά μπορεί να εξελιχθεί σε οξεία ηπατίτιδα.

Σε αντίθεση με τους Νοροϊούς και τον HAV, ο HEV είναι αναγνωρισμένος ως ζωνόσος η οποία απαντάται όλο και συχνότερα στην Ε.Ε. Στον άνθρωπο, η κλινική νόσος χαρακτηρίζεται από οξεία ηπατίτιδα και η θνησιμότητα κυμαίνεται από 1-5% ενώ είναι μεγαλύτερη στις έγκυες γυναίκες αναλόγως των συνθηκών. Ανοσοκατεσταλμένα άτομα μπορεί να αναπτύξουν χρόνια ηπατίτιδα, ιδιαίτερα αν έχουν προσβληθεί με το γονότυπο Ι.

Ο κύριος τρόπος μετάδοσης Νοροϊών είναι από άτομο σε άτομο. Από άτομο σε άτομο γίνεται και η μετάδοση του HAV είτε άμεσα είτε έμμεσα, κυρίως όταν γίνονται ταξίδια σε ενδημικές για τον ιό χώρες, ή καταναλώσουν μολυσμένο νερό και τρόφιμα. Τα τρόφιμα μπορούν να μολυνθούν σε οποιοδήποτε στάδιο της τροφικής αλυσίδας: μέσω της πρωτογενούς παραγωγής, της περαιτέρω επεξεργασίας ή από μολυσμένους χειριστές τροφίμων. Οι ιογενείς ζωνόσοι, όπως είναι ο HEV, μπορεί να προκύψουν από την κατανάλωση μολυσμένων ζωικών προϊόντων παρόλο που είναι λίγες οι αναφερόμενες περιπτώσεις.



Είναι γνωστό ότι οι ιοί δεν πολλαπλασιάζονται στα τρόφιμα, αλλά μπορούν να παραμείνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα σ' αυτά και να αποτελέσουν κίνδυνο για τον καταναλωτή. Όσον αφορά τις λοιμώξεις από Νοροϊούς, μελέτες σε διάφορες χώρες έδειξαν ότι υπάρχουν σαφή αποδεικτικά στοιχεία, ότι μπορούν να σχετιστούν με κατανάλωση τροφίμων όπως οστρακοειδών και φρέσκων προϊόντων. Το ίδιο δε συμβαίνει με τον HAV όπου τα δεδομένα είναι ανεπαρκή χωρίς ωστόσο να παραλείψουμε την περιστασιακή εκδήλωση της νόσου από τρόφιμα, που έχει τεκμηριωθεί.

Όσον αφορά την πρόληψη της μόλυνσης από τους Νοροϊούς και τον HAV, πρέπει να επικεντρωθούν σε αποτελεσματικές στρατηγικές ελέγχου. Η πρόληψη επιτυγχάνεται με την εφαρμογή των κατευθυντήριων αρχών του CODEX, που αφορούν την υγιεινή των τροφίμων σε όλα τα στάδιά τους, από την παραγωγή στην κατανάλωση. Κανονισμοί της Ε.Ε. δεν καθορίζουν στα μικροβιολογικά κριτήρια που έχουν θέσει για τα τρόφιμα, κριτήρια για τους ιούς, καθώς επίσης δεν έχουν οριστεί ειδικές απαιτήσεις για την ποιότητα του νερού που χρησιμοποιείται στην παραγωγή τροφίμων (πρωτογενή), παρά μόνο για το πόσιμο.

Η συμμόρφωση που ορίζει η Ε.Ε. για την *E. coli*, δεν εξασφαλίζει την απουσία των ιών στα τρόφιμα. Δεν υπάρχουν αποτελεσματικά μέτρα ελέγχου για να μειωθεί ο κίνδυνος για τη δημόσια υγεία, από την κατανάλωση οστρακοειδών, παρά μόνο με επαρκή θέρμανση. Άλλες μέθοδοι όπως είναι η οξίνιση, η υδροστατική πίεση και η μείωση της ενεργότητας του νερού για τη μείωση του ιού φορτίου, έχει άμεση σχέση με τον τύπο του ιού και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του τροφίμου.

Σχετικά με την ανίχνευση των ιών στα τρόφιμα με τη βοήθεια της PCR, και την πιθανότητα μόλυνσης, απαιτούνται περισσότερες μελέτες. Με την εκπόνηση τέτοιων μελετών, θα γίνει καλύτερη η κατανόηση της σημασίας των τροφιμογενών οδών μετάδοσης, και θα συμβάλλουν στην καθιέρωση περισσότερων επιλογών ελέγχου.

## Ξένη βιβλιογραφία

1. Aggarwal R, Naik S: Epidemiology of hepatitis E: current status. J Gastroenterol Hepatol 2009, 24:1484-1493.
2. Aggarwal R, Jameel S (2011) Hepatitis E. Hepatology 54:2218–2226
3. Aggarwal R, Kini D, Sofat S, Naik SR, Krawczynski K: Duration of viraemia and faecal viral excretion in acute hepatitis E. Lancet 2000, 356:1081-1082.  
Aggarwal R (2011) Clinical presentation of hepatitis E. Virus Res 161:15–22
4. Ahn J.M., Rayamajhi N., Kang S.G., Yoo H.S. (2006): Comparison of real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nested or commercial reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the detection of hepatitis E virus particle in human serum. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 56, 269–274.
5. Baaten GG, Sonder GJB, Dukers NHTM, Coutinho RA, Van den Hoek JAR. Population-based study on the Seroprevalence of hepatitis A, B, and C virus infection in Amsterdam, 2004. J Med Virol. 2007;79:1802–1810
6. Bachlein C and Grummer B, 2010. Hepatitis E - a new zoonotic disease in Germany? Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 123, 198-204.
7. Baert L, Uyttendaele M, Van Coillie E and Debevere J, 2008b. The reduction of murine norovirus 1, *B. fragilis* HSP40 infecting phage B40-8 and *E. coli* after a mild thermal pasteurization process of raspberry puree. Food Microbiology, 25, 871-874.
8. Baert L, Vandekinderen I, Devlieghere F, Van Coillie E, Debevere J and Uyttendaele M, 2009. Efficacy of sodium hypochlorite and peroxyacetic acid to reduce murine norovirus 1, B40-8, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 on shredded iceberg lettuce and in residual wash water. J Food Prot, 72, 1047-1054.

