

**Bilan** des connaissances  
relatives aux **virus**  
transmissibles à **l'homme**  
par voie orale



AGENCE FRANÇAISE  
DE SÉCURITÉ SANITAIRE  
DES ALIMENTS



AGENCE FRANÇAISE  
DE SÉCURITÉ SANITAIRE  
DES ALIMENTS

## **Bilan des connaissances relatives aux virus transmissibles à l'homme par voie orale**

---

Février 2007

■ **Coordination scientifique et rédactionnelle / *Scientific and drafting coordination***

Coralie Bultel

Laurent Grimault

## Sommaire simplifié

---

Liste des sigles et acronymes .....	14
Glossaire .....	18
Composition et fonctionnement du groupe de travail .....	24
Résumé du rapport .....	27
Summary of the report .....	35
Introduction.....	43
Question 1 : Quelles sont les données scientifiques les plus actualisées concernant le risque lié à la contamination des denrées alimentaires et des eaux de consommation par les virus entériques ? .....	45
Question 2 : Quel est le cadre réglementaire actuel, national et international, concernant les virus dans les aliments (denrées et eaux de consommation) ? .....	81
Question 3 : Comment interpréter la présence de génome viral dans des matrices alimentaires et en milieu hydrique en termes d'infectiosité potentielle ? .....	95
Contamination virale des aliments et de l'eau : logigramme d'interprétation d'un résultat positif par les techniques de biologie moléculaire .....	123
Question 4 : Quels sont les risques sanitaires liés aux possibles sources et réservoirs environnementaux de ces virus ? .....	139
Question 5 : Quels sont les moyens mis en oeuvre dans l'industrie agroalimentaire pour maîtriser le danger viral (HACCP, qualité...) ? - Quel est l'impact des différents procédés utilisés en industrie agroalimentaire sur ce danger ? .....	185
Question 6 : Quel est l'impact des mesures prises aux différentes étapes de production et de distribution d'eau des réseaux publics sur la maîtrise du danger viral ? .....	201
Question 7 : Quels systèmes de détection de situation d'alerte existent et quelles investigations en situation d'alerte ? .....	231
Question 8 : Quels sont les résultats de l'analyse des publications dans le domaine de l'appréciation quantitative des risques alimentaires liés aux virus ? .....	245
Question 9 : Quels sont les pré-requis à l'élaboration d'une stratégie d'échantillonnage d'eau et d'aliments pour évaluer une contamination virale, au regard d'une approche d'AQR ? .....	287
Conclusions : Points clés des recommandations et axes de recherche.....	317
Points clés des recommandations .....	317
Axes de recherche et perspectives .....	320
Annexes .....	323



## Sommaire détaillé

---

<b>Liste des sigles et acronymes</b> .....	<b>14</b>
<b>Glossaire</b> .....	<b>18</b>
<b>Composition et fonctionnement du groupe de travail</b> .....	<b>24</b>
Composition du groupe de travail .....	24
Personnalités consultées par le groupe de travail et relecteurs du rapport .....	24
Structures auditionnées par le groupe de travail le 21 juin 2004 et structures destinataires du courrier d'enquête sur la sensibilisation des industriels de l'agroalimentaire à la problématique virale (janvier-juin 2005) .....	25
Répartition des contributions .....	26
<b>Résumé du rapport</b> .....	<b>27</b>
<b>Summary of the report</b> .....	<b>35</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>43</b>
Contexte et justification du projet .....	43
Objectifs du groupe de travail .....	43
Composition du groupe de travail .....	44
Fonctionnement du groupe de travail .....	44
<b>Question 1 : Quelles sont les données scientifiques les plus actualisées concernant le risque lié à la contamination des denrées alimentaires et des eaux de consommation par les virus entériques ? .....</b>	<b>45</b>
Introduction .....	48
Classification introductionnelle .....	49
Virus de l'hépatite A .....	51
1. Nature et habitat .....	51
2. Maladie .....	51
3. Rôle des aliments .....	52
4. Hygiène domestique .....	55
5. Liens .....	55
Virus de l'hépatite E .....	55
1. Nature et habitat .....	55
2. Maladie .....	55
3. Rôle des aliments .....	56
4. Hygiène domestique .....	58
5. Liens .....	58
Norovirus .....	58
1. Nature et habitat .....	58
2. Maladie .....	58
3. Rôle des aliments .....	59
4. Hygiène domestique .....	61
5. Liens .....	61
Sapovirus .....	61
1. Nature et habitat .....	61
2. Maladie .....	61
3. Rôle des aliments .....	62
4. Hygiène domestique .....	63
5. Liens .....	63

Rotavirus.....	64
1. Nature et habitat.....	64
2. Maladie.....	64
3. Rôle des aliments.....	65
4. Hygiène domestique.....	67
5. Liens.....	67
Astrovirus.....	67
1. Nature et habitat.....	67
2. Maladie.....	67
3. Rôle des aliments.....	68
4. Hygiène domestique.....	69
5. Liens.....	69
Adénovirus.....	70
1. Nature et habitat.....	70
2. Maladie.....	70
3. Rôle des aliments.....	71
4. Hygiène domestique.....	72
5. Liens.....	72
Réovirus.....	72
1. Nature et habitat.....	72
2. Maladie.....	73
3. Rôle des aliments.....	73
4. Hygiène domestique.....	74
5. Liens.....	74
Entérovirus.....	75
1. Nature et habitat.....	75
2. Maladie.....	75
3. Rôle des aliments.....	76
4. Hygiène domestique.....	77
5. Liens.....	77
Paréchovirus.....	78
1. Nature et habitat.....	78
2. Maladie.....	78
3. Rôle des aliments.....	79
4. Hygiène domestique.....	80
5. Liens.....	80
Conclusion.....	80
<b>Question 2 : Quel est le cadre réglementaire actuel, national et international, concernant les virus dans les aliments (denrées et eaux de consommation) ?</b> .....	<b>81</b>
A. État des lieux et perspectives concernant la réglementation relative aux virus dans les eaux destinées à la consommation humaine.....	84
A.1 - Réglementation concernant les virus dans les eaux de consommation.....	84
A.2 - Évolution par rapport à la précédente réglementation (appliquée depuis le 25 décembre 2003).....	89
B. État des lieux et perspectives concernant la réglementation relative aux virus dans les aliments.....	90
B.1 - Réglementation concernant les virus dans les aliments.....	90
B.2 - Quelles perspectives réglementaires ?.....	93
<b>Question 3 : Comment interpréter la présence de génome viral dans des matrices alimentaires et en milieu hydrique en termes d'infectiosité potentielle ?</b> .....	<b>95</b>
A. Décrire et évaluer les techniques disponibles pour la détection des virus dans l'eau et dans les denrées alimentaires.....	98
A.1 - Techniques de concentration des virus à partir d'eaux.....	98
A.2 - Techniques d'extraction/concentration des virus à partir de coquillages ou d'aliments.....	100
A.3 - Description des techniques de détection des virus adaptées à l'eau et aux aliments.....	103
A.4 - Évaluation des techniques.....	109

