



Titill / Title	Veirur í matvælum og hraðvirkar greiningar á þeim		
Höfundar / Authors	Þóra Dögg Jörundsdóttir, Sigrún Guðmundsdóttir		
Skýrsla Rf /IFL report	05-00	Útgáfudagur / Date:	28.04.00
Verknr. / project no.	1467		
Styrktaraðilar / funding:	Tæknisjóður Rannsóknarráðs Íslands		
Ágrip á íslensku:	Matarsýkingar af völdum veira hafa verið vandamál í gegnum tíðina og virðast vera að aukast. Aukninguna má að mestu leyti rekja til breyttra neysluvenja en einnig er líklegt að ófullnægjandi greiningaraðferðir hafi áður komið í veg fyrir rétta greiningu. Aðferðir sem notaðar hafa verið eru bæði tímafrekar, kostnaðarsamar, með há greiningarmörk og geta ekki greint algengar veirur sem valda sýkingum. Undanfarið hafa orðið miklar framfarir í aðferðum til veirugreininga og þá sérstaklega í sameindafræðilegum aðferðum eins og PCR. Hér á landi hafa ekki farið fram rannsóknir á veirum í matvælum, en mikilvægt er að gera það til þess að öðlast skilning á útbreiðslu og smitleiðum þeirra. Í þessari skýrslu eru settar upp aðferðir til PCR-greininga á iðraveirum í skelfiski, matvöru s.s. áleggi, svo og sjó og vatni. Þar sem veirumagn í matvælum og umhverfissýnum er mjög lítið og magn PCR hindrandi efna mikið, voru aðferðir til þéttingar og hreinsunar á sýnunum sérstaklega skoðaðar.		
Lykilorð á íslensku:	Iðraveirur,veirur, skelfiskur, PCR		
Summary in English:	Foodborne viral diseases have been recognised as a problem for a long time and their prevalence seem to be increasing. The increase can be related to change of consuming habits but it is also likely that insufficient detection methods have hindered correct identification. The methods that have been used demand experience, are costly, time consuming and have high detection limit. Also they have not been able to detect many viruses that cause gastroenteritis. Recently there have been much improvement in diagnostic techniques for viruses, especially with molecular methods like PCR. In Iceland no research have been done on viruses in food, but it is necessary to gain understanding of infection routes and which food is most likely to cause infection. In this report protocols have been put together for identifying viruses in food and environmental samples. Since the number of viral particles is usually very low in these samples and the amount of PCR inhibitors high, emphasis was on concentration and purification techniques.		
English keywords:	Enteric viruses, viruses, shellfish, PCR		

1. INNGANGUR.....	2
2. GREINING VEIRA	4
2.1. ÚTDRÁTTUR OG ÞÉTTING	4
2.2. EINANGRUN ERFÐAEFNIS, VÍXLRITUN OG MÖGNUN.....	4
2.2.1. Víxlritun (RT) – Framkvæmd.....	5
2.2.2. PCR – Framkvæmd.....	6
3. TILLÖGUR AÐ AÐFERÐAFRÆÐI	8
3.1. SKELFISKUR.....	8
3.2. ÖNNUR MATVÆLI.....	9
3.3. SJÓR.....	10
3.4. VATN	11
4. SAMANTEKT	12
5. HEIMILDASKRÁ.....	13

1. Inngangur

Á undanförunum árum hafa augu manna í auknum mæli beinst að matarsýkingum af völdum veira. Lifrarbólgu-A sýkingar hafa lengi verið tengdar neyslu á vatni og skelfiski og eru landlægar víðsvegar um heiminn (Caul, 1993). Lifrarbólga hefur fyrst og fremst verið talin sjúkdómur vanþróaðri landa (Wolfe, 1991) og ekki álitin mikilvæg í iðnríkjum. Hún stingur þó alltaf upp kollinum þar öðru hverju og má nefna að á síðustu árum hafa komið upp faraldrar á Norðurlöndum, þar á meðal hjá skólabörnum í Finnlandi og Noregi 1997, og eru allar líkur taldar á að matvæli hafi valdið sýkingunum (Kukkula *et al.*, 1998). Á seinni árum hafa nýjar greiningaraðferðir leitt í ljós aðrar veirur sem meginorsakavald vatns- og fæðuborinna sýkinga. Síðan á áttunda áratugnum hafa tilfelli matvælatengdra iðrasýkinga af völdum iðraveira aukist. Þar eiga small, round, structured viruses (SRSV) eða svokallaðar Norwalk-like veirur (NLV) stóran hlut að máli (Wolfe, 1991; Kukkula *et al.*, 1998), en þær teljast til caliciveira sem sýkja menn (HuCV) og eru innan *Caliciviridae* fjölskyldunnar. Í Bretlandi er talið að yfir 90% matarsýkinga af völdum veira sé vegna NLV (Caul, 1993), í Bandaríkjunum 96% og í Hollandi var áætlað að allt að 91% sýkinga sem eru ekki af völdum baktería væru að völdum HuCV árið 1996 (Schwab *et al.*, 2000). Aðrar iðraveirur eru m.a. adenoveirur, rotaveirur, astroveirur og enteroveirur.