9. Barker, J., I.G. Vipond, and S.F. Bloomfield. 2004. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of norovirus contamination via environmental surfaces. *The Journal of Hospital Infection* 58: 42–49.
10. Bell BP. Global epidemiology of hepatitis A: implications for control strategies. In: Margolis HS, Alter MJ, Liang JT, Dienstag JL, eds. *Viral hepatitis and liver disease*. London: International Medical Press, 2002: 9–14.
11. Bell BP, Feinstone SM. Hepatitis A vaccine. Virus description. In: Plotkin S, ed. *Vaccines*, 4th edn. Philadelphia, PA: Saunders, 2004: 269–297.
12. Bernstein DI. 2009. Rotavirus overview. *Pediatr Infect Dis J* 28:S50–S53.
13. Berto A, Grierson S, Hakze-van der Honing R, Martelli F, Johne R, Reetz J, Ulrich RG, Pavio N, Van der Poel WH, Banks M: Hepatitis E virus in pork liver sausage, France. *Emerg Infect Dis* 2013, 19:264-266 (<http://dx.doi.org/10.3201/>.)
14. Bidawid S, Farber JM, Sattar SA and Hayward S, 2000c. Heat inactivation of hepatitis A virus in dairy foods. *J Food Prot*, 63, 522-528.
15. Blanton, L.H., S.M. Adams, R.S. Beard, G. Wei, S.N. Bulens, M.A. Widdowson, R.I. Glass, and S.S. Monroe. 2006. Molecular and epidemiologic trends of Caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the US, 2000–2004. *The Journal of Infectious Diseases* 193: 413–421.
16. **Boggs, J. D., J. L. Melnick, M. E. Conrad, and B. F. Felsher.** 1970. Viral hepatitis: clinical and tissue culture studies. *JAMA* **214**:1041–1046.
17. Bosch A, 1995. The survival of enteric viruses in the water environment. *Microbiologia*, 11, 393-396.

18. Bosch, A., Sanchez, G., Le Guyader, F., Vanaclocha, H., Haugarreau, L., and Pinto, R. M., 2001, Human enteric viruses in Coquina clams associated with a large hepatitis A outbreak. *Water Sci. Technol.* 43:61–65.
19. Bouwknecht M, Rutjes SA, Reusken CB, Stockhofe-Zurwieden N, Frankena K, de Jong MC, de Roda Husman AM and Poel WH, 2009. The course of hepatitis E virus infection in pigs after contactinfection and intravenous inoculation. *BMC Vet Res*, 5,7.
20. Boxman IL, Tilburg JJ, Te Loeke NA, Vennema H, Jonker K, de Boer E, et al. Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. *Int J Food Microbiol.* 2006;108(3):391-6.
21. Boxman I, Dijkman R, Verhoef L, Maat A, van Dijk G, Vennema H & Koopmans M (2009b) Norovirus on swabs taken from hands illustrate route of transmission: a case study. *J Food Prot* 72: 1753–1755.
21. Brassard J, Gagne' MJ, Ge' ne' reux M, Co^ te' C: Detection of human food-borne and zoonotic viruses on irrigated, field-grown strawberries. *Appl Environ Microbiol* 2012, 78:3763-3766 <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00251-12.56> .
22. Brown, E.A., Day, S. P., Jansen, R. W. and Lemon, S. M. 1991. The 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: secondary structure and elements required for translation in vitro. *Journal of Virology* 65: 5828-5838.
23. Burkhart W, 3rd, Calci KR. Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(4):1375-8
24. Burton-Mcleod, J., Kane, E., Beard, R., Hadley, L., Glass, R., and Ando,T., 2004, Evaluation and comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of antigenically diverse human noroviruses in stool samples. *J. Clin. Microbiol.* 42:2587–2595.

24. Calci KR, Meade GK, Tezloff RC and Kingsley DH, 2005. High-pressure inactivation of hepatitis A virus within oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 339-343.
26. Callahan KM, Taylor DJ and Sobsey MD, 1995. Comparative survival of hepatitis A virus, poliovirus and indicator viruses in geographically diverse seawaters. *Water Sci Technol*, 31, 189-193.
27. Cannon JL, Papafragkou E, Park GW, Osborne J, Jaykus LA and Vinje J, 2006. Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: a comparison of murine norovirus and feline calicivirus. *J Food Prot*, 69, 2761-2765.
28. Carpentier A, Chaussade H, Rigaud E, Rodriguez J, Berthault C, Boue F et al (2012) High hepatitis E virus seroprevalence in forestry workers and in wild boars in France. *J Clin Microbiol* 50:2888–2893
29. Carter MJ, 2005. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1354-1380.
30. Casteel MJ, Schmidt CE and Sobsey MD, 2008. Chlorine disinfection of produce to inactivate hepatitis A virus and coliphage MS2. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 267-273.
31. CDC, 2003, Hepatitis A outbreak associated with green onions at a restaurant—Monaca, Pennsylvania, 2003. *MMWR Morbid. Mortal. Weekly Rep.* 52:1155–1157.
32. CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2008. Outbreak of *Salmonella* serotype Saintpaul infections associated with multiple raw produce items – US, 2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 57: 929–934.
33. CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2000. Foodborne outbreak of Group A rotavirus gastroenteritis among college students – District of Columbia, March–April 2000. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 49:1131–1133.

34. CDC. 2009b. Centers for disease control and prevention. Available at: <http://www.cdc.gov/hepatitis/A/aFAQ.htm#prevention> . Accessed 20 Sep. 2015.
35. CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2007b. Update: Prevention of hepatitis A after exposure to hepatitis A virus and in international travelers. Updated recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Morbidity and Mortality Weekly Report* 56: 1080–1084.
36. Chandra V, Taneja S, Kalia M and Jameel S, 2008. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *J Biosci*, 33, 451-464.
37. Chandra V, Kar-Roy A, Kumari S, Mayor S, Jameel S: The hepatitis E virus ORF3 protein modulates epidermal growth factor receptor trafficking, STAT3 translocation, and the acute-phase response. *J Virol* 2008, 82:7100-7110.
38. Chastel, C., and G. Charmot. 2004. Bacterial and viral epidemics of zoonotic origin: the role of hunting and cutting up wild animals. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique (1990)* 97: 207–212.
39. Cheesbrough, J. S., Green, J., Gallimore, C. I., Wright, P. A., and Brown, D.W., 2000, Widespread environmental contamination with Norwalk-like viruses (NLV) detected in a prolonged hotel outbreak of gastroenteritis. *Epidemiol. Infect.* 125:93–98.
40. Cheng PK, Wong DK, Chung TW and Lim WW, 2005. Norovirus contamination found in oysters worldwide. *J Med Virol*, 76, 593-597
41. Cliver DO, 1985. Vehicular transmission of hepatitis A. *Public Health Rev*, 13, 235-292.

42. Cliver, D.O. 1997. Virus transmission via food. *World Health Statistics Quarterly* 50: 90–101.
43. Cliver DO. 2008. Historic overview of food virology, p. 1– 28. In Koopmans MPG, Cliver DO, and Bosch A (eds.), *Food-Borne Viruses*. ASM Press, Washington D.C.
44. Coelho, C., Heinert, A. P., Simoes, C. M., and Barardi, C. R., 2003, Hepatitis A virus detection in oysters (*Crassostrea gigas*) in Santa Catarina State, Brazil, by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Food Prot.* 66:507–511.
45. Colson P, Borentain P, Queyriaux B, Kaba M, Moal V, Gallian P et al (2010) Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J Infect Dis* 202:825–834
46. Costantini V, Loisy F, Joens L, Le Guyader FS, Saif LJ. Human and animal enteric caliciviruses in oysters from different coastal regions of the United States. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(3):1800-9.
47. Crance JM, Gantzer C, Schwartzbrod L and Deloince R, 1998. Effect of temperature on the survival of hepatitis A virus and its capsidal antigen in synthetic seawater. *Env Tox Water Quality*, 13, 89-92.
48. Croci, L., De Medici, D., Scalfaro, C., Fiore, A., Divizia, M., Donia, D., Cosentino, A. M., Moretti, P., and Costantini, G., 2000, Determination of enteroviruses, hepatitis A virus, bacteriophages and *Escherichia coli* in Adriatic Sea mussels. *J. Appl. Microbiol.* 88:293–298.
49. Croci, L., D. De Medici, C. Scalfaro, A. Fiore, and L. Toti. 2002. The survival of hepatitis A virus in fresh produce. *International Journal of Food Microbiology* 73: 29–34.