B. Techniques moléculaires appliquées à la détection des virus dans l'eau et les aliments : signification et assurance qualité. ....	110
B.1 - Assurance qualité .....	110
B.2 - Interprétation de la présence de génome dans l'environnement .....	112
C. Estimation de la pollution virale <i>via</i> des indicateurs indirects .....	115
C.1 - Indicateurs bactériens .....	115
C.2 - Coliphages somatiques .....	116
C.3 - Bactériophages F-spécifiques .....	117
C.4 - Phages de <i>Bacteroides fragilis</i> .....	120
D. Conclusion .....	121
<b>Contamination virale des aliments et de l'eau : logigramme d'interprétation d'un résultat positif par les techniques de biologie moléculaire.....</b>	<b>123</b>
A. Éléments complémentaires à renseigner (items) .....	123
B. Interprétation des résultats complémentaires obtenus.....	123
C. Représentation synoptique et liste des informations demandées.....	124
<b>Question 4 : Quels sont les risques sanitaires liés aux possibles sources et réservoirs environnementaux de ces virus ?.....</b>	<b>139</b>
A. Introduction .....	142
B. Identification des sources virales et réservoirs environnementaux, des niveaux d'émission de virus dans l'environnement et de l'impact des traitements sur ces différentes sources et réservoirs.....	142
B.1 - Réservoirs animaux et déjections .....	142
B.2 - Eaux usées traitées et boues de STEP .....	145
B.3 - Déchets (décharges et compostage).....	153
C. Persistance, survie et transfert des virus dans l'environnement (sol, eaux de surface, sédiments et eaux souterraines).....	154
C.1 - Sol.....	154
C.2 - Eaux de surface .....	158
D. Diffusion des virus dans les matrices alimentaires.....	164
D.1 - Mode de transfert/de contamination .....	164
D.2 - Description des facteurs de risques potentiels : humains et climatiques (forte pluviométrie) ....	169
E. Bilan et recommandations .....	170
E.1 - Bilan.....	170
E.2 - Recommandations .....	171
<b>Question 5 : Quels sont les moyens mis en œuvre dans l'industrie agroalimentaire pour maîtriser le danger viral (HACCP, qualité...) ? - Quel est l'impact des différents procédés utilisés en industrie agroalimentaire sur ce danger ?.....</b>	<b>185</b>
A. Introduction .....	187
B. Impact des différents procédés utilisés en agroalimentaire sur le danger viral .....	188
B.1 - Procédés de conservation en agroalimentaire et élimination virale.....	188
B.2 - Synthèse des données de réduction virale lors du traitement thermique de différents aliments .....	191
B.3 - Évaluation de l'efficacité des traitements thermiques utilisés lors de la transformation des fruits rouges.....	192
B.4 - Auxiliaires technologiques.....	193
B.5 - Conclusion.....	195
<b>C. Quels sont les moyens mis en œuvre dans l'industrie agroalimentaire pour maîtriser le risque viral (HACCP, qualité, etc.) ? .....</b>	<b>196</b>
C.1 - Contexte.....	196
C.2 - Résultats de l'enquête.....	197
C.3 - Conclusion .....	197

<b>Question 6 : Quel est l'impact des mesures prises aux différentes étapes de production et de distribution d'eau des réseaux publics sur la maîtrise du danger viral ?</b> .....	<b>201</b>
A. Descriptif de l'état de la situation française .....	204
A.1 - Descriptif des types de ressources et des niveaux de traitement de l'eau en France.....	204
A.2 - Vulnérabilité des ressources en eau .....	206
A.3 - Cadre réglementaire : protection des ressources et des captages .....	206
A.4 - Fréquence et origine des non-conformités .....	207
B. Efficacité des procédés de traitement.....	209
B.1 - Traitements de rétention .....	210
B.2 - Traitements biocides .....	214
B.3 - Conclusion sur l'efficacité des procédés de traitement .....	218
B.4 - Les indicateurs d'efficacité de traitement .....	219
C. Conclusion.....	220
C.1 - Surveillance de la qualité de l'eau au point d'usage.....	220
C.2 - Mesures portant sur la qualité de la ressource.....	220
C.3 - Mesures portant sur le traitement .....	221
C.4 - Mesures portant sur le réseau .....	221
C.5 - « Water safety plan » – OMS .....	221
 <b>Question 7 : Quels systèmes de détection de situation d'alerte existent et quelles investigations en situation d'alerte ?</b> .....	 <b>231</b>
A. L'alerte : définitions .....	233
A.1 - Alerte.....	233
A.2 - Distinction entre « signal » et « alerte » .....	233
A.3 - Autres termes .....	234
B. Détection de l'alerte .....	234
B.1 - Détection de cas groupés/épidémies.....	234
B.2 - Détection de la présence virale dans l'eau de consommation ou les denrées alimentaires .....	236
C. Méthodologies d'investigation.....	236
C.1 - Investigation épidémiologique.....	237
C.2 - Investigation environnementale .....	237
D. Laboratoires impliqués.....	238
D.1 - Pour les analyses dans l'eau de distribution .....	238
D.2 - Pour les analyses sur les denrées alimentaires .....	238
E. Mesures de contrôles et de prévention .....	240
F. Conditions du retour à la normale .....	241
G. Conclusions.....	243
 <b>Question 8 : Quels sont les résultats de l'analyse des publications dans le domaine de l'appréciation quantitative des risques alimentaires liés aux virus ?</b> .....	 <b>245</b>
A. Aspects généraux.....	248
A.1 - Rappels sur l'appréciation quantitative des risques .....	248
A.2 - Origine et nature des publications .....	249
A.3 - Objectifs des publications .....	249
A.4 - Objet des publications.....	250
A.5 - Méthodologie utilisée dans les évaluations de risques publiées .....	251
B. Évaluation de l'exposition.....	252
B.1 - Données de contamination des aliments et de l'eau de boisson.....	252
B.2 - Considérations sur la distribution des virus.....	254
B.3 - Prise en compte de la survie des virus dans les aliments, des outils de détection, de la préparation des aliments .....	256
B.4 - Considérations sur la prise en compte de la consommation .....	256
B.5 - Conclusion .....	256

C. Caractérisation des dangers .....	257
C.1 - Relation dose-infection.....	258
C.2 - Considérations sur le risque de maladie, la virulence, la morbidité .....	264
C.3 - Considérations sur le risque de décès, taux de létalité (case-fatality rate).....	265
C.4 - Considérations sur la mesure de l'effet sanitaire en DALY .....	266
C.5 - Considérations sur le risque attribuable à l'alimentation et la transmission inter-humaine .....	269
C.6 - Conclusion .....	272
D. Caractérisation des risques .....	272
D.1 - Résultats sur le risque d'infection.....	272
D.2 - Estimation des risques : les différentes approches méthodologiques .....	273
D.3 - Questions de gestion pouvant être menées par des approches AQR et par type d'aliment.....	275
E. Conclusions - perspectives.....	279
<b>Question 9 : Quels sont les pré-requis à l'élaboration d'une stratégie d'échantillonnage d'eau et d'aliments pour évaluer une contamination virale, au regard d'une approche d'AQR ? .....</b>	<b>287</b>
A. Contexte général et définition des objectifs.....	290
A.1 - De l'efficacité d'un système de surveillance à la définition des objectifs de sécurité alimentaire .....	290
A.2 - Différents objectifs pour une stratégie d'échantillonnage (évaluation de l'exposition).....	292
A.3 - Démarche et points à définir pour la mise en place d'une évaluation de la contamination/ d'un contrôle virologique .....	293
A.4 - Plans d'échantillonnage en place dans le contrôle microbiologique .....	296
A.5 - Conclusion sur les objectifs.....	297
B. Exemple de l'application dans le domaine de l'eau de distribution et limites rencontrées .....	297
B.1 - Description du modèle d'appréciation quantitative du risque viral.....	298
B.2 - Efficacité attendue théorique d'un système de surveillance au niveau d'un captage.....	303
C. Améliorations des connaissances – propositions de thématiques de recherche.....	312
C.1 - Détermination des performances des outils de quantification par RT-PCR pour chaque virus/matrice .....	312
C.2 - Détermination de la contamination des aliments et de l'eau.....	312
C.3 - Comment améliorer les connaissances permettant d'appréhender la relation génome issu de virus infectieux/non infectieux .....	313
C.4 - Survie aux traitements, survie dans le milieu extérieur, dilution .....	313
C.5 - Détermination de la consommation .....	313
C.6 - Meilleure détermination des effets sanitaires attribuables aux aliments.....	313
C.7 - Comment valider et améliorer le modèle existant .....	314
Conclusion .....	314
<b>Conclusions : Points clés des recommandations et axes de recherche .....</b>	<b>317</b>
<b>Points clés des recommandations .....</b>	<b>317</b>
Virus d'intérêt .....	317
Méthodes d'analyses.....	317
Denrées alimentaires .....	317
Eaux destinées à la consommation humaine .....	318
Recommandations en matière d'hygiène destinées au consommateur pour la préparation des aliments.....	318
Investigations en situation d'alerte .....	318
Analyse des publications dans le domaine de l'Appréciation Quantitative des Risques alimentaires liés aux virus .....	319
Pré-requis à l'élaboration d'une stratégie d'échantillonnage d'eau et d'aliments pour évaluer une contamination virale, au regard d'une approche d'AQR .....	319
<b>Axes de recherche et perspectives .....</b>	<b>320</b>
1. Connaissance du danger.....	320
2. Données épidémiologiques.....	320
3. Niveau de contamination des eaux et des aliments.....	320
4. Efficacité des traitements .....	321
5. Données de consommation et préparation des aliments.....	321
6. Perspectives.....	321