Faraldrar af völdum veira hafa verið tengdir neyslu á saurmenguðum skelfiski, ís, vatni, ýmsum tegundum af salati og köldum mat s.s. melónum, samlokum og skinku (Schwab *et al.*, 2000). Iðraveirur lifa og fjölga sér í þörmum manna og berast svo með saur út í skólpkerfið. Þar sem ekki er hægt að eyða veirum gjörsamlega í skólphreinsunarstöðvum berast þær út í umhverfið þar sem þær geta lifað í langan tíma. Þannig berast veirur út í ár, árósa og grunnsævi sem eru aðal uppeldisstöðvar skelfisks. Skelfiskur tekur upp næringu með því að sía mikið magn af vatni og þannig safnast næringarefnin fyrir og einnig bakteríur og veirur sem geta verið í allt að þúsundföldu magni í holdinu miðað við umhverfið (Caul, 1993; Häfliger, 1997; Jaykus *et al.*, 1994; Wolfe, 1991). Hingað til hefur ekki verið hægt að hafa almennt eftirlit með veirumengun vegna skorts á góðum aðferðum til þess að greina veirur í skelfiski og öðrum matvælum (Lees *et al.*, 1995). Aðferðir sem notaðar hafa verið, byggja á því að rækta veirurnar í frumum og þó þetta sé eina aðferðin sem sýnir fram á sýkjanleika veiranna er hún seinleg og erfið í framkvæmd og niðurstöður fást ekki fyrr en eftir nokkrar vikur. Auk

Þess hefur verið erfitt að rækta veirur sem valda iðrasýkingum þar sem margar þeirra s.s. NLV vaxa illa eða ekki í frumurækt (Traore *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 1996). Aðrar aðferðir sem notaðar hafa verið, eru aðferðir sem byggja á rafeindasmásjárlitun, ónæmisfræði og einnig kjarnsýru-hybridization. Rafeindasmásjárlitunin er seinleg eins og frumuræktunin, dýr og krefst sérfræðikunnáttu. Þessar aðferðir geta heldur ekki greint lítið magn af veirum og koma því að takmörkuðum notum þegar greina á matvæli, þar sem magn veira er mun minna en í saursýnum. Veirur fjölga sér ekki í matvælum, en allar líkur benda til þess að mjög lítið magn af caliciveirum þurfi til þess að valda sýkingum. Með nýjum sameindafræðilegum aðferðum eins og RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) og þekkingu á erfðamengi veira s.s. Norwalk-like og skyldra veira, er í dag hægt að greina mjög lítið magn af veirum (Caul, 1991). Einnig stýttist greiningartíminn úr nokkrum vikum niður í einn til þrjá daga. Með þessum nýju aðferðum hefur verið hægt að tengja matarsýkingar við neyslu á skelfiski og skráð eru nokkuð mörg tilfelli af faröldrum sem tengjast neyslu á HuCV menguðum skelfiski, soðnum eða hráum (Guyader *et al.*, 1996; Lees *et al.*, 1995; Schwab, 2000).

Sýkingar af völdum HuCV hafa einnig orðið til vegna þess að sýktir einstaklingar eru að meðhöndla matvæli t.d. við samloku- eða salatgerð (Schwab, 2000). Veirur eru einnig bendlaðar við sýkingar eftir sund í sundlaugum og sjó, svo og eftir drykkju á vatni úr vatnsbólum sem hafa verið talin örugg eftir bakteríustöðlum (Jaykus *et al.*, 1994). Þær aðferðir sem notaðar eru í dag til þess að meta gæði skelfisks, drykkjar- og baðvatns byggja á bendi-örverum (bakteríum) en rannsóknir hafa sýnt að þær gefa ekki vísbendingu um hvort iðraveirur eru til staðar. (Bèril *et al.*, 1996; Croci *et al.*, 2000; Pina *et al.*, 1998; Schwab, 1996). Einnig hefur verið sýnt fram á að þær heinsunaraðferðir sem notaðar eru á skelfisk, þó þær séu áhrifaríkar á bakteríur, duga ekki eins vel á veirur (Häfliger, 1997). Matarsýkingar hafa þannig verið raktar til neyslu á skelfiski sem var ræktaður í vatni sem uppfyllti heilbrigðiskröfur (Cromeans *et al.*, 1997). Nauðsynlegt er því að þróa og setja upp fljótvirkar aðferðir til þess að greina veirur. Í dag býður mögnun erfðaefnis með PCR upp á mestu möguleikana. Þetta er fljótvirk, sértæk og næm aðferð sem fræðilega séð getur greint allt niður í eina veirueiningu (Rosenfield *et al.*, 1999). Nokkrir erfiðleikar hafa þó verið við að nota PCR á flókin sýni s.s. skelfisk og önnur matvæli vegna mikils magns af óskilgreindum efnum sem hindra aðferðina. Einnig hefur það valdið vandamálum að oftast er um mjög lítið veirumagn að ræða í matvælum

og umhverfissýnum, sem leiðir til þess að það þarf að þétta þau úr miklu rúmmáli (Lees *et al.*, 1994). Um leið og sýnið er þétt, þéttast einnig þessi hindrandi efni og hindra þannig mögnun erfðaefnisins.