50. Cromeans, T., Favorov, M.O., Nainan, O.V., and Margolis, H. S., 2001, Hepatitis A and E viruses, in: *Foodborne Disease Handbook: Viruses, Parasites, Pathogens and HACCP*, 2nd ed., vol. 2 (Y. H. Hui, S. A. Sattar, K. D. Murrell, W.-K. Nip, and P. S. Stanfield, eds.), Marcel Dekker, New York, pp. 23–76.

51. Crossan C, Baker PJ, Craft J, Takeuchi Y, Dalton HR, Scobie L: Hepatitis E virus genotype 3 in shellfish, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 2012, 18:2085-2087 <http://dx.doi.org/10.3201/eid1812.120924>.

52. David, S.T., L. McIntyre, L. MacDougall, D. Kelly, S. Liem, K. Schallie, et al. 2007. An outbreak of norovirus caused by consumption of oysters from geographically dispersed harvest sites, British Columbia, Canada, 2004. *Foodborne Pathogens and Disease* 4: 349–358.

53. Demeke, T., Jenkins, G.R., 2010. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396, 1977–1990.

54. de Roda Husman AM, Bijkerk P, Lodder W, van den Berg H, Pribil W, Cabaj A, Gehringer P, Sommer R and Duizer E, 2004. Calicivirus inactivation by nonionizing (253.7-nanometer wavelength [UV]) and ionizing (Gamma) radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5089-5093.

**55. Dienstag, J. L., S. M. Feinstone, A. Z. Kapikian, R. H. Purcell, J. D. Boggs, and M. E. Conrad.** 1975. Faecal shedding of hepatitis-A antigen. *Lancet* **ii**:765–767.

**56. Dienstag, J. L., J. A. Routenberg, R. H. Purcell, R. R. Hooper, and W. O. Harrison.** 1975. Foodhandler-associated outbreak of hepatitis type A. An immune electron microscopy study. *Ann. Intern. Med.* **83**:647–650.

57. Dolin, R., Blacklow, N. R., DuPont, H., Formal, S., Buscho, R. F., Kasel, J. A., Chames, R. P., Hornick, R., and Chanock, R. M., 1971, Transmission of acute



infectious nonbacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates. *J. Infect. Dis.* 123:307–312.

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

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

60. Drobeniuc J, Favorov MO, Shapiro CN, Bell BP, Mast EE, Dadu A et al (2001) Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J Infect Dis* 184:1594–1597

61. D'Souza, D.H., A. Sair, K. Williams, E. Papafragkou, J. Jean, C. Moore, and L. Jaykus. 2006. Persistence of Calicivirus on environmental surfaces and their transfer to food. *International Journal of Food Microbiology* 108: 84–91.

62. D'Souza DH, Sair A, Williams K, Papafragkou E, Jean J, Moore C & Jaykus L (2006) Persistence of caliciviruses on environmental surfaces and their transfer to food. *Int J Food Microbiol* 108: 84–91.

63. Dubois E, Hennechart C, Merle G, Burger C, Hmila N, Ruelle S, Perelle S and Ferre V, 2007. Detection and quantification by real-time RT-PCR of hepatitis A virus from inoculated tap waters, salad vegetables, and soft fruits: characterization of the method performances. *Int J Food Microbiol*, 117, 141-149.

64. Duizer E, Bijkerk P, Rockx B, de Groot A, Twisk F and Koopmans M, 2004. Inactivation of caliciviruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4538-4543.

65. Duizer E and Koopmans M. 2008. Emerging food-borne viral diseases, p. 117–146. In Koopmans MPG, Cliver DO, and Bosch A (eds.), *Food-Borne Viruses*. ASM Press, Washington D.C.

66. Emerson SU, Arankalle VA and Purcell RH, 2005. Thermal stability of hepatitis E virus. *J Infect Dis*, 192, 930-933.
67. Emerson SU, Purcell RH (2003) Hepatitis E virus. *Rev Med Virol* 13:145–154.
68. Enouf V., Dos Reis G., Guthmann J.P., Guerin P.J., Caron M., Marechal V., Nicand E. (2006): Validation of single real-time TaqMan® PCR assay for detection and quantization of four major genotypes of hepatitis E virus in clinical specimens. *Journal of Medical Virology*, 78, 1076–1082.
69. Enriquez CE, Hurst CJ and Gerba CP, 1995. Survival of enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea, and waste water. *Water Res*, 29, 2548-2553.
70. -Herrera, J., Cancio, C., Guzman, G.I., Villegas-Sepulveda, N., Estrada-Garcia, T., Garcia-Lozano, H., Gomez-Santiago, F., Gutierrez-Escolano, A.L., 2006. Construction of an internal RT-PCR standard control for the detection of human caliciviruses in stool. *Journal of Virological Methods* 137, 334–338.
71. FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization]. 2008. Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs: Meeting Report. Microbiological Risk Assessment Series No. 14. Rome. 151pp.
72. Feagins AR, Opriessnig T, Guenette DK, Halbur PG and Meng XJ, 2008. Inactivation of infectious hepatitis E virus present in commercial pig livers sold in local grocery stores in the United States. *Int J Food Microbiol*, 123, 32-37.
- 73. Feinstone, S. M., A. Z. Kapikian, and R. H. Purcell.** 1973. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus-like antigen associated with acute illness. *Science* **182**:1026–1028.

74. Fino VR and Kniel KE, 2008. UV light inactivation of hepatitis A virus, aichi virus, and feline calicivirus on strawberries, green onions, and lettuce. *Journal of Food Protection*, 71, 908-913.

75. Fiore, A., 2004, Hepatitis A transmitted by food. *Clin. Infect. Dis.* 38:705–715.

76. Fiore, A.E., A. Wasley, and B.P. Bell. 2006. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Morbidity and Mortality Weekly Report* 55(RR-7): 1–23.

76. Formiga-Cruz, M., Hundesa, A., Clemente-Casares, P., Albinana-Gimenez, N., Allard, A., and Girones, R., 2005, Nested multiplex PCR assay for detection of human enteric viruses in shellfish and sewage, *J. Virol. Methods* 125:111–118.