<b>Annexes</b> .....	<b>323</b>
Annexe I : Saisine n° 2002-SA-0118 de la Direction générale de la santé du 23 avril 2002 relative à l'évaluation du risque sanitaire lié à la présence éventuelle de fragments de génome du virus Norwalk-like dans certaines eaux minérales, naturelles, européennes embouteillées .....	325
Annexe II : Saisine n° 2003-SA-0379 de la Direction générale de la santé concernant le besoin d'apporter des précisions concernant le volet analytique de la recherche des virus dans l'eau .....	327
Annexe III : Décision n° 2003-465 du 12 novembre 2003 relative à la création du groupe de travail « virus transmissibles à l'homme par voie orale » .....	329
Annexe IV : Décision n° 2004-150 du 15 avril 2004 relative au groupe de travail « virus transmissibles à l'homme par voie orale » .....	331
Annexe V : Décision n° 2005-06-324 du 26 juillet 2005 relative au groupe de travail « virus transmissibles à l'homme par voie orale » .....	333
Annexe VI : Questionnaire de sensibilisation à la thématique virale adressé aux professionnels de l'industrie de l'agroalimentaire en janvier-juin 2005 .....	335
Annexe VII : Présentation des textes réglementaires du « Paquet hygiène » .....	337
Annexe VIII : Fiches détaillées concernant les virus d'intérêt transmissibles à l'homme par voie orale .....	339

## Liste des figures

Figure 1 : les principales règles applicables aux eaux destinées à la consommation humaine .....	85
Figure 2 : résumé des principales techniques de concentration des virus à partir d'échantillons d'eaux.....	99
Figure 3 : persistance du <i>Poliovirus 1</i> infectieux (infectious virus) détecté par culture cellulaire et d'un fragment de son génome (viral genome) détecté par RT-PCR en temps réel à 35°C dans une eau minérale .....	113
Figure 4 : logigramme d'interprétation d'un résultat positif par les techniques de biologie moléculaire ....	124
Figure 5 : schéma conceptuel d'exposition aux virus <i>via</i> les aliments .....	142
Figure 6 : compartiments du sol réservoir de virus.....	155
Figure 7 : aliments impliqués dans les TIAC à norovirus (86 épidémies) survenues en Angleterre et au Pays de Galles, de 1992 à 2000.....	166
Figure 8 : description des étapes de production et distribution de l'eau .....	204
Figure 9 : qualité microbiologique des eaux distribuées par département - année 2002 .....	208
Figure 10 : réseau de laboratoires d'analyse virologique des aliments et de l'eau .....	242
Figure 11 : schéma conceptuel des principales évaluations de risques sanitaires publiées dans le domaine alimentaire/viral.....	251
Figure 12 : schéma des différents modules pour l'évaluation des effets sanitaires .....	257
Figure 13 : schéma des différents modules pour l'évaluation des effets sanitaires pour différents effets sanitaires d'un même agent infectieux .....	258
Figure 14 : relations dose-infection de différents virus .....	263
Figure 15 : relations dose-infection de différents virus pour de faibles doses (probabilités d'infection) .....	263
Figure 16 : modèle de transition pour Rotavirus utilisé pour le calcul du DALY pour des enfants de moins de 5 ans, dans un pays développé (européen).....	267
Figure 17 : modèle de transition pour VHA utilisé pour le calcul du DALY pour des adultes dans un pays développé (européen).....	268
Figure 18 : modèle de transmission d'infection à rotavirus et risque exprimé pour des populations humaines .....	271
Figure 19 : les différentes approches d'AQR dans l'eau de distribution.....	276
Figure 20 : les différentes approches AQR dans les produits végétaux et salades, carottes, radis, framboises.....	277
Figure 21 : les différentes approches AQR dans les coquillages.....	278
Figure 22 : schéma montrant le lien entre l'évaluation du risque et la gestion du risque, <i>via</i> la définition d'objectifs de sécurité sanitaire et l'évaluation de la situation sanitaire.....	291
Figure 23 : démarche visant à établir une stratégie d'échantillonnage optimale dans l'eau en vue d'évaluer les risques.....	293
Figure 24 : démarche visant à établir une stratégie d'échantillonnage optimale dans l'eau en vue d'un contrôle virologique dans l'eau ou les aliments .....	295
Figure 25 : relations dose-infections Rotavirus et Échovirus (modèles Beta-Poisson).....	299
Figure 26 : distribution de la consommation d'eau quotidienne chez les plus de 15 ans .....	301
Figure 27 : schéma de l'approche AQR Norovirus/eau du robinet.....	310

## Liste des tableaux

Tableau 1 : les virus entériques humains responsables de pathologies liées aux aliments .....	50
Tableau 2 : limite de qualité pour les eaux douces superficielles utilisées ou destinées à être utilisées pour la production d'eaux destinées à la consommation humaine (valeurs guides pour les paramètres microbiologiques).....	86
Tableau 3 : limite de qualité pour les eaux douces superficielles utilisées ou destinées à être utilisées pour la production d'eaux destinées à la consommation humaine (valeurs guides pour les paramètres microbiologiques) .....	86
Tableau 4 : critères microbiologiques auxquels doivent répondre les eaux destinées à la consommation humaine - Annexe I de l'arrêté du 11 janvier 2007.....	87
Tableau 5 : fréquences annuelles d'échantillonnages et d'analyses au point de mise en distribution et d'utilisation - Annexe II de l'arrêté du 11 janvier 2007.....	88
Tableau 6 : critères microbiologiques concernant les produits décortiqués et décoquillés de crustacés et de mollusques cuits figurant dans le règlement (CE) n°2073/2005 .....	93
Tableau 7 : exemple de méthodes utilisées pour la détection des virus dans les coquillages.....	100
Tableau 8 : exemples de méthodes d'extraction/concentration des virus à partir d'aliments.....	102
Tableau 9 : sensibilité (+) de différents systèmes cellulaires pour l'isolement (ECP) des virus entériques ....	104
Tableau 10 : quelques lignées cellulaires permettant la culture de virus entériques et pour certains, l'isolement dans l'environnement ( <i>Enterovirus</i> , <i>Reovirus</i> ) citées dans la littérature.....	105
Tableau 11 : détection de virus dans des échantillons d'eau divers et variés.....	107
Tableau 12 : détection de génome de virus entériques humains par RT-PCR, d' <i>E. coli</i> et des phages ARN F-spécifiques dans différents pays. ....	119
Tableau 13 : caractéristiques de la méthode – liste des données à renseigner .....	125
Tableau 14 : contexte environnemental, technologique ou d'hygiène du prélèvement.....	125
Tableau 15 : données épidémiologiques .....	126
Tableau 16 : potentiel zoonotique des virus entériques transmissibles à l'homme.....	143
Tableau 17 : présence de virus humains dans les eaux usées.....	147
Tableau 18 : efficacité des traitements de désinfection des eaux usées sur les micro-organismes .....	147
Tableau 19 : prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles.....	148
Tableau 20: restrictions d'usage et bonnes pratiques d'épandage des boues selon l'arrêté du 8 janvier 1998 .....	149
Tableau 21 : critères d'hygiénisation selon l'arrêté du 8 janvier 1998.....	150
Tableau 22 : efficacité des systèmes de traitement des boues .....	150
Tableau 23 : préconisations possibles des textes européens en cours de rédaction quant aux traitements des boues .....	151
Tableau 24: synthèse des informations disponibles quant au transfert vertical et horizontal des virus dans les années 1980.....	157
Tableau 25 : études bibliographiques mentionnant le transfert en milieu poreux saturé.....	158
Tableau 26: présence de virus humains dans les eaux de surface.....	161
Tableau 27 : présence des virus humains dans les eaux marines .....	163
Tableau 28: exemple du rôle de l'eau contaminée dans des TIAC d'étiologie virale .....	167
Tableau 29: inactivation virale à la surface des denrées végétales .....	168