2. Greining veira

2.1. Útdráttur og þétting

Til þess að einangra veirur úr skelfiski hafa tvær leiðir reynst áhrifaríkar: Útdráttur-þétting (extraction-concentration) og ásog-þvottur-þétting (adsorption-elution-concentration). Með útdráttaraðferðinni eru veirur losaðar úr sýninu með notkun virkra efna og stillingu sýrustigs. Veirurnar eru síðan aðskildar frá sýninu með síun og/eða skiljun. Flotið með veirunum þarfnast síðan frekari hreinsunar og þéttingar og hafa ýmsar aðferðir verið prófaðar s.s. polyelectrolyte flocculation, sýruútfelling, notkun ultra-skilvindu, ultra-síun, etherútdráttur ofl. Með ásogaðferðinni eru sýni gerð einsleit (í tættara) við aðstæður sem ýta undir ásog veiranna á vef. Það er yfirleitt gert með því að stilla sýrustig. Vefurinn er síðan aðskilinn með skiljun og veirurnar losaðar frá vefnum með lausnum sem hafa ákveðið saltinnihald og sýrustig. Önnur skiljun skilur svo flotið frá hratinu og það er síðan hreinsað og þétt með ýmsum aðferðum eins og áður var lýst fyrir útdrátt-þéttingu. Niðurstöðum úr samanburðarprófum á aðferðum hefur ekki borið saman og því er engin ein aðferð sem hefur yfirburði yfir aðra þegar snýr að heimtum veira úr skelfisksholdi. Heimtur geta verið mjög breytilegar og hafa ýmsir þættir s.s. tegund skelfisks, veirutegund og magn mengunar áhrif á niðurstöður. Talið er skynsamlegast að velja aðferð eftir skelfiskstegund þar sem aðferð sem gildir fyrir eina tegund er í sumum tilfellum ekki nýtanleg fyrir aðrar tegundir (Häfliger *et al.*, 1997; Jaykus *et al.*, 1994).

2.2. Einangrun erfðaefnis, víxlritun og mögnun

Eftir útdrátt á veirunum er erfðaefni veiranna einangrað. Flestar veirur sem valda iðrakveisu eru RNA veirur og þarf að einangra það til áframhaldandi greiningar. Lausnin er svo hreinsuð enn frekar og þétt. Til eru nokkrar aðferðir til þessa að losa kjarnsýrur úr veirum, þar á meðal sérstök hreinsiefni, hljóðbylgjur, frysting-þíðing og hitun (Greenfield *et al.*, 1993). Í dag er einnig hægt að kaupa sérstök “kit” til verksins. Þegar búið er að

einangra RNA er það afritað með víxlritun (reverse transcription) í cDNA sem er síðan magnað með viðeigandi “prímerum”, venjulega í 30-50 hringi. Afurðirnar eru svo greindar með rafdrætti. Til þess að auka næmni og sérhæfni er mælt með því að nota “southern blot hybridization” til þess að staðfesta niðurstöðurnar. Þannig er hægt að koma í veg fyrir fölsk-jákvæð svör, sem geta verið vegna mengunar eða sjónræn mistúlkun við aflestur á rafdráttargelinu (Atmar *et al.*, 1996; Schwab *et al.*, 2000). Önnur og vinsæl leið til þess að auka næmni er kölluð “nested” PCR. Þá er fyrsta mögnunin gerð með einu “prímer” pari í 15-30 hringi. Afurðin úr þessari umferð er svo keyrð aftur í 15-30 hringi með öðru “prímer” pari sem er sérhæft fyrir innri raðir sem voru magnaðar með fyrri parinu. Nested-PCR hefur bæði kosti og galla. Kostirnir eru að næmnin er mjög mikil og hægt er að greina allt niður í eina veirueiningu án þess að þurfa að staðfesta niðurstöðurnar með hybridization, því seinni umferðin staðfestir í raun mögnun fyrri umferðarinnar. Einnig verður þynning á hindrandi efnum þegar afurð fyrri umferðarinnar er keyrð aftur þannig að oft kemur í ljós að sýnið inniheldur veirur þó fyrri umferð hafi verið neikvæð. Mesti gallinn á þessari aðferð er hinsvegar að mikil hætta er á krossmengun þar sem opna þarf tilraunaglösin milli umferða. Því þarf að gera ýmsar varúðarráðstafanir svo sem að framkvæma ákveðna hluta aðferðarinnar í aðskildum herbergjum og nota neikvæðan staðal (De Medici *et al.*, 1998; Persing, 1993). Nýlega hefur verið lýst aðferð þar sem ekki þarf að opna tilraunaglösin milli umferða eða svokölluð “one-tube” PCR. Notað er hitaþolið ensím sem getur bæði framkvæmt víxlritun og DNA-polymerasa virkni í sama buffernum (Cook *et al.*, 1999). Sú aðferð er ákjósanleg þar sem ekki er hætta á mengun.