77. Frazão, E., Meade, B., and Regmi, A. 2008. Converging patterns in global food consumption and food delivery systems  
[.http://www.ers.usda.gov/AmberWaves/February08/Features/CovergingPatterns.htm](http://www.ers.usda.gov/AmberWaves/February08/Features/CovergingPatterns.htm) .  
Accessed 29 Aug. 2015.

78. CI, Pipkin C, Shrimpton H, Green AD, Pickford Y, McCartney C, Sutherland G, Brown DW, Gray JJ: **Detection of multiple enteric virus strains within a foodborne outbreak of gastroenteritis: an indication of the source of contamination.** *Epidemiology and infection* 2005, **133**(1):41-47. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)

79. Garbuglia AR, Scognamiglio P, Petrosillo N, Mastroianni CM, Sordillo P, Gentile D et al (2013) Hepatitis e virus genotype 4 outbreak, Italy, 2011. *Emerg Infect Dis* 19:110–114

80. Gaulin, C.D., D. Ramsay, P. Cardinal, and M.-A. D’Halevyn. 1999. Epidemic of gastroenteritis of viral origin associated with eating imported raspberries. *Canadian Journal of Public Health* 90: 37–40.

81. Gentry J, Vinje J, Guadagnoli D, Lipp EK. Norovirus distribution within an estuarine environment. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(17):5474-80.
82. Ghabrah T.M., Tsarev S.A., Yarbough P.O., Emerson S.U., Strickland G.T., Purcell R.H. (1998): Comparison of tests for antibody to hepatitis E virus. *Journal of Medical Virology*, 55, 134–137.
83. Glass, R. I., U. D. Parashar, and M. K. Estes. 2009. Norovirus gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.* 361:1776–1785.
84. Green, K., Kapikian, A. Z., and Chanock, R. M., 2001, Human caliciviruses, in: *Fields Virology*, 4th ed., vol. 1 (D.M. Knipe and P. M. Howley, eds.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 841–874
85. Green KY, Belliot G, Taylor JL, Valdesuso J, Lew JF, Kapikian AZ, Lin FY: **A predominant role for Norwalk-like viruses as agents of epidemic gastroenteritis in Maryland nursing homes for the elderly.** *The Journal of infectious diseases* 2002, **185**(2):133-146. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#).
86. Greening,G.E.,Hewitt, J., Hay, B. E., and Grant, C. M. 2003. Persistence of Norwalklike viruses over time in Pacific oysters grown in the natural environment, in: *Molluscan Shellfish Safety*, Proceedings of the 4th International Conference on Molluscan Shellfish Safety (A.Villalba, B. Reguera, J. L. Romalde, and R. Beiras, eds.), Consellerva de Pesca e Asuntos Marvtimos da Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, Spain, pp. 367–377.
87. Grimm A.C., Fout G.S. (2002): Development of molecular method to identify hepatitis E virus in water. *Journal of Virological Methods*, 101, 175–188.
88. Greig, J.D., E.C. Todd, C.A. Bartleson, and B.S. Michaels. 2007. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 1. Description of the problem, methods and agents involved. *Journal of Food Protection* 70: 1752–1761.

89. Gulati BR, Allwood PB, Hedberg CW and Goyal SM, 2001. Efficacy of commonly used disinfectants for the inactivation of calicivirus on strawberry, lettuce, and a food-contact surface. *Journal of Food Protection*, 64, 1430-1434.
90. Gyarmati P, Mohammed N, Norder H, Blomberg J, Belak S and Widen F, 2007. Universal detection of hepatitis E virus by two real-time PCR assays: TaqMan and Primer-Probe Energy Transfer. *J Virol Methods*, 146, 226-235.
91. Hakze-van der Honing RW, van Coillie E, Antonis AF, van der Poel WH (2011) First isolation of hepatitis E virus genotype 4 in Europe through swine surveillance in the Netherlands and Belgium. *PLoS One* 6:e22673.
92. Hale A, Mattick K, Lewis D, Estes M, Jiang X, Green J, Eglin R, Brown D: **Distinct epidemiological patterns of Norwalk-like virus infection.** *Journal of medical virology* 2000, **62**(1):99-103. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
93. Halliday, L. M., Kang, L.Y., Zhou, T. K., Hu, M. D., Pan, Q. C., Fu, T.Y., Huang, Y. S., and Hu, S. L., 1991, An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China. *J. Infect. Dis.* 164:852–859.
94. Hewitt J and Greening GE, 2006. Effect of heat treatment on hepatitis A virus and norovirus in New Zealand greenshell mussels (*Perna canaliculus*) by quantitative real-time reverse transcription PCR and cell culture. *J Food Prot*, 69, 2217-2223.
95. Hewitt, J., and G.E. Greening. 2004. Survival and persistence of norovirus, hepatitis A virus, and feline Calicivirus in marinated mussels. *Journal of Food Protection* 67: 1743–1750.
96. Hollinger, F. B., and Emerson, S. U., 2001, Hepatitis A virus, in: *Fields Virology*, 4<sup>th</sup> ed., vol. 1 (D. M. Knipe and P. M. Howley, eds.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 799–840.

97. Hsieh S.Y., Yang P.Y., Ho Y.P., Chu C.M., Liaw Y.F. (1998): Identification of a novel strain of hepatitis E virus responsible for sporadic acute hepatitis in Taiwan. *Journal of Medical Virology*, 55, 300–304.
98. Hsu, C.; Riley, L.; Livingston, R. Molecular characterization of three novel murine noroviruses. *Virus Genes*. **2007**, 34, 147–155.
99. (<http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/gastro/norovirus-factsheet.htm>.) Accessed 10 July 2015.
100. (<http://www.cdc.gov/Features/Norovirus/> ) Accessed 10 May 2015
101. (<http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2016/infectious-diseases-related-to-travel/hepatitis-a>) Accessed 12 July 2015
102. (<http://www.fda.gov>) Accessed 3 Aug. 2015
103. (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ>) Accessed 10 Sep. 2015.
104. (<http://www2.keelpno.gr/blog/?p=3793> )Accessed 2 Sep. 2015
105. (<http://www.keelpno.gr/>) Accessed 10 May 2015
106. (<http://www.newenglandvfc.org/gap>) Accessed 10 Sep. 2015.
107. (<http://viralzone.expasy.org/>) Accessed 13 July 2015
108. ([http://www.who.int/disease/ηπατίτιδα/HepatitisE\\_who.cdscs.recd.2001\\_12.pdf](http://www.who.int/disease/ηπατίτιδα/HepatitisE_who.cdscs.recd.2001_12.pdf)) Accessed 13 Sep. 2015
109. Huppatz, C., S.A. Munnoch, T. Worgan, T.D. Merritt, C. Dalton, P.M. Kelly, et al. 2008. A norovirus outbreak associated with consumption of NSW oysters: implications for quality assurance systems. *Communicable Diseases Intelligence* 32: 88–91.
110. Huang YR, 2008. Application of electrolyzed water in the food industry. *Food Control*, 19, 329-345.
111. Hutin YJ, Pool V, Cramer EH, Nainan OV, Weth J, Williams IT, Goldstein ST, Gensheimer KF, Bell BP, Shapiro CN, Alter MJ and Margolis HS, 1999. A multistate,

foodborne outbreak of hepatitis A. National Hepatitis A Investigation Team. *N Engl J Med*, 340, 595-602.