Tableau 30: principaux procédés de conservation en agroalimentaire .....	189
Tableau 31 : publications par produits relatives aux traitements thermiques (à cœur du produit) .....	191
Tableau 32 : exemples de cumuls possibles de technologies sur l'ingrédient et le produit fini correspondant.....	192
Tableau 33 : exemples de procédés thermiques utilisés pour la transformation des fruits rouges.....	193
Tableau 34: épuration de moules contaminées par du virus de l'hépatite A (teneur initiale : $10^{3.2}$ TCID <sub>50</sub> /mL) ou le poliovirus 1 ( $10^{4.0}$ TCID <sub>50</sub> /mL) dans de l'eau de mer ozonée ou non.....	194
Tableau 35 : efficacité des désinfectants sur le FeCV contaminant les fraises et les laitues .....	195
Tableau 36: nombre et débit des stations de traitement selon le type de traitement – situation en 2004....	205
Tableau 37 : nombre et débit des stations de traitement selon le type de traitement et l'origine de l'eau traitée – Situation en 2004.....	205
Tableau 38: taux de détection des virus dans les eaux brutes et les eaux filtrées .....	211
Tableau 39: couples concentration-temps nécessaires pour l'obtention d'un abattement de 2 log à pH 6-7.....	217
Tableau 40 : recommandation de l'US EPA concernant les couples concentration-temps nécessaires pour l'obtention d'un abattement de 4 log à pH 6-9 pour le VHA .....	217
Tableau 41 : abattement des entérovirus lors des différentes étapes du traitement de l'eau.....	218
Tableau 42: liste des principales équipes françaises ayant développé une expertise en virologie des aliments sur la base de leur implication dans des projets de recherche, et ayant participé à des expertises lors de situations d'alertes sanitaires au cours de la période 1998-2005 .....	239
Tableau 43: AQR sur virus par voie orale et principales publications de référence.....	250
Tableau 44: informations actuellement disponibles sur les relations dose-infections de différents virus .....	262
Tableau 45: taux de morbidité et de létalité exprimés pour différents virus .....	265
Tableau 46: résultats de l'approche DALY pour VHA et Rotavirus.....	267
Tableau 47 : résumé des paramètres à estimer pour décrire la dynamique de maladie des Entérovirus .....	271
Tableau 48: calculs de risque quotidien et annuel d'infection.....	273
Tableau 49: approche méthodologique utilisée dans les principales publications internationales d'évaluation de risques appliquées aux virus dans les aliments.....	274
Tableau 50: risque annuel d'infection à Rotavirus.....	303
Tableau 51 : paramètres utilisés pour l'estimation du volume en absence d'agrégat.....	304
Tableau 52 : volume (en litres) du prélèvement nécessaire pour détecter dans 95 % des cas une concentration donnée en virus infectieux par RT-PCR (en faisant un seul prélèvement) .....	304
Tableau 53 : paramètres utilisés pour déterminer le nombre de prélèvements à réaliser en absence d'agrégats afin de détecter une concentration donnée de virus infectieux .....	305
Tableau 54: nombre de prélèvements à effectuer pour détecter une concentration donnée de virus infectieux, pour un volume donné de chaque prélèvement, pour une probabilité de détection supérieure à 95 %.....	305
Tableau 55 : probabilité de détection d'un prélèvement dont la contamination virale est en moyenne de 29 particules virales, sous différentes hypothèses de dispersion et de limite de détection, pour un rendement de la technique de détection de 70 %.....	306
Tableau 56: résultats sur le risque annuel d'infection à norovirus/10 000 pour des consommateurs adultes d'eau du robinet en fonction d'une concentration détectée en génomes/L pour un prélèvement de 10 litres.....	307
Tableau 57 : résultats en DALY pour norovirus/10 000 pour des consommateurs adultes d'eau du robinet/an en fonction d'une concentration détectée en génomes/L pour un prélèvement de 10 litres .....	307
Tableau 58: paramètres et méthode du modèle d'évaluation du risque annuel et quotidien.....	309

## Liste des sigles et acronymes

---

<b>ACTIA</b>	Association de coordination technique pour les industries agroalimentaires
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	ADN complémentaire
<b>AFNOR</b>	Association française de normalisation
<b>ALARA</b>	As Low As Reasonably Achievable
<b>ALAT</b>	ALanine AminoTransférase
<b>ALOP</b>	Appropriate level of protection, niveau de protection acceptable
<b>AMDEC</b>	Analyse des Modes de Défaillance, leurs Effets et leurs Criticités
<b>AQR</b>	Appréciation Quantitative des Risques
<b>AQS</b>	Aliment-Qualité-Sécurité
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ATU</b>	Autorisation temporaire d'utilisation
<b>BCM</b>	Baylor College of Medicine
<b>BGM</b>	Lignée continue continue de cellules de rein de singe vert Buffalo
<b>CaCo-2</b>	Lignée de cellules humaines dérivée d'un cancer colique
<b>CaCV</b>	Canine CaliciVirus
<b>CAG</b>	Charbon actif en grain
<b>Cefas</b>	Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science
<b>Cellules HEK</b>	Human embryonal kidney
<b>CEN</b>	Comité européen de normalisation
<b>CHU</b>	Centre hospitalier universitaire
<b>CIM</b>	Classification Internationale des Maladies, version 10
<b>Cire</b>	Cellule interrégionale d'épidémiologie
<b>Cl<sub>2</sub></b>	Chlore actif
<b>ClO<sub>2</sub></b>	Bioxyde de chlore
<b>CMA</b>	Concentrations maximales acceptables
<b>CNR</b>	Centre national de référence
<b>COT</b>	Carbone organique total
<b>Cox B<sub>5</sub></b>	Coxsackie-virus B <sub>5</sub>
<b>CoxA</b>	Coxsackievirus de type A
<b>CP ou PC</b>	Performance Criteria ou Critère de Performance
<b>CSHPF</b>	Conseil supérieur d'hygiène publique de France
<b>CSMVSP</b>	Comité scientifique des mesures vétérinaires en rapport avec la santé publique
<b>CSP</b>	Code de la santé publique
<b>DALY</b>	Disability Adjusted Life Years
<b>DDASS</b>	Direction départementale des affaires sanitaires et sociales

<b>DDCCRF</b>	Direction départementale de la consommation, la concurrence et la répression des fraudes
<b>DDSV</b>	Direction Départementale des services vétérinaires
<b>DGAL</b>	Direction générale de l'alimentation
<b>DGCCRF</b>	Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes
<b>DGS</b>	Direction générale de la santé
<b>DI</b>	Dose infectieuse
<b>DICT<sub>50</sub> (ou TCID<sub>50</sub>)</b>	Dose infectieuse en culture tissulaire 50
<b>DMI</b>	Dose Minimale Infectante
<b>DO</b>	Déclaration obligatoire
<b>EAMP</b>	European Association of Molluscan Producer
<b>ECHO<sub>30</sub></b>	Échovirus type 30
<b>ECP</b>	Effet cytopathique
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
<b>EPA</b>	Agence Américaine de l'Environnement
<b>EV</b>	Entérovirus
<b>FeCV</b>	Felines Enterales Coronavirus
<b>Ffu</b>	Focus forming Unit
<b>FMDV</b>	Foot and Mouth Disease Virus (virus de la fièvre aphteuse)
<b>FRhK</b>	Cellules de rein foetal de singe Rhesus
<b>FSO</b>	Food Safety Objective (Objectif de Sécurité Alimentaire)
<b>GEA</b>	Gastroentérite aiguë
<b>GEVA</b>	Gastroentérite virale aiguë
<b>GTCF</b>	Germes Témoins de Contamination Fécale
<b>HA</b>	Hépatite A
<b>HACCP</b>	Hazard analysis critical control points
<b>HAdv</b>	Adénovirus
<b>HAstV</b>	Astrovirus
<b>HE</b>	Hépatite E
<b>Hela</b>	Lignée de cellules humaines dérivée d'un cancer de l'utérus
<b>Hep2</b>	Lignée de cellules humaines dérivée d'un cancer du larynx
<b>ICC-PCR</b>	Integrated Cell Culture PCR (combinaison culture cellulaire et PCR)
<b>ICMSF</b>	International Commission on Microbiological Specifications for Foods
<b>ICPE</b>	Installation classée pour la protection de l'environnement
<b>IFREMER</b>	Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer
<b>IgG</b>	Immunoglobulines G
<b>IgM</b>	Immunoglobulines M
<b>IGS</b>	Ingénieur de génie sanitaire
<b>INRA</b>	Institut national de la recherche agronomique
<b>InVS</b>	Institut de Veille Sanitaire
<b>ISS</b>	Superiore di Sanità (Institut national de la santé)