2.2.1. Víxlritun (RT) – Framkvæmd

RNA er öfug afritað þannig að 10 μL^1 af einangruðu RNA er hitað í 1 klst. við 41°C og þvínæst í 5 mín. við 95°C. Lokarúmmál er 20 μL og hvarfblandan samanstendur af: 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, 0,5 mM dNTP, 1,25 μM antisens prímer (sjá töflu 1, EV03, HAV4, SRI-1 og SRII-1), 10 U Rnasin (Promega) og 100 U M-MLV reverse transcriptase (Promega) (Gilgen *et al.*, 1997).

¹ Magn þarf að aðlaga

2.2.2. PCR – Framkvæmd

Upplýsingar um ólígónúkleótíð og aðstæður er að finna í töflum 1 og 2. RT hvarfblöndunni (20 µL) er blandað saman við 80 µL af PCR blöndu. Lokastyrkir eiga að vera 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 0,1% Triton-X-100, 2 µg/mL BSA, 200 µM dNTP, 2 U af *Taq* polymerasa (Promega), 0,25 µM af fyrsta prímer parinu og MgCl₂ í viðeigandi styrk (sjá töflu 2). Fyrir nested PCR eru notaðir 2 µl af fyrra hvarfinu. Upplýsingar um viðeigandi prímera eru í töflu 1. Styrkur prímeranna er 0,5 µM. Keyrsla: 1 mín. við 94°C og því næst 25 hringir við 94°C í 30 s., annealing í 30 s. (sjá viðeigandi hitastig í töflu 2) við 72°C í 1 mín. Keyrslan er eins fyrir fyrstu og aðra umferð (nested) nema að í annari umferð er keyrt í 40 hringi. Í lokin er svo framlengingaskref í 3 mín. við 72°C (Gilgen *et al.*, 1997).

Tafla 1. Ólígónúkleótíð prímerar (Gilgen *et al.*, 1997)

Veirutegund og ólígónúkleótíð	Svæði	* Röð 5' → 3'	Staðsetning
<i>Enteroveirur</i> EV03 EV05 EV06	5' UTR	ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA CAC GGA CAC CCA AAG TA CAA GCA CTT CTG TTT CCC CGG	601-582 563-547 161-184
<i>Hepatitis A veira</i> HAV1 HAV2 HAV3 HAV4	3D	TTT GGT TGG ATG AAA ATG GTT CAA CCT GTC CAA AAG ATG AAT ACC AAC ATC TCC GAA TCT TA ATT CTA CCT GCT TCT CTA ATC	6305-6325 6416-6436 6648-6629 6716-6696
<i>SRSV genahópur I</i> SRI-1 SRI-2 SRI-3	Hylki	CCA ACC CAR CCA TTR TAC AT AAA TGA TGA TGG CGT CTA AAA AYR TCA CCG GKG GTA T	5659-5640 5344-5361 5584-5566
<i>SRSV genahópur II</i> SRII-1 SRII-2 SRII-3	RNA pol	CGC CAT CTT CAT TCA CAA A TWC TCY TTY TAT GGT GAT GAT GA TTW CCA AAC CAA CCW GCT G	5357-5339 4844-4866 5046-5028

* W = A/T, Y = C/T, K = G/T, R = A/G

Tafla 2. Breytur fyrir PCR-kerfi (Gilgen *et al.*, 1997).

Veirutegund	Prímer-par	Annealing hitastig	Styrkur MgCl ₂	Lengd búta
Enteroveirur	EV03/EV06	55°	3,5 mM	438 bp
	EV05/EV06	55°	3,0 mM	400 bp
Hepatitis A veira	HAV4/HAV1	55°	3,0 mM	412 bp
	HAV3/HAV2	55°	2,5 mM	233 bp
SRSV gh.I	SRI-1/SRI-2	50°	3,5 mM	316 bp
	SRI-3/SRI-2	50°	2,0 mM	241 bp
SRSV gh.II	SRII-1/SRII-2	55°	3,5 mM	514 bp
	SRII-3/SRII-2	50°	1,5 mM	203 bp

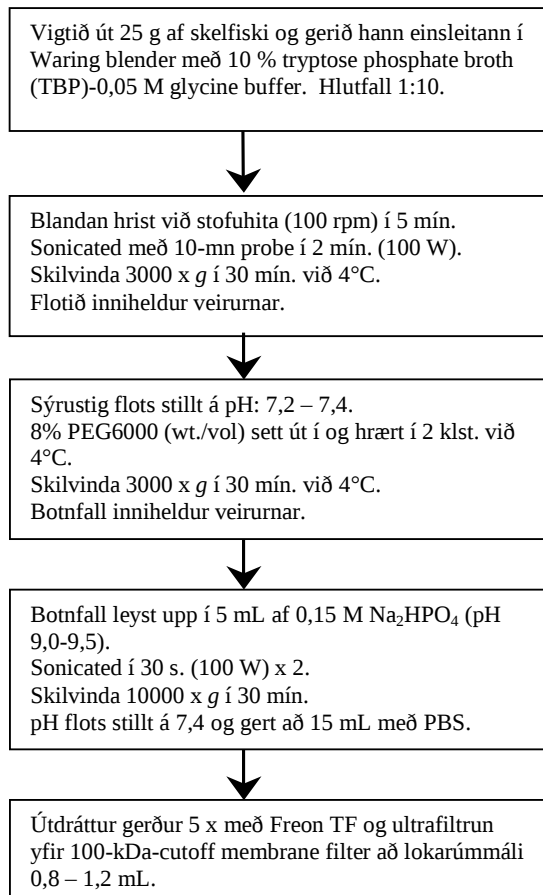
3. Tillögur að aðferðafræði

3.1. Skelfiskur

Aðferð 1:

Greining á SRSV í krækling og ostrum (Green *et al.*, 1998)

Byggir á aðferð Lewis og Metcalf

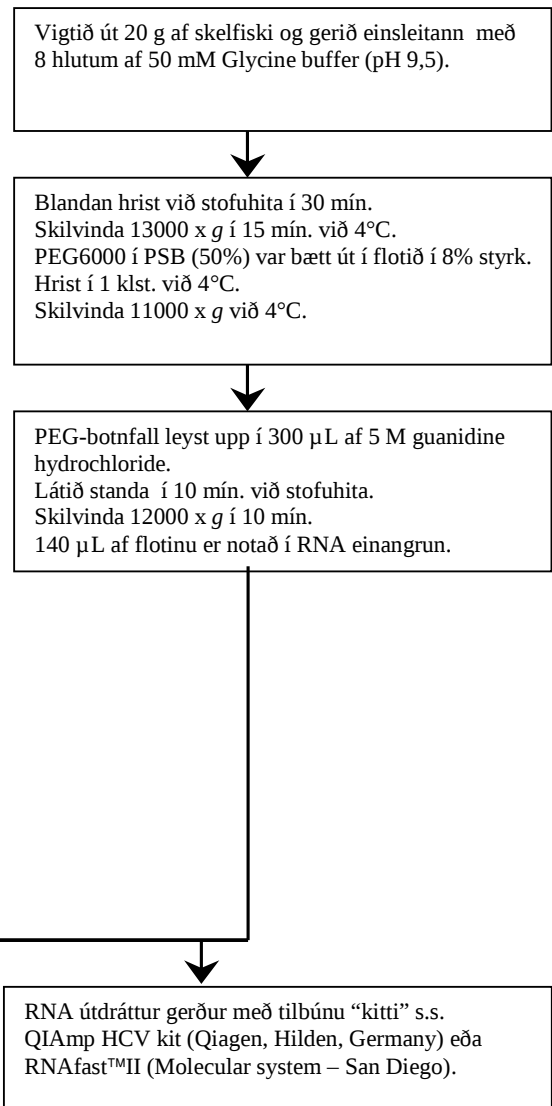


One tube PCR: RNA útdráttur, RT og PCR í einu skrefi (Cook *et al.*, 1999). RNA losað með hitun og hitaþolið ensím notað til öfugrar afritunar. Hvarfblanda fyrir HAV²: 25 µL flöt + 1 x EZ buffer, 2,0 mM Mn(Oac)₂, 100 µM dNTP, 1,25 U *rTth* og 0,5 µM af viðeigandi primerum (sjá töflu 1). Hitameðferð fyrir HAV var eftirfarandi: 1 mín. við 94°C (Hylki rofið), 45 mín. við 60°C (víxlritun), 1mín. við 94°C (upphaflegt cDNA afmyndað). Því næst 40 hringir við 94°C í 45 s og 55°C í 45 s. Loka framlenging við 72°C í 7 mín. Geymt við 4°C. Rafdregið á 1% agarose geli lituðu með ethium bromide.

Aðferð 2:

Greining á SRSV og iðraveirum í krækling, ostrum og rækjum

(Häfliger *et al.*, 1997)



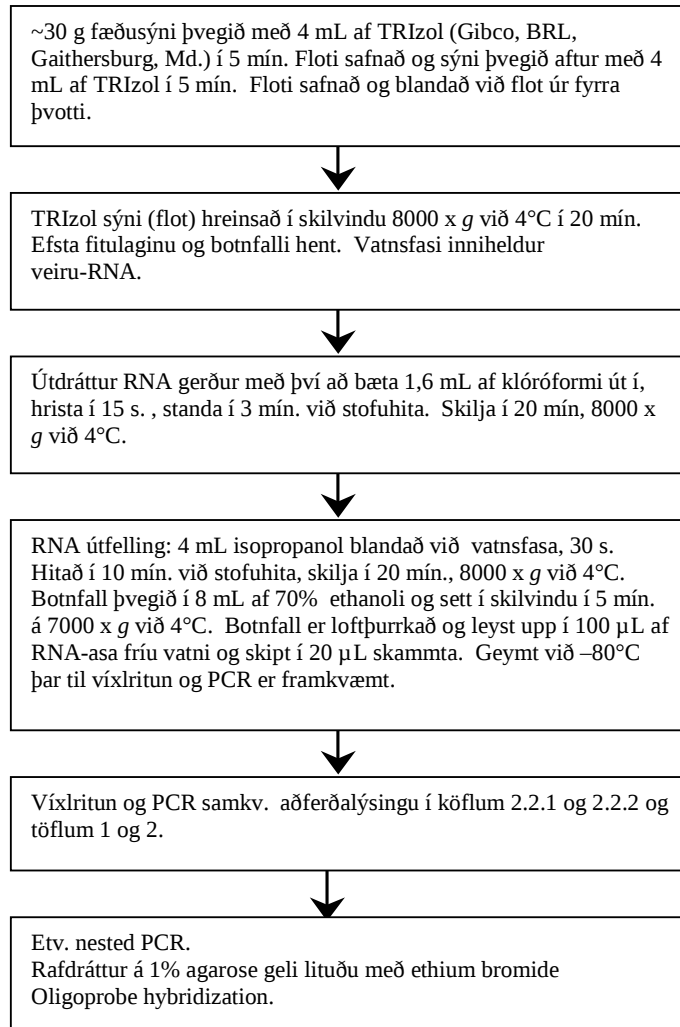
RNA útdráttur gerður með tilbúnu "kitti" s.s. QIAamp HCV kit (Qiagen, Hilden, Germany) eða RNAfast™II (Molecular system – San Diego).