112. ILSI Europe Expert Group on Animal Borne Viruses. 2009 Animal-borne viruses of relevance to the food industry

113. Jacobsen, KH; Wiersma, ST (24 September 2010). "Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005". *Vaccine* **28** (41): 6653–7. [doi:10.1016/j.vaccine.2010.08.037](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.08.037). [PMID 20723630](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20723630/)

114. Jean, J., Blais, B., Darveau, A., and Fliss, I., 2002, Simultaneous detection and identification of hepatitis A virus and rotavirus by multiplex nucleic acid sequence based amplification (NASBA) and microtiter plate hybridization system, *J. Virol. Methods* 105:123–132.

115. Jean, J., D'Souza, D. H., and Jaykus, L.A., 2004, Multiplex nucleic acid sequence-based amplification for simultaneous detection of several enteric viruses in model ready-to-eat foods, *Appl. Environ. Microbiol.* 70:6603–6610.

116. Jothikumar N, Lowther JA, Henshilwood K, Lees DN, Hill VR and Vinje J, 2005. 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*, 71, 1870-1875.

117. Jothikumar N., Cromeans T.L., Robertson B.H., Meng X.J., Hill V.R. (2006): A broadly reactive one-step realtime RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *Journal of Virological Method*, 131, 65–71.

118. Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Kojima S, et al. Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to norovirus in Japan. *J Clin Microbiol.* 2004;42:2988e95

119. Kamar N, Bendall R, Legrand-Abbravanel F, Xia NS, Ijaz S, Izopet J et al (2012) Hepatitis E. *Lancet* 379:2477–2488
120. Kaplan JE, Schonberger LB, Varano G, Jackman N, Bied J, Gary GW: **An outbreak of acute nonbacterial gastroenteritis in a nursing home. Demonstration of person-to-person transmission by temporal clustering of cases.** *American journal of epidemiology* 1982, **116**(6):940-948. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
121. Khudyakov Y.E., Lopareva E.N., Jue D.L., Crews T.K., Thyagarajan S.P., Fields H.A. (1999): Antigenic domains of the open reading frame 2-encoded protein of hepatitis E virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 2863–2871.
122. Kingsley DH, Guan DS and Hoover DG, 2005. Pressure inactivation of hepatitis A virus in strawberry puree and sliced green onions. *Journal of Food Protection*, 68, 1748-1751.
123. Kingsley DH, Hollinian DR, Calci KR, Chen HQ and Flick GJ, 2007. Inactivation of a norovirus by high-pressure processing. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 581-585.
124. Koch J, Schneider T, Stark K, Schreier E: [**Norovirus infections in Germany**]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 2006, **49**(3):296-309. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#).
125. Koff, R.S. 1998. Hepatitis A. *Lancet* 351:1643-1649
126. Kokkinos P, Kozyra I, Lazic S, Bouwknegt M, Rutjes S, Willems K, Moloney R, de Roda Husman AM, Kaupke A, Legaki E et al.: Harmonised investigation of the occurrence of human enteric viruses in the leafy green vegetable supply chain in three European countries. *Food Environ Virol* 2012, 4:179-191 <http://dx.doi.org/10.1007/s12560-012-9087-8.57>.
127. Koo, H. L., Ajami, N., Atmar, R. L., & DuPont, H. L. (2010). Noroviruses: the principal cause of foodborne disease worldwide. *Discovery medicine*, 10(50), 61.



128. Koopmans, M., Bonsdorff, C. H., Vinjé, J., Medici, D., & Monroe, S. (2002). Foodborne viruses. *FEMS Microbiology reviews*, 26(2), 187-205.
129. Koopmans M and Duizer E, 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 23-41.
130. Krawczynski K., Bradley D.W. (1989): Enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis: identification of virus-associated antigen in experimentally infected cynomolgus macaques. *Journal of Infectious Diseases*, 159, 1042–1049.
131. Kremastinou J, Kalapothaki V, Trichopoulos D. The changing epidemiologic pattern of hepatitis A infection in urban Greece. *Am J Epidemiol*. 1984;120:703–706.
- 132. Krugman, S., J. P. Giles, and J. Hammond.** 1967. Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection. *JAMA* **200**:365–373.
133. Kumar A, Beniwal M, Kar P, Sharma JB, Murthy NS: Hepatitis E in pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet* 2004, 85:240-244.
134. Kuo, Hung-Wei; Schmid, Daniela; Jelovcan, Sandra; Pichler, Anna-Margaretha; Magnet, Eva; Reichart, Sandra; Allerberger, Franz. A Foodborne Outbreak Due to Norovirus in Austria, 2007. *Journal of Food Protection*, No 1, 2009, pp. 193-196(4).
135. Lau SK, Woo PC, Wong BH, Tsoi HW, Woo GK, Poon RW, Chan KH, Wei WI, Peiris JS and Yuen KY, 2004b. Detection of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein in SARS patients by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*, 42, 2884-2889.
136. Lees D and CW T, 2010. International Standardisation of a Method for Detection of Human Pathogenic Viruses in Molluscan Shellfish. *Food and Environ*, 2, 146-155.
137. Legrand-Abravanel F, Kamar N, Sandres-Saune K, Lhomme S, Mansuy JM, Muscari F, Sallusto F, Rostaing L, Izopet J: Hepatitis E virus infection without

reactivation in solid-organ transplant recipients, France. *Emerg Infect Dis* 2011, 17:30-37.

138. Le Guyader, F. S., Loisy, F., Atmar, R. L., Hutson, A. M., Estes, M. K., Ruvoen-Clouet, N., et al. (2006). Norwalk virus-specific binding to oyster digestive tissues. *Emerging Infectious Diseases*, 12(6), 931–936.

139. Le Guyader F and Atmar RL, 2008. Binding and inactivation of viruses on and in food, with a focus on the role of the matrix. In: *Food-borne viruses: progress and challenges*. Eds: M Koopmans, ABosch, D Cleaver. ASM Press, Washington DC, 189-208.

140. Le Guyader, F.S., Parnaudeau, S., Schaeffer, J., Bosch, A., Loisy, F., Pommepuy, M., Atmar, R.L., 2009. Detection and quantification of noroviruses in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 618–624

141. Li X, Kamili S, Krawczynski K: Quantitative detection of hepatitis E virus RNA and dynamics of viral replication in experimental infection. *J Viral Hepat* 2006, 13:835-839.

142. Loisy, F., Atmar, R. L., Guillin, P., Le Cann, P., Pommepuy, M., and Le Guyader, F. S., 2005, Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish, *J. Virol. Methods* 123:1–7.

143. Lozano, R (Dec 15, 2012). “Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the global Burden of Disease Study 2010”. *Lancet* **380** (9859): 2095-128.