<b>KB</b>	Lignée de cellules humaines dérivée d'un cancer du plancher de la bouche
<b>kGy</b>	KiloGray
<b>LNR</b>	Laboratoire national de référence
<b>Log ou Log<sub>10</sub></b>	Logarithme décimal
<b>LQ</b>	Limite de qualité
<b>L2oB</b>	Lignée continue de cellules de souris transfectées avec le récepteur cellulaire des poliovirus
<b>MA-104</b>	Lignées continue de cellules de rein embryonnaire de singe rhesus
<b>MES</b>	Matières en suspension
<b>MISP</b>	Médecin de santé publique
<b>MPa</b>	Mega Pascal
<b>MPN</b>	Most Probable Number (Nombre le Plus probable)
<b>MPNCU</b>	Most Probable Number of Cytopathogenic Units
<b>Na</b>	Sodium
<b>NFU</b>	Formazine Néphélométric Unit
<b>Nm</b>	Nanomètre
<b>NoV</b>	Norovirus
<b>NPP</b>	Nombre le Plus Probable
<b>NPPUC</b>	Nombre le Plus Probable d'Unités Cytopathiques
<b>NTU</b>	Nephelometric Turbidity Unit
<b>NV</b>	Norovirus
<b>O<sub>3</sub></b>	Ozone
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>OSSA</b>	Objectifs de sécurité sanitaire des denrées alimentaires
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction - Réaction en Chaîne par Polymérase
<b>PDU</b>	Unité Détectable par PCR
<b>PEVh</b>	Parechovirus humains
<b>PFU</b>	Particles forming Units - plaque formant une unité (unité infectieuse)
<b>PLC/PRF/5</b>	Lignée de cellules humaines dérivée d'un hépatome humain
<b>PO</b>	Performance Objective (Objectif de Performances)
<b>ppm</b>	Partie par million (mg/L)
<b>PRPDE</b>	Personne responsable de la production ou de la distribution d'eau
<b>PVK</b>	Cellules primaires de rein de singe vervet
<b>RD</b>	Lignée de cellules humaines dérivée d'un rhabdomyosarcome humain
<b>RIVM</b>	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu – National Institute for Public Health and the Environment
<b>RIVO</b>	Rijksinstituut voor Visserij Onderzoek - Netherlands Institute for Fisheries Research
<b>RQ</b>	Référence de qualité
<b>RSE</b>	Réseau de surveillance des entérovirus
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transcriptase PCR - Transcription Reverse-PCR
<b>SARS</b>	Syndrome aigu respiratoire sévère
<b>SaV</b>	Sapovirus

<b>SISE-Eaux</b>	Système d'information en santé environnement sur l'eau. Cette base de données du ministère chargé de la santé rassemble l'ensemble des données issues du contrôle sanitaire réalisé par les DDASS
<b>STEP</b>	Station d'épuration des eaux usées
<b>T1L</b>	Type 1 Lang
<b>T2J</b>	Type 2 Jones
<b>T3D</b>	Type 3 Dearing
<b>TCID<sub>50</sub></b>	Dose infectant en culture de tissus 50 % (unité infectieuse)
<b>THM</b>	Trihalométhanes
<b>TIAC</b>	Toxi-infection Alimentaire Collective
<b>UDI</b>	Unité de distribution
<b>UFP</b>	Unité formant plaque
<b>UHT</b>	Ultra haute température
<b>UI</b>	Unité Infectieuse
<b>US-EPA</b>	US Environmental Protection Agency
<b>UV</b>	Ultraviolets
<b>Vero</b>	Lignée continue de cellules de rein de singe
<b>VHA</b>	Virus de l'hépatite A
<b>VHB</b>	Virus de l'hépatite B
<b>VHC</b>	Virus de l'hépatite C
<b>VHE</b>	Virus de l'hépatite E
<b>VLP</b>	Virus Like Particules
<b>YLD</b>	Years Lived with Disability
<b>YLL</b>	Year Life Lost

<b>Agrégats</b>	Assemblage hétérogène de virus qui adhèrent entre eux.
<b>Alerte</b>	Toute information faisant état d'une possible menace pour la santé publique pouvant nécessiter une réponse ou une action de la part des destinataires avec un degré d'urgence éventuellement précisé.
<b>Analyse de sensibilité</b>	Analyse des effets des paramètres et des hypothèses sur les résultats d'une approche AQR.
<b>Andains</b>	Tas.
<b>Appréciation de la relation dose-réponse</b>	(Dose-response assessment). Détermination de la relation entre l'amplitude de l'exposition (dose) à un agent chimique, biologique ou physique et la gravité et/ou la fréquence des effets néfastes pour la santé qui lui sont associés (réponse). (Norme NF V01-002 : 2003)
<b>Appréciation quantitative des Risques</b>	Processus fondé sur les connaissances scientifiques comportant les étapes suivantes : <ul style="list-style-type: none"> <li>• identification des dangers (hazard identification) ;</li> <li>• appréciation des effets (hazard characterisation) ;</li> <li>• appréciation de l'exposition (exposure assessment) ;</li> <li>• estimation des risques (risk characterization).</li> </ul> (Norme NF V01-002 : 2003)
<b>Appréciation quantitative des risques déterministe</b>	À partir d'une valeur ponctuelle ou extrême de l'exposition, l'AQR donne un résultat ponctuel (une valeur de risque ou une probabilité moyenne ou extrême).
<b>Appréciation quantitative des risques du premier ordre/deuxième ordre</b>	Pas de séparation entre variabilité et incertitude/séparation entre variabilité et incertitude dans le résultat final.
<b>Appréciation quantitative des risques stochastique</b>	À partir d'une distribution de valeurs de l'exposition et/ou de la caractérisation des dangers, l'AQR donne un résultat sous la forme d'une distribution de probabilités.
<b>Boue chaulée</b>	Boue de station d'épuration ayant subi un traitement à la chaux vive ou éteinte.
<b>Boue compostée</b>	Boue traitée par compostage.
<b>Caractérisation (estimation) des risques</b>	(Risk characterization) Estimation qualitative et/ou quantitative, incluant les incertitudes qui lui sont associées, de la probabilité de survenance et de la gravité des effets néfastes sur la santé, connus ou potentiels, d'une population donnée, basée sur l'identification des dangers, l'appréciation des effets et l'appréciation de l'exposition (Norme NF V01-002 : 2003) Processus utilisé pour affecter des valeurs à la probabilité et aux conséquences d'un risque. (Guide ISO/CEI 73 : 2002)
<b>Caractérisation des dangers</b>	(Hazard characterization) Appréciation des effets. Appréciation qualitative et/ou quantitative de la nature des effets néfastes pour la santé, provoqués par les agents biologiques, chimiques ou physiques qui peuvent être présents dans l'aliment. <b>Note 1</b> : pour les agents chimiques, une appréciation de la relation dose-réponse devrait être faite. <b>Note 2</b> : pour les agents biologiques ou physiques, une appréciation de la relation dose-réponse devrait être faite si les données sont disponibles. (Norme NF V01-002 : 2003)