Reverse transcription og PCR/Nested PCR með viðeigandi efnum og primerum, sjá aðferða-lýsingu í köflum 2.2.1 og 2.2.2 og töflur 1 og 2. Rafdregið á 1% agarose geli lituðu með ethium bromide.

² Magn hvarfefna og hitameðferð er mismunandi eftir því hvaða veiru er verið að magna, sjá heimild.

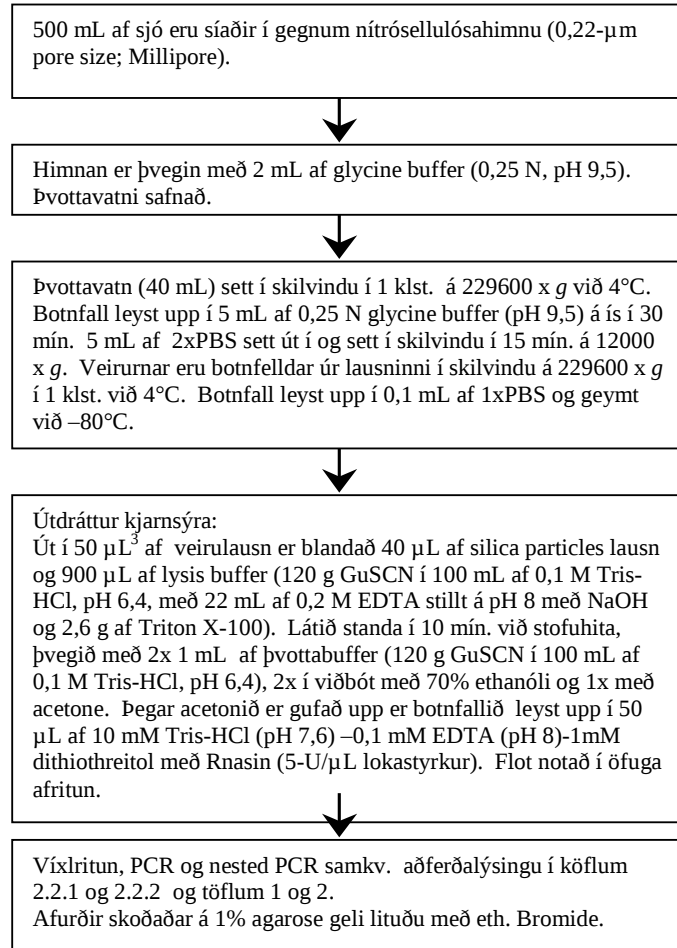
3.2. Önnur matvæli

Greining á SRSV og HAV í matvælum s.s. áleggi, pylsum ofl. (Schwab *et al.*, 2000)



3.3. Sjór

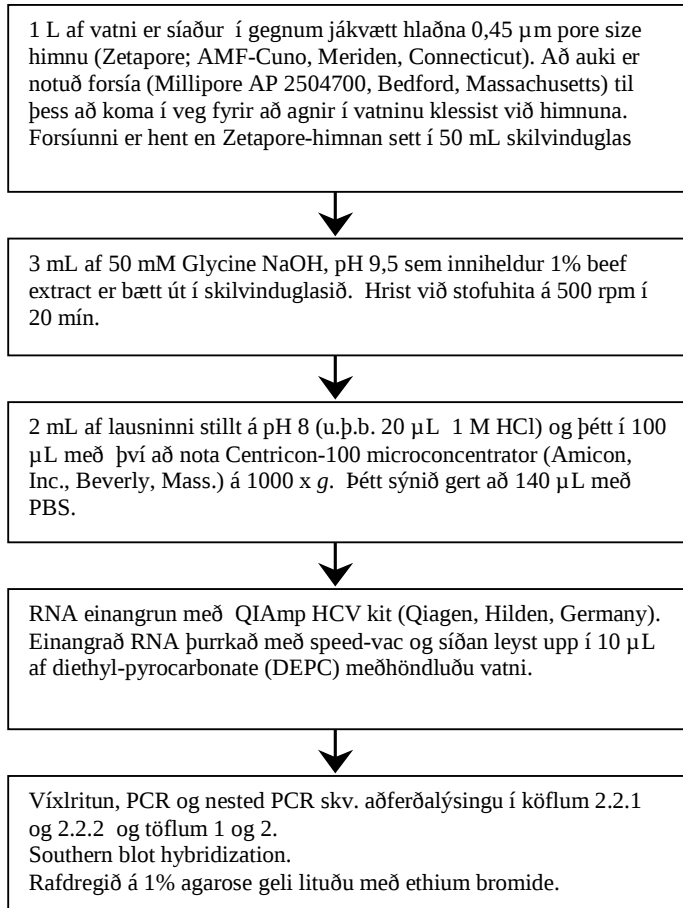
Greining á enteroveirum (EV) og hepatitis A veirum (HAV) í sjó (Pina *et al.*, 1998)