144. Luby SP, Rahman M, Hossain MJ, Blum LS, Husain MM, Gurley E, Khan R, Ahmed BN, Rahman S, Nahar N, Kenah E, Comer JA and Ksiazek TG, 2006. Foodborne transmission of Nipah virus, Bangladesh. *Emerg Infect Dis*, 12, 1888-1894.

145. Lu L, Li C, Hagedorn CH (2006) Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol* 16:5–36
146. Mäde D, Trübner K, Neubert E, Höhne M and Johne R, 2013. Detection and typing of norovirus from frozen strawberries involved in a large-scale gastroenteritis outbreak in Germany. *Food and Environmental Virology*,5, 162-168.
- 147. Mannucci, P. M., S. Gdovin, A. Gringeri, M. Colombo, A. Mele, N. Schinaia, N. Ciavarella, S. U. Emerson, and R. H. Purcell.** 1994. Transmission of hepatitis A to patients with hemophilia by factor VIII concentrates treated with organic solvent and detergent to inactivate viruses. The Italian Collaborative Group. *Ann. Intern. Med.* **120**:1–7.
148. McCaustland KA, Bond WW, Bradley DW, Ebert JW and Maynard JE, 1982. Survival of hepatitis A virus in feces after drying and storage for 1 month. *J Clin Microbiol*, 16, 957-958.
149. Marshall, J.A.; Bruggink, L.D. Laboratory diagnosis of norovirus. *Clin. Lab.* **2006**, 52, 571-581.
150. Matsuura Y, Suzuki M, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I, Yokoyama M et al (2007) Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Arch Virol* 152:1375–1381
151. Mattison K and Bidawid S, 2009. Analytical methods for food and environmental viruses. *Food Environ Virol*, 1, 107-122.
152. Mattison, K. (2011). Norovirus as a foodborne disease hazard. *Advances in food and nutrition research*, 62, 1-39.
153. Mbithi JN, Springthorpe VS and Sattar SA, 1991. Effect of relative humidity and air temperature on survival of hepatitis A virus on environmental surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1349-1399.

154. McDonnell, S., K. Kirkland, W.B. Hlady, C. Aristeguieta, R.S. Hopkins, S.S. Monroe, and R.I. Glass. 1997. Failure of cooking to prevent shellfish-associated viral gastroenteritis. *Archives of Internal Medicine* 157: 111–116.
155. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, and Tauxe RV. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5:607–625.
156. Melnick, J.L. 1992. Properties and classification of hepatitis A virus. *Vaccine* 10 Suppl 1: S24-6.
157. Meng XJ, Halbur PG, Haynes JS, Tsareva TS, Bruna JD, Royer RL et al (1998) Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. *Arch Virol* 143:1405–1415
158. Meng XJ (2003) Swine hepatitis E virus: cross-species infection and risk in xenotransplantation. *Curr Top Microbiol Immunol* 278:185–216.
159. Meng XJ (2011) From barnyard to food table: the omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety. *Virus Res* 161:23–30
160. Miossec L, Le Guyader F, Haugarreau L, Pommepuy M.[Magnitude of rainfall on viral contamination of the marine environment during gastroenteritis epidemics in human coastal population]. *Rev Epidemiol Sante Publique*. 2000;48 Suppl 2:2S62-71.
161. Nishida, T., Nishio, O., Kato, M., Chuma, T., Kato, H., Iwata, H., Kimura, H., 2007. Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan. *Microbiology and Immunology* 51, 177–184.
162. Niu, M. T., Polish, L. B., Robertson, B. H., Khanna, B. K., Woodruff, B. A., Shapiro, C. N., Miller, M. A., Smith, J. D., Gedrose, J. K., Alter, M. J., and Margolis, H. S., 1992, Multistate outbreak of hepatitis A associated with frozen strawberries. *J. Infect. Dis.* 166:518–524.

163. Okamoto H (2007) Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res* 127:216–228.
164. Oliver, S.L.; Dastjerdi, A.M.; Wong, S.; El-Attar, L.; Gallimore, C.; Brown, D.W.G.; Green, J.; Bridger, J.C. Molecular Characterization of Bovine Enteric Caliciviruses: a Distinct Third Genogroup of Noroviruses (Norwalk-Like Viruses) Unlikely To Be of Risk to Humans. *J. Virol.* **2003**, *77*, 2789–2798.
165. Ozawa K, Oka T, Takeda N, Hansman GS: **Norovirus infections in symptomatic and asymptomatic food handlers in Japan.** *Journal of clinical microbiology* 2007, **45**(12):3996-4005. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [PubMed Central Full Text](#)
166. Panda SK, Thakral D, Rehman S: Hepatitis E virus. *Rev Med Virol* 2007, 17:151-180.
167. Parashar U, Quiroz ES, Mounts AW, Monroe SS, Fankhauser RL, Ando T, Noel JS, Bulens SN, Beard SR, Li JF, *et al.*: "**Norwalk-like viruses**". **Public health consequences and outbreak management.** *MMWR Recomm Rep* 2001, **50**(RR-9):1-17. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
168. Patel, M.M. Systematic Literature Review of Role of Noroviruses in Sporadic Gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 2008, *14*, 1224–1231.
169. Patel, M.M.; Hall, A.J.; Vinje, J.; Parashar, U.D. Noroviruses: A comprehensive review. *J. Clin. Virol.* **2009**, *44*, 1-8.
170. Patricia Arauz-Ruiz, L.S., Garcia, Z., Taylor, L., Vison, K., Norder, H. and Magnius, L. O. 2001. Presumed common source outbreaks of hepatitis A in an endemic area confirmed by limited sequencing within the VP1 region. *Journal of Medical Virology* 65: 449-456.

171. Pebody, R. G., Leino, T., Ruutu, P., Kinnunen, L., Davidkin, I., Nohynek, H., and Leinikki, P., 1998, Foodborne outbreaks of hepatitis A in a low endemic country: an emerging problem? *Epidemiol. Infect.* 120:55–59.

172. Podewils, L.J., L. Zanardi Blevins, M. Hagenbuch, D. Itani, A. Burns, C. Otto, L. Blanton, S. Adams, S.S. Monroe, M.J. Beach, and M.A. Widdowson. 2006. Outbreak of norovirus illness associated with a swimming pool. *Epidemiology and Infection* 135: 827–833.

173. Pina S., Buti M., Cotrina M., Piella J., Girones R. (2000): HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and sewage of animal origin in Spain. *Journal of Hepatology*, 33, 826–833.

174. Pinto RM and Bosch A, 2008. Rethinking virus detection in food. In: Food-borne viruses progress and challenges. Eds: M Koopmans, DO Cliver, A Bosch. ASM Press, Washington D.C., 171-188.

175. Preiss JC, Plentz A, Engelmann E, Schneider T, Jilg W, Zeitz M and Duchmann R, 2006. Autochthonous hepatitis E virus infection in Germany with sequence similarities to other European isolates. *Infection*, 34, 173-175.

176. Ramsay, C. N., and Upton, P. A., 1989, Hepatitis A and frozen raspberries, *Lancet* 1:43–44.

177.Regulation854/2004.