<b>Carte de contrôle</b>	L'un des outils de base utilisé pour la maîtrise statistique des procédés. C'est une représentation graphique constituée d'une suite d'images de la production. Elle permet de visualiser la variabilité du procédé en distinguant les causes aléatoires des causes assignables. Une carte de contrôle aux mesures comprend deux graphiques : un pour suivre la tendance centrale, l'autre pour suivre la dispersion du procédé. Pour les cartes de contrôle aux attributs, un seul graphique permet de suivre la non-qualité de la production.
<b>Cas groupés ou « écloison »</b>	Regroupement temporo-spatial de cas d'une maladie ou syndrome jugé comme supérieur à ce que l'on attend (outbreak des anglo saxons).
<b>Cluster ou « agrégat »</b>	Regroupement temporo-spatial de cas d'une maladie sans que l'on puisse juger du caractère anormal par rapport à l'incidence moyenne.
<b>Colloïdes</b>	Suspension de virus dans un liquide.
<b>Courbe d'efficacité</b>	Pour un plan d'échantillonnage donné, une courbe d'efficacité décrit la probabilité d'acceptation d'un lot en fonction de sa qualité réelle. Elle relie le taux de défectueux dans des lots avec la probabilité d'accepter ces lots au contrôle (Codex Alimentarius-2003).
<b>Critère de performance</b>	Efficacité attendue d'un traitement à une certaine étape de la vie d'un produit.
<b>CSHPPF</b>	Conseil supérieur d'hygiène publique de France.
<b>D</b>	Temps de réduction logarithmique.
<b>DALY</b>	Unité de coût sanitaire. Années de vies corrigées de l'incapacité. Somme, pour la population exposée au risque, des années de vie perdues par la mortalité liée à l'agent infectieux (YLL), aux années de vie de qualité dégradée liée à la morbidité du même agent infectieux pondérées par un critère de sévérité (YLD).
<b>DI<sub>50</sub></b>	Si I est l'infection, la DI <sub>50</sub> est la dose qui provoque l'apparition de l'infection dans 50 % des individus exposés.
<b>DL<sub>50</sub></b>	La DL <sub>50</sub> est la dose qui provoque la mort de 50 % des individus exposés.
<b>Eaux grises</b>	Eaux usées qui proviennent d'utilisations autres que les toilettes.
<b>Eaux usées</b>	Terme générique englobant les eaux ménagères, les eaux résiduaires (ou industrielles) et les eaux de drainage.
<b>Efficacité d'un système de surveillance/contrôle</b>	Probabilité de détection d'un danger lorsque qu'une denrée dépasse un niveau de concentration microbienne donné, ou une certaine prévalence de denrées alimentaires contaminées, ou encore lorsqu'un épisode de contamination dépasse une certaine durée à un certain niveau.
<b>Effluents</b>	Liquide sortant d'ouvrages ou de stations de traitement des eaux.
<b>Effluents primaires</b>	Liquide sortant du traitement primaire.
<b>Effluents secondaires</b>	Liquide sortant du traitement secondaire.
<b>Effluents tertiaires</b>	Liquide sortant du traitement tertiaire.
<b>Endémie</b>	Présence habituelle dans une région ou dans une population d'une maladie donnée qui y sévit de façon constante ou périodique.
<b>Épidémie</b>	Augmentation de la fréquence d'une maladie dans une population donnée et à un moment donné par rapport à ce qui serait attendu en situation normale.
<b>Équivalent habitant</b>	Estimation de la quantité de pollution rejetée par un usager domestique, soit la charge organique biodégradable ayant une demande biochimique d'oxygène en cinq jours (DBO <sub>5</sub> ) de 60 grammes d'oxygène par jour.

<b>Évaluation de l'exposition</b>	(Exposure assessment) Appréciation qualitative et/ou quantitative de l'ingestion probable d'agents biologiques, chimiques et physiques par l'intermédiaire des aliments ainsi que par l'exposition à d'autres sources, s'il y a lieu. (Norme NF V01-002 : 2003)
<b>Événements de réassortiment</b>	Échanges de segments d'ARN entre deux virus à génome segmenté proches infectant une même cellule.
<b>Excès de risque</b>	Un excès de risque correspond au risque supplémentaire dû à une exposition spécifique par rapport au risque dans une population de référence non exposée à ce facteur spécifique.
<b>Floc</b>	Agglomérat de fines particules ou de micro-organismes en suspension dans l'eau qui favorise la décantation et la filtration.
<b>Fraction de risque attribuable</b>	Expression du pourcentage des cas d'une maladie attribuables à un facteur de risque (dans ce rapport exposition à un agent infectieux, un virus). Son calcul diffère selon que l'on considère seulement les personnes exposées au facteur de risque ou la population générale. Dans ce rapport sont concernées les personnes exposées au risque.
<b>Génogroupe</b>	Sous-groupe constitué de virus présentant une forte similitude génétique.
<b>Gestion des risques</b>	(Risk management) Processus, distinct de l'évaluation scientifique des risques, de pondération des choix politiques, conduit en consultant toutes les parties intéressées et en tenant compte de l'évaluation scientifique des risques et d'autres facteurs relatifs à la protection de la santé des consommateurs et à la promotion de pratiques commerciales loyales et, si nécessaire, sélectionnant des options de prévention et de maîtrise appropriées. (Norme NF V01-002 : 2003)
<b>Identification des dangers</b>	(Hazard identification) Identification d'agents biologiques, chimiques et physiques susceptibles de provoquer des effets néfastes pour la santé et qui peuvent être présents dans un aliment ou un groupe d'aliments particuliers. (Norme NF V01-002 : 2003)
<b>Incertitude</b>	Elle est liée à une insuffisance d'information, par exemple quand un paramètre nécessaire à la modélisation n'a pu être estimé qu'indirectement, ou à partir d'un faible nombre de valeurs, comme par exemple les performances d'une technique d'analyse. L'incertitude peut être réduite par tout nouvel apport d'information. L'incertitude se traduit par un intervalle de crédibilité.
<b>Infection-Infectiosité</b>	<u>Infection</u> : Pénétration dans un organisme d'agents pathogènes microscopiques capables de s'y multiplier et d'y reproduire des entités identiques. <u>Infectiosité</u> : Aptitude pour un micro-organisme à pénétrer et se multiplier dans un hôte réceptif (ou sensible). Un individu infecté peut être détecté par sérologie (réaction immunitaire contre le virus) ; par détection de virus dans les selles ou dans un organe ; ou par des symptômes pathognomoniques mais dans ce cas on ne détecte ni les porteurs sains ni les personnes en incubation qui sont pourtant infectées.
<b>Limite de détection</b>	Plus petite concentration ou teneur de l'analyte (entité physique, chimique ou biologique) pouvant être détectée, mais non quantifiée, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode (NF V 03-110).
<b>Limite de quantification</b>	Plus petite concentration ou teneur de l'analyte (entité physique, chimique ou biologique) pouvant être quantifiée avec une incertitude acceptable, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode (NF V 03-110).
<b>Mesures de maîtrise</b>	Actions et activités auxquelles on peut avoir recours pour prévenir ou éliminer un danger qui menace la sécurité des aliments ou pour le ramener à un niveau acceptable. (Source : norme AFNOR NF V01-002)
<b>Niveau de Protection acceptable</b>	(de l'anglais Appropriate level of protection, ALOP) niveau de protection acceptable à relier à la notion de risque acceptable, peut être exprimé sous différentes unités ; par exemple un certain nombre de cas d'infection liés à un agent infectieux par an.

<b>Niveau de Qualité acceptable</b>	Critère d'indexation appliqué à une série continue de lots qui correspond à un taux maximum de défectueux admissible dans des lots. C'est un objectif de qualité que se propose d'atteindre le professionnel (Codex Alimentarius 1999).
<b>Niveau de qualité limite</b>	Pour un lot considéré isolément. C'est un niveau de qualité (exprimé par exemple en taux d'éléments défectueux dans un lot) qui correspond à une probabilité spécifiée et relativement faible d'acceptation d'un lot présentant un taux de défectueux égal à la qualité limite (QL) (Codex Alimentarius 1999).
<b>Objectif de performance</b>	Niveau de contamination maximal d'un aliment à une étape de la chaîne/ fabrication alimentaire avant la consommation.
<b>Objectif de santé</b>	(Health target) Risque considéré comme acceptable dans l'eau vis-à-vis d'un danger particulier au regard de contraintes spécifiques.
<b>Objectif de Sécurité Alimentaire</b>	L'objectif de sécurité alimentaire ou FSO (de l'anglais Food Safety Objective) est une concentration ou une fréquence de contamination (prévalence) maximale d'un aliment au moment de sa consommation.
<b>Particules virales</b>	Virus possédant une capsid et un génome.
<b>Plan d'échantillonnage aux attributs</b>	Méthode d'estimation de la qualité d'un lot qui consiste à qualifier chaque prélèvement élémentaire de l'échantillon du caractère ou attribut conforme ou défectueux selon que la spécification de la norme Codex est respectée ou non (Codex Alimentarius, 1999).
<b>Plan d'échantillonnage aux mesures</b>	Méthode d'estimation de la qualité d'un lot qui consiste à mesurer dans chaque prélèvement élémentaire, la valeur d'une grandeur caractérisant la marchandise contrôlée (Codex Alimentarius 1999).
<b>Plan de contrôle</b>	Un plan de contrôle a pour objectif principal la recherche des anomalies, des non-conformités, voire des fraudes. Il est toujours fondé sur un échantillonnage ciblé ou suspect, c'est-à-dire que les prélèvements sont réalisés sur la base de critères de ciblage prédéterminés (NS DGAI, 2005).
<b>Plan de surveillance</b>	Un plan de surveillance a pour objectif principal l'évaluation globale de l'exposition du consommateur à un risque. Il est toujours fondé sur un échantillonnage réalisé de manière aléatoire au sein d'une population ou d'une sous-population identifiée (NS DGAI, 2005).
<b>Point isoélectrique ou pH isoélectrique</b>	pH où la charge globale d'un virus est nulle.
<b>Polyélectrolytes cationiques</b>	Les polyélectrolytes cationiques neutralisent les matières colloïdales dans les eaux, puisque la majorité de ces matières ont une charge électrique négative.
<b>Réassortant</b>	Virus issu d'un événement de réassortiment.
<b>Relation dose-effet</b>	Relation entre la dose et l'effet chez un individu.
<b>Relation dose-réponse</b>	Pour un effet donné, relation entre la dose et la réponse dans la population.
<b>Répétabilité (conditions de)</b>	Conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps (NF ISO 5725-1).
<b>Reproductibilité</b>	Conditions où les résultats d'essai sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques dans différents laboratoires avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents (NF ISO 5725-1).