³ Magn miðað við skólpsýni. Gæti þurft að aðlagja það sjósýnum

3.4. Vatn

Greining á EV, HAV og SRSV í vatnssýnum (Gilgen et al., 1997)



4. Samantekt

Matarsýkingar af völdum veira hafa verið vandamál í gegnum tíðina og virðast vera að aukast. Aukningu á tíðni sýkinga má sennilega rekja til breyttra neysluvenja. Fólk kaupir meira unnin matvæli og tilbúinn mat á skyndibitastöðum. Framleiðsluaðilar eru oft mjög stórir og framleiðsla þeirra nær því til fjölda fólks. Hitun matvælna er mjög oft ábótavant, og þar að auki eru caliciveirur taldar mjög hitaþolnar, og því þarf ekki að sökum að spyrja ef matvæli mengast í framleiðsluferlinum, eða ef hráefnið er mengað. Einnig má vera að vegna ófullnægjandi greiningaraðferða, hafi matarsýkingar af völdum veira verið vanmetnar og aukningin nú sé að hluta til vegna nýrri og betri aðferða. Þó að vandamálið hafi verið þekkt, virðist vera sem fólk sé fyrst núna að átta sig á alvarleika þess. Aukin krafa um að veirur séu rannsakaðar í matvælum hefur leitt til þess að mikil þróun hefur orðið í aðferðum til veirugreininga. Sérstaklega hafa framfarir verið miklar í sameindafræðilegum aðferðum s.s. PCR. PCR er mjög næm aðferð, sértæk og sparar mikinn vinnutíma. Greining veira í umhverfinu með PCR er þó nokkrum takmörkunum háð, þar sem við getum ekki vitað hvort veirurnar í sýninu eru sýkjandi eða ekki, eða jafnvel hvort verið er að greina RNA úr dauðum veirum. Rannsóknir hafa þó sýnt að óbundið RNA sem hefur losnað úr frumum getur horfið á nokkrum mínútum eftir að það kemur út í vatn, sem bendir til þess að jákvæðar PCR niðurstöður séu vegna nærveru lifandi og hugsanlega sýkjandi veira (Limsawat *et al.*, 1997). Jákvætt PCR er þó alltaf vísbending um að saurmengun hafi átt sér stað þar sem þær veirur sem mældar eru lifa og fjölga sér einungis í þörmum manna. Hér á landi hafa ekki farið fram rannsóknir á veirum í matvælum, en veirur í mönnum hafa verið greindar á Rannsóknarstofu Landspítalans í veirufræði með PCR tækni. Mjög mikilvægt er að rannsaka tilvist veira í matvælum og umhverfissýnum til þess að öðlast skilning á útbreiðslu og smitleiðum þeirra og þannig öðlast vitneskju um hvaða matvæli það eru sem helst valda sýkingum. Einnig er gagnlegt að til séu hraðvirkar greiningaraðferðir ef upp kemur faraldur sem tengdur er veirum í matvælum. Aðstaðan og tækjakosturinn til PCR mælinga er til staðar á Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins og þær aðferðir sem settar hafa verið upp í þessari skýrslu miða við að hægt sé að framkvæma mælingarnar þar. Þær eru einnig valdar m.t.t. skelfiskstegundar, en vert er að taka fram að þessar aðferðir þarf að aðlagja íslenskum skelfiski og rannsóknaraðstöðu hér.

5. Heimildaskrá

Atmar, R.L., Neill, F.H., Woodley, C.M., Manger, R., Fout, G.S., Burkhardt, W., Leja, L., McGovern E.R., Le Guyader, F., Metcalf. T.G., Estes, M.K. 1996. Collaborative Evaluation of a Method for Detection of Norwalk Virus in Shellfish Tissues by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 254-258.

Bagge, L., von Bonsdorff, C.H., Georgsson, F., Rimstad, E., Svensson, L., Ørstavik, I. 1998. II Nordic Workshop on Viruses and Water and Food: Control and surveillance of water- and food-borne viral infections, ed. M. Kukula. TemaNord: 549. Copenhagen: Nordic Council of Ministers.

Bèril, C., Crance. J.M., Le Guyader, F., Apaire-Marchais, V., Leveque, F., Albert, M, Goragner, M.A., Schwartzbrod, L., Billaudel, S. 1996. Study of Viral and Bacterial Indicators in Cockles and Mussels. *Marine Pollution Bulletin.* **32**: 404-409.

Caul, E.O. 1993. Viruses in food. Í *Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology*, ed. R.C. Spencer, E.P. Wright, S.W.B. Newsom, bls. 347-354.