<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:226:0083:0127:EN:PDF>

178. Reid,T. M., and Robinson, H.G., 1987, Frozen raspberries and hepatitis A. *Epidemiol. Infect.* 98:109–112.

179. Richards, A. F., Lopman, B., Gunn, A., Curry, A., Ellis, D., Cotterill, H., Ratcliffe, S., Jenkins, M., Appleton, H., Gallimore, C. I., Gray, J. J., and Brown, D.

W., 2003, Evaluation of a commercial ELISA for detecting Norwalk-like virus antigen in faeces. *J. Clin. Virol.* 26:109–115.

180. Richards, A., Green, J., Brown, D., Beard, S. S., Monroe, S. S., de Bruin, E., Svensson, L., and Koopmans, M. P., 2003, International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses. *J. Clin. Microbiol.* 41:1423–1433.

181. Rijpens, N.P., Herman, L.M.F., 2002. Molecular methods for identification and detection of bacterial food pathogens. *Journal of AOAC International* 85, 984–995.

182. Robertson, B.H., Khanna, B., Nainan, O. V. and Margolis, H. S. 1991. Epidemiologic patterns of wild-type hepatitis A virus determined by genetic variation. *Journal of Infectious Diseases* 163: 286-292.

183. Robertson, B.H., Jansen, R. W., Khanna, B., Totsuka, A., Nainan, O. V., Siegl, G., Widell, A., Margolis, H. S., Isomura, S. and Ito, K. 1992. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *Journal of General Virology* 73: 1365-1377.

184. Rosenfield, S. I., and Jaykus, L. A., 1999, A multiplex reverse transcription polymerase chain reaction method for the detection of foodborne viruses, *J. Food Prot.* 62:1210–1214.

185. Rueckert, R.R. and Wimmer, E. 1984. Systematic nomenclature of picornavirus proteins. *Journal of Virology* 50: 957-959.

186. Saad MD, Hussein HA, Bashandy MM, Kamel HH, Earhart KC, Fryauff DJ et al (2007) Hepatitis E virus infection in work horses in Egypt. *Infect Genet Evol* 7:368–373.

187. Sattar, S.A., T. Jason, S. Bidawid, and J. Farber. 2000. Foodborne spread of hepatitis A: recent studies on virus survival, transfer and inactivation. *Canadian Journal of Infectious Diseases* 11: 159–163.

188. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL & Griffin PM (2011) Foodborne illness acquired in the United States: major pathogens. *Emerg Infect Dis* 17: 7–15.
189. Schlauder G.G., Desai S.M., Zanetti A.R., Tassopoulos N.C., Mushahwar I.K. (1999): Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: Evidence for additional genotypes of HEV. *Journal of Medical Virology*, 57, 243–251.
190. Scholz E, Heinricy U and Flehmig B, 1989. Acid stability of hepatitis A virus. *Journal of General Virology*, 70, 2481-2485.
191. Schreier E, Doring F, Kunkel U: **Molecular epidemiology of outbreaks of gastroenteritis associated with small round structured viruses in Germany in 1997/98.** *Archives of virology* 2000, **145**(3):443-453.  
([PubMed Abstract](#)|[Publisher Full Text](#))
192. Scientific Report of the Scientific Panel on Biological Hazards on “Food as a possible source of infection with highly pathogenic avian influenza viruses for humans and other mammals” <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/74r.htm>.
193. Scobie L, Dalton HR (2013) Hepatitis E: source and route of infection, clinical manifestations and new developments. *J Viral Hepat* 20:1–11.
194. Siegl, G., Weitz, M. and Kronauer, G. 1984b. Stability of hepatitis A virus. *Intervirology* 22: 218-226.
195. Siebenga, J. J., Vennema, H., Duizer, E., & Koopmans, M.P. G. (2007). Gastroenteritis caused by norovirus GGII.4, the Netherlands, 1994–2005. *Emerging Infectious Diseases*, 13(1), 144–146.
196. Slomka MJ and Appleton H, 1998. Feline calicivirus as a model system for heat inactivation studies of small round structured viruses in shellfish. *Epidemiology and Infection*, 121, 401-407.



197. Smith DB, Purdy MA, Simmonds P: Genetic variability and the classification of hepatitis E virus. *J Virol* 2013, 87:4161-4169 <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02762-12>  
Analyses of HEV phylogenetic relationships using a variety of methods. This work can be helpful for the development of a consensus and evidence-based HEV classification and for the understanding of zoonotic sources of infection.
198. Sobsey, M., Shields, P., Hauchman, F., Davis, A., Rullman, V., and Bosch, A., 1988, Survival and persistence of hepatitis A virus in environmental samples, in: *Viral Hepatitis and Liver Disease* (A. Zuckermann, ed.), Alan Liss, New York, pp. 121–124.
199. Sommergruber, W., Zorn, M. Blaas, D., Fessler, F., Volkmann, P., Maurer-Fogy, I., Pallai, P., Merluzzi, V., Matteo, M. and Skern, T. 1989. Polypeptide 2A of human rhinovirus type 2: identification as a protease and characterization by mutational analysis. *Virology* 169: 68-77.
200. Springthorpe VS, Loh CL, Robertson WJ and Sattar SA, 1993. In situ survival of indicator bacteria, MS-2 phage and human pathogenic viruses in river water. *Water Sci Technol*, 27, 413-420.
201. Stals A, Uyttendaele M, Baert L and Van Coillie E, 2013. Norovirus transfer between foods and food contact materials. *Journal of Food Protection*, 76, 1202-1209
202. Statement on Food safety considerations of novel H1N1 influenza virus infections in humans. EFSA Panel on Biological hazards (BIOHAZ). <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1629.pdf>
203. Straub, T.M., Bentrup, K.H.Z., Orosz-Coghlan, P., Dohnalkova, A., Mayer, B.K., Bartholomew, R.A., Valdez, C.O., Bruckner-Lea, C.J., Gerba, C.P., Abbaszadegan, M., Nickerson, C.A., 2007. In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerging Infectious Diseases* 13, 396–403.
204. Stine SW, Song I, Choi CY and Gerba CP, 2005b. Effect of relative humidity on preharvest survival of bacterial and viral pathogens on the surface of cantaloupe, lettuce, and bell peppers. *J Food Prot*, 68, 1352-1358

205. Sugieda, M.; Nagaoka, H.; Kakishima, Y.; Ohshita, T.; Nakamura, S.; Nakajima, S. Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *Arch. Virol.* **1998**, *143*, 1215–1221.

206. Takahashi K, Kitajima N, Abe N & Mishiro S (2004) Complete or near-complete nucleotide sequence of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. *Virology* 330: 501–505.

207. Takahashi M, Okamoto H: Features of hepatitis E virus infection in humans and animals in Japan. *Hepatol Res* 2013 <http://dx.doi.org/10.1111/hepr.12175>.

Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, Reyes GR: Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 1991, 185:120-131.

208. Tamada Y, Yano K, Yatsushashi H, Inoue O, Mawatari F, Ishibashi H (2004) Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *J Hepatol* 40:869–870.

Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S (2003) Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 362:371–373.

209. Teunis PF, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, Baric RS, Le Pendu J, Calderon RL: **Norwalk virus: how infectious is it?** *Journal of medical virology* 2008, **80**(8):1468-1476. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#).

210. Thackray, L.B.; Wobus, C.E.; Chachu, K.A.; Liu, B.; Alegre, E.R.; Henderson, K.S.; Kelley, S.T.; Virgin, H.W. Murine noroviruses comprising a single genogroup exhibit biological diversity despite limited sequence divergence. *J. Virol.* **2007**, *81*, 10460-10473.

**211. Ticehurst, J. R., S. M. Feinstone, T. Chestnut, N. C. Tassopoulos, H. Popper, and R. H. Purcell.** 1987. Detection of hepatitis A virus by extraction of viral RNA and molecular hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **25**:1822–1829.

212. Totsuka, A. and Moritsugu, Y. 1999. Hepatitis A virus proteins. *Intervirology*. 42:63-68.
213. Toyoda, H., M.J. Nicklin, M.G. Murray, C.W. Anderson, J.J. Dunn, F.W. Studier, and E. Wimmer. 1986. A second virus-encoded proteinase involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein. *Cell* 45: 761-770.
214. Tumpey TM, Suarez DL, Perkins LE, Senne DA, Lee J, Lee YJ, Mo IP, Sung HW and Swayne DE, 2003. Evaluation of a high-pathogenicity H5N1 avian influenza A virus isolated from duck meat. *Avian Dis*, 47, 951-955.
215. Turcios, R.M., M.A. Widdowson, A.C. Sulka, P.S. Mead, and R.I. Glass. 2006. Reevaluation of epidemiological criteria for identifying outbreaks of acute gastroenteritis due to norovirus: US, 1998–2000. *Clinical Infectious Diseases* 42: 964–969.
216. USDA. 1999. U.S. Food Safety and Inspection Service, U.S. Department of Agriculture. Sanitation performance standards compliance guide. Available at: [http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/RDAD/FRPubs/San\\_Guide.pdf](http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/RDAD/FRPubs/San_Guide.pdf) . Accessed 2 Sep.2015.
217. Vasickova, P., Dvorska, L., Lorencova, A., & Pavlik, I. (2005). Viruses as a cause of foodborne diseases: a review of the literature. *Veterinárni medicína*, 50(3), 89-104.
218. Wei S., Walsh P., Huang R., To S.S.T. (2000): 93G, Novel sporadic strain of hepatitis E virus in South China isolated by cell culture. *Journal of Medical Virology*, 61, 311–318.
219. Wells, F.H., and Buzby, J.C. 2009. Dietary Assessment of Major Trends in U.S. Food Consumption. 1970–2005. EIB- 33 Economic Information Bulletin Number 33. Available at: <http://www.ers.usda.gov/Publications/EIB33/EIB33.pdf> . Accessed 20 Sep 2015

220. Wheeler, C., T.M. Vogt, G.L. Armstrong, G. Vaughan, A. Weltman, O.V. Nainan, V. Dato, G. Xia, K. Waller, J. Amon, T.M. Lee, A. Highbaugh-Battle, C. Hembree, S. Evenson, M.A. Ruta, I.T. Williams, A.E. Fiore, and B.P. Bell. 2005. An outbreak of hepatitis A associated with green onions. *The New England Journal of Medicine* 353: 890–897.
221. WHO (2008) WHO/HSE/EPR/2008.10 Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2009–2010. World Health Organisation. Geneva, Switzerland.
222. Wibawa ID, Muljono DH, Mulyanto, Suryadarma IG, Tsuda F, Takahashi M et al (2004) Prevalence of antibodies to hepatitis E virus among apparently healthy humans and pigs in Bali, Indonesia: Identification of a pig infected with a genotype 4 hepatitis E virus. *J Med Virol* 73:38–44.
223. Wichmann O, Schimanski S, Koch J, Kohler M, Rothe C, Plentz A, Jilg W, Stark K: Phylogenetic and case–control study on hepatitis E virus infection in Germany. *J Infect Dis* 2008, 198:1732-1741. This case–control study shows that HEV is endemic in Germany and that meat products are implicated in HEV zoonotic infections. The study indicates that pork products should be investigated to provide recommendations for preventive measures. 55
224. Williams TPE, Kasorndorkbua C, Halbur PG, Haqshenas G, Guenette DK, Toth TE et al (2001) Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J Clin Microbiol* 39:3040–3046.
- Wim HM Van der Poel, 2014, *Food and environmental routes of Hepatitis E virus transmission*, *Current Opinion in Virology*, 4:91–96
225. Wobus, C. E., Karst, S. M., Thackray, L. B., Chang, K. O., Sosnovtsev, S.V., Belliot, G., Krug, A., Mackenzie, J. M., Green, K. Y., and Virgin, H.W., 2004, Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol.* 2:e432. Available at [www.plosbiology.org](http://www.plosbiology.org).

226. Wooldridge M. 2007. A quantitative assessment of the risks from illegally imported meat contaminated with foot and mouth disease virus to Great Britain. *Risk Analysis* 27:187– 202.
227. World Health Organization (WHO). Hepatitis A vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec.* 2000;75:38–44.
228. Worm H.C., Schlauder G.G., Wurzer H., Mushahwar I.K. (2000): Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Austria: sequence, phylogenetic and serological analysis. *Journal of General Virology*, 81, 2885– 2890.
229. Worm H.C., Schlauder G.G., Wurzer H., Mushahwar I.K. (2000): Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Austria: sequence, phylogenetic and serological analysis. *Journal of General Virology*, 81, 2885– 2890.
230. Worm H.C., van der Poel W.H.M., Brandstatter G. (2002): Hepatitis E: an overview. *Microbes and Infection*, 4, 657–666.
231. ([www.codexalimentarius.net](http://www.codexalimentarius.net)) Accessed 25 Sep. 2015
232. ([www.coleacp.org/pip](http://www.coleacp.org/pip).) Accessed 29 Aug. 2015
233. (<http://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/pdfs/fsma-fact-sheet-508c.pdf> ) Accessed 4 Sep. 2015
234. ( <http://www.epa.gov>) Accessed 3 Sep. 2015
235. Yarbough P.O. (1999): Hepatitis E virus. *Intervirology*, 42, 179–184.
236. Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Sasaki N, Gotanda Y et al (2003) Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J Gen Virol* 84:2351–2357.
237. Zheng, D.P.; Ando, T.; Fankhauser, R.L.; Beard, R.S.; Glass, R.I.; Monroe, S.S. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* **2006**, 346, 312-323.

## Ελληνική βιβλιογραφία

238. Παναγιωτόπουλος Τ, Παπαμιχαήλ Δ, Σταύρου Δ, Λάγγας Δ, Γαβανά Μ, Σαλονικιώτη Α και συν. Εθνική μελέτη κατάστασης εμβολιασμού των παιδιών στην Ελλάδα, 2012. Αθήνα: Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας. 2013.