<b>Réservoir</b>	Tout être vivant ou tout milieu qui héberge, pendant une période relativement prolongée, des agents infectieux susceptibles d'être transmis à l'homme ou à l'animal et dans lequel le développement (ou la multiplication) de ces agents se produit, indépendamment d'un autre être vivant ou milieu. Espèce, milieu ou mécanisme permettant la survie d'un agent pathogène en tant qu'espèce. On peut distinguer des réservoirs secondaires, ou accidentels selon l'importance vis-à-vis du réservoir naturel d'une maladie. Un réservoir dépositaire n'assure que la conservation d'un agent pathogène, sans multiplication.
<b>Risque</b>	Fonction de la probabilité d'un effet néfaste sur la santé et de la gravité de cet effet résultant d'un ou de plusieurs dangers dans un aliment. (Norme NF V01-002 : 2003)
<b>Risque attribuable</b>	Différence entre le taux d'incidence d'un phénomène de santé au sein d'une population exposée à un facteur donné et le taux d'incidence de ce même phénomène au sein de la population non exposée.
<b>Risque client</b>	Cf. risque consommateur.
<b>Risque consommateur</b>	Sur la courbe d'efficacité du plan d'échantillonnage, le risque du consommateur correspond à la probabilité d'accepter une proportion d'individus défectueux P1 (généralement bas) fixée par le plan d'échantillonnage. Selon le consommateur un tel lot doit être rejeté (Codex Alimentarius 1999).
<b>Risque croisé</b>	La diminution d'un risque vis-à-vis d'un danger peut augmenter le risque vis-à-vis d'un autre danger. Une mesure de gestion doit essayer de prévenir ce type de risque.
<b>Risque fournisseur</b>	Sur la courbe d'efficacité du plan d'échantillonnage, le risque du fournisseur correspond à la probabilité de rejeter une proportion d'individus défectueux P1 (généralement bas) fixée par le plan d'échantillonnage. Selon le fournisseur un tel lot ne doit pas être rejeté (Codex Alimentarius 1999).
<b>Sensibilité (test)</b>	Probabilité d'obtenir une réponse positive par une technique de diagnostic ou de dépistage chez un sujet malade ou infecté.
<b>Séroprévalence</b>	Prévalence sérologique.
<b>Signal</b>	Information qui peut révéler une situation d'alerte mais dont le niveau de précision est insuffisant pour porter un jugement sur la réalité de la menace.
<b>Spécificité (test)</b>	Probabilité d'obtenir une réponse négative à un test diagnostic ou de dépistage chez un sujet indemne.
<b>Taux d'attaque primaire/secondaire</b>	<b>Taux d'attaque primaire</b> : nombre de cas d'une maladie donnée survenus pendant une période d'observation déterminée rapporté à la population exposée à cet agent infectieux au début de la période. <b>Taux d'attaque secondaire</b> : nombre de nouveaux cas d'une maladie donnée apparus dans une collectivité (famille, école, bateaux, etc.) pendant une période déterminée moins le nombre de cas primaires rapportés à l'ensemble de la population exposée à cette maladie.
<b>Taux d'incidence</b>	Nombre de nouveaux cas d'une maladie donnée pendant une période donnée, rapportée à la population exposée au risque de maladie. La population exposée est généralement estimée par la population moyenne de la période considérée.
<b>Taux de létalité</b>	Proportion des personnes décédant par suite d'une maladie donnée, rapportée au nombre de personnes atteintes de cette maladie.
<b>Taux de morbidité</b>	<b>En épidémiologie</b> : Nombre de cas de maladie ou de personnes atteintes d'une maladie donnée, rapporté à l'effectif global de la population exposée à un risque pendant une période ou à un moment donné. <b>Pour une approche AQR (taux de virulence/taux de morbidité sachant l'infection)</b> : Nombre de cas de maladie ou de personnes atteintes d'une maladie donnée, rapporté à l'effectif global des personnes infectées pendant une période ou à un moment donné.

<b>Taux de mortalité</b>	Nombre de décès survenus au cours d'une période donnée, rapporté à l'effectif moyen de la population exposée au risque.
<b>Taux de prévalence</b>	Nombre de cas d'une maladie donnée ou de personnes atteintes de cette maladie, existant à un moment donné ou au cours d'une période donnée, rapporté à l'effectif de la population à ce moment ou au cours de cette période.
<b>Taux de virulence</b>	Cf. taux de morbidité.
<b>Toxi-Infection Alimentaire Collective</b>	Survenue d'au moins deux cas groupés, présentant une symptomatologie similaire, en général digestive, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire (y compris hydrique).
<b>Valeur prédictive (test)</b>	<b>Positive</b> : dans le cadre d'un dépistage ou d'un examen diagnostique d'une maladie donnée, probabilité que le sujet chez qui le résultat du test ou de l'examen a été positif soit réellement atteint de la maladie (ou plus généralement degré de confiance d'un résultat positif). <b>Négative</b> : dans le cadre d'un dépistage ou d'un examen diagnostique d'une maladie donnée, probabilité que le sujet chez qui le résultat du test ou de l'examen a été négatif soit réellement indemne de la maladie (ou plus généralement degré de confiance d'un résultat négatif).
<b>Validation</b>	Comparaison de données observées et prédites par un modèle (par exemple AQR).
<b>Variabilité</b>	S'applique à la variation naturelle d'un phénomène biologique observé, par exemple la diversité de réponse dans une population donnée (comme par exemple une variabilité de consommation d'un aliment d'un jour à l'autre ou d'un individu à l'autre). Cette variabilité est connue, et ne pourrait pas être réduite par une autre expérience dans les mêmes conditions ni par un apport d'information, cette variabilité étant le fruit du hasard.
<b>Véhicule</b>	Tout objet ou substance (eau, aliments) qui sert d'intermédiaire à la transmission d'un agent infectieux à partir d'un réservoir à un hôte réceptif.
<b>Virus infectieux</b>	Virus pour lequel la capacité à infecter une cellule hôte a été démontrée (technique de référence = culture cellulaire).
<b>Virus orphelin</b>	Virus découvert et isolé chez l'homme auquel aucun pouvoir pathogène n'a pu être attribué, rendant impossible une classification fondée sur la seule pathogénicité.
<b>Virus pathogène</b>	Virus provoquant une pathologie chez l'homme lorsqu'il est sous sa forme infectieuse.
<b>Virulence</b>	Capacité d'un micro-organisme à induire des troubles cliniques chez le sujet infecté.
<b>Zoonose</b>	Toute maladie infectieuse qui peut être transmise, dans les conditions naturelles, des animaux vertébrés à l'homme et inversement.