Chung, H., Jaykus, L-A., Sobsey, M. 1996. Detection of Human Enteric Viruses in Oysters by In Vivo and In Vitro Amplification of Nucleic Acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3772-3778.

Cook, N., Kurdziel, A.S., Hays, J.P., Gordon, S.H., Donald, B.J., Myint, S.H. 1999. A one-tube nucleic acid extraction and amplification (ERTPCR) method for detecting RNA viruses. *J. Rapid Meth. and Autom. in Microbiol.* **7**: 61-68.

Croci, L., De Medici, D., Scalfaro, C., Fiore, A., Diviza, M., Donia, D., Cosentino, A.M., Moretti, P., Costantini, G. 2000. Determination of enteroviruses, hepatitis A virus, bacteriophages and *Escherichia coli* in Adriatic Sea mussels. *J. Appl. Microbiol.* **88**: 293-298.

Cromeans, T.L., Nainan, O.V., Margolis, H.S. 1997. Detection of Hepatitis A Virus RNA in Oyster Meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2460-2463.

Gilgen, M., Germann, D., Lüthy, J., Hübner, Ph. 1997. Three-step isolation method for sensitive detection of enterovirus, hepatitis A virus, and small round structured viruses in water samples. *Int. J. Food Microbiol.* **37**: 189-199.

Green, J., Henshilwood, K., Gallimore, C.I., Brown, D.W.G., Lees, D.N. 1998. A Nested Reverse Transcriptase PCR Assay for Detection of Small Round-Structured Viruses in Environmentally Contaminated Molluscan Shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 858-863.

Greenfield, L., White, T.J. 1993. Sample preparation methods. Í *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*, ed. D.H. Persing, T.F. Smith, F.C. Tenover, T.J. White, bls. 122-137. Washington: American Society for Microbiology.

- Le Guyader, F., Neill, F.H., Estes, M.K., Monroe, S.S., Ando, T., Atmar, R.L.** 1996. Detection and analysis of a small round-structured virus strain in oysters implicated in an outbreak of acute gastroenteritis. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:4268-4272.
- Häfliger, D., Gilgen, M., Lüthy, J., Hübner, Ph.** 1997. Seminested RT-PCR systems for small round structured viruses and detection of enteric viruses in seafood. *Int. J. Food Microbiol.* **37**:27-36.
- Jaykus, L-A., Hemard, M.T., Sobsey, M.D.** 1994. Human Enteric Pathogenic Viruses. *Environmental Indicators and Shellfish Safety*, ed. C.R. Hackney, M.D. Pierson, bls. 92-153. New York, London: Chapman & Hall.
- Lees, D.N., Henshilwood, K., Green, J., Gallimore, C.I., Brown, D.W.G.** 1995. Detection of a Small Round Structured Viruses in Shellfish by Reverse Transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 4418-4424.
- Lees, D.N., Henshilwood, K., Doré, W.J.** 1994. Development of a Method for Detection of Enteroviruses in Shellfish by PCR and with Poliovirus as a Model. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2999-3005.
- Limsawat, S., Ohgaki, S.** 1997. Fate of Liberated Viral RNA in Wastewater Determined by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2932-2933.
- De Medici, D., Beneduce, F., Fiore, A., Scalfaro, C., Croci, L.** 1998. Application of reverse transcriptase-nested-PCR for detection of poliovirus in mussels. *Int. J. Food Microbiol.* **40**: 51-56.
- Persing, D.H.** 1993. Sample preparation methods. *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*, ed. D.H. Persing, T.F. Smith, F.C. Tenover, T.j. White, bls. 51-87. Washington: American Society for Microbiology.
- Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J., Girones, R.** 1998. Viral Pollution in the Environment and in Shellfish: Human Adenovirus Detection by PCR as an Index of Human Viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3376-3382
- Rosenfield S.I., Jaykus, L-A.** 1999. A multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Method for the Detection of Foodborne Viruses. *J. Food Prot.* **62**: 1210-1214.
- Schwab, K.J., Neill, F.H., Frankhauser, R.L., Daniels, N.A., Monroe, S.S., Bergmire-Sweat, D.A., Estes, M.K., Atmar, R.L.** 2000. Development of Methods To Detect "Norwalk-like Viruses" (NLVs) and Hepatitis A virus in Delicatessen Foods: Application to a Food-Borne NLV Outbreak. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 213-218.
- Schwab, K.J., De Leon, R., Sobsey, M.D.** 1996. Immunoaffinity Concentration and Purification of Waterborne Enteric Viruses for Detection by Reverse Transcriptase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2086-2094.

Traore, O., Arnal, C., Mignotte, B., Maul, A., Laveran, H., Billaudel, S., Schwartzbrot. 1998. Reverse Transcriptase PCR Detection of Astrovirus, Hepatitis A virus, and Poliovirus in Experimentally Contaminated Mussels: Comparision of Several Extraction and Concentration Methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3118-3122.

Varnam, A.H., Evans, M.G. 1991. Foodborne viral infections. Í *Foodborne pathogens: An illustrated text*, bls.363-372. England: Wolfe Publishing Ltd.