## Composition et fonctionnement du groupe de travail

---

### Composition du groupe de travail

#### ■ Président

M. Pierre POTHIER (CHU, Dijon)

#### ■ Coordination scientifique du groupe de travail

Mme Coralie BULTEL

M. Laurent GRIMAUULT

#### ■ Membres du groupe de travail

M. Stéphane BERTAGNOLI (ENV, Toulouse)

M. Jean CARRÉ (ENSP, Rennes)

Mme Isabelle DÉPORTES (ADEME, Angers)

Mme Henriette DE VALK (InVS, Saint-Maurice)

M. Éric DUBOIS (Afssa, Sophia-Antipolis)

Mme Sylvie DUBROU (Laboratoire d'hygiène de la ville de Paris)

Mme Élisabeth DUSSAIX (CHU Paul Brousse, Villejuif)

Mme Virginie FERRÉ-AUBINEAU (CHU, Nantes)

M. Christophe GANTZER (Faculté de Pharmacie, Nancy)

M. Philippe HARTEMANN (Faculté de Médecine, Vandoeuvre les Nancy)

Mme Odile LEGEAY (consultante indépendante, Lyon)

Mme Soizick LE GUYADER (Laboratoire de Microbiologie, Nantes)

M. Bruno LINA (Domaine Rockefeller, Lyon)

M. Antoine MONTIEL (SAGEP, Paris)

M. Bernard PICOCHÉ (ADRIA Normandie, Villers)

M. Philippe VILAGINÉS (CRECEP, Paris)

#### ■ Appui scientifique et technique auprès du groupe de travail

Mme Anne THÉBAULT

#### ■ Agence française de sécurité sanitaire des aliments

Mme Hélène AUBRY-DAMON

Mme Delphine CAAMANO

Mme Muriel ELIASZEWICZ

### Personnalités consultées par le groupe de travail, relecteurs du rapport et personnes associées

M. Bernard BALEUX

Mme Roxane BRACHET

M. Jean-Jacques CHOMEL

M. Olivier CUNIN

M. Jean-Marie DELATTRE

M. Jean-Baptiste DENIS

M. Jean-François DUHAMEL

Mme Ann'Laure FLAVIGNY

Mme Françoise KREMER

M. Alain LE FAOU

Mme Valérie LIVRELLI

Mme Florence MORFIN

Mme Élisabeth NICAND

Mme Anne NOVELLI

M. Alban ROBIN

M. Daniel THOUVENOT

M. Charles SAOUT

M. Ousmane TRAORÉ

Mmes et MM. les membres des CES Eaux et Microbiologie

**Structures auditionnées par le groupe de travail le 21 juin 2004 et structures destinataires du courrier d'enquête sur la sensibilisation des industriels de l'agroalimentaire à la problématique virale (janvier-juin 2005).**

## **Audition des représentants des professionnels distributeurs d'eau le 21 juin 2004**

### **Organisation (par ordre alphabétique)**

Générale des Eaux  
Lyonnaise des Eaux  
SAGEP  
SAUR

## **Destinataires du courrier d'enquête sur la sensibilisation des industriels de l'agroalimentaire à la problématique virale (janvier-juin 2005)**

### **Organisation (par ordre alphabétique)**

ALLIANCE 7  
Association de Coordination Technique pour l'Industrie Agroalimentaire  
Association Française de l'Industrie des Fontaines à Bonbonnes  
Association Nationale des Industries Alimentaires  
Association nationale interprofessionnelle du bétail et des viandes  
Centre d'information des viandes  
Centre national interprofessionnel de l'économie laitière  
Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes  
Chambre syndicale des eaux minérales  
Comité national de la conchyliculture  
Confédération d'industries transformatrices des produits de la mer  
Fédération alimentaire  
Fédération Française des Aliments Conservés  
Fédération française des industriels charcutiers, traiteurs, transformateurs de viandes  
Fédération des Industries Avicoles  
Fédération nationale du commerce extérieur et des produits alimentaires  
Fédération nationale des industries laitières  
Groupement des Producteurs et des Conditionneurs de Boissons  
Institut technique du porc  
Syndicat des eaux de sources  
Syndicat des fabricants industriels de glaces, sorbert et crème glacée  
Syndicat des fabricants de produits à base de fruits sucrés et dérivés  
Syndicat des fabricants de produits végétaux frais prêts à l'emploi  
Syndicat National du Commerce Extérieur  
Syndicat National des Fabricants de Plats Préparés  
Syndicat national des industries de boulangerie/pâtisserie  
Syndicat National de l'Industrie des Viandes

## Répartition des contributions

Question	Intitulé	Coordinateur	Membres	Personnalités consultées
Question 1	Quelles sont les données scientifiques les plus actualisées concernant le risque lié à la contamination des denrées alimentaires et des eaux de consommation par les virus entériques ?	M. Lina	M. Dubois Mme Dussaix Mme Le Guyader M. Pothier	Mme Brachet, M. Chomel, M. Le Faou, Mme Morfin, Mme Nicand M. Traoré
Question 2	Quel est le cadre réglementaire actuel, national et international, concernant les virus dans les aliments (denrées et eaux de consommation) ?	Mme Bultel M. Grimault		Représentants de la DGAL et de la DGS : M. Cunin Mme Kremer Mme Novelli M. Robin M. Saout
Question 3	Comment interpréter la présence de génome viral dans des matrices alimentaires et en milieu hydrique en termes d'infectiosité potentielle ?	M. Gantzer	M. Dubois Mme Dubrou Mme Ferré Mme Le Guyader M. Vilaginès	
Question 4	Quels sont les risques sanitaires liés aux possibles sources et réservoirs environnementaux de ces virus ?	M. Bertagnoli	Mme Déportes, Mme Dubrou, Mme Le Guyader, M. Carré, Dubois, Vilaginès	
Question 5	Quels sont les moyens mis en œuvre dans l'industrie agroalimentaire pour maîtriser le danger viral (démarche HACCP, démarche qualité...)? Quel est l'impact des différents procédés utilisés en industrie agroalimentaire sur ce danger ?	M. Picoche	Mme Legeay Mme Le Guyader, M. Dubois	
Question 6	Quel est l'impact des mesures prises aux différentes étapes de production et de distribution d'eau des réseaux publics sur la maîtrise du danger viral ?	M. Hartemann, M. Montiel	M. Carré, M. Gantzer, M. Vilaginès	
Question 7	Quels systèmes de détection de situation d'alerte existent et quelles investigations en situation d'alerte ?	Mme De Valk	M. Dubois, Mme Leguyader	
Question 8	Quels sont les résultats de l'analyse des publications dans le domaine de l'Appréciation Quantitative des risques alimentaires liés aux virus ?	Mme Thébault	Mme De Valk	
Question 9	Quels sont les pré-requis à l'élaboration d'une stratégie d'échantillonnage d'eau et d'aliments pour évaluer une contamination virale, au regard d'une approche d'AQR ?	Mme Thébault	Mme Ferré, Mme Dubrou, M. Dubois	

### **Question 1 : Quelles sont les données scientifiques les plus actualisées concernant le risque lié à la contamination des denrées alimentaires et des eaux de consommation par les virus entériques ?**

Le mode de transmission des virus à l'homme peut être varié. Dans la réflexion conduite par ce groupe de travail, il a été décidé de considérer uniquement les virus entériques pour lesquels le risque de transmission à l'homme par ingestion d'un aliment ou d'eau contaminé a été démontré et pose des problèmes dans les secteurs de l'agroalimentaire et de la distribution de l'eau. Ainsi, le travail du groupe a porté sur les risques de transmission à l'homme, par les denrées alimentaires et les eaux de consommation, des virus suivants : rotavirus, norovirus, sapovirus, astrovirus, adénovirus 40 et 41, virus de l'hépatite A, de l'hépatite E, les entérovirus, paréchovirus et réovirus.

Il s'agit de virus sans enveloppe dont la plupart ont un génome à ARN, seul le génome des adénovirus est constitué d'ADN. La stabilité des virions aux pH acides permet le passage de la barrière gastrique et l'infection de l'intestin ou d'autres organes cibles. La transmission de ces virus se fait selon un mode féco-oral.

Il n'y a pas d'unicité quant à leur spectre d'hôte. Le virus de l'hépatite A est strictement humain alors que le virus de l'hépatite E a un potentiel zoonotique. Pour d'autres comme les rotavirus, la barrière d'espèce n'est pas stricte bien que l'homme soit généralement le principal réservoir des souches humaines ; quant aux norovirus, bien qu'ils aient été isolés chez l'homme, les bovins, les porcins et les souris, il n'y a aujourd'hui aucune preuve de l'existence d'une zoonose.

Les virus entériques sont responsables de gastroentérites ou d'hépatites. Toutefois, il existe des formes cliniques variées et les infections asymptomatiques sont fréquentes. Il n'y a pas un groupe de population à risque pour l'ensemble de ces virus même si les individus les plus faibles (très jeunes enfants, personnes âgées ou souffrant de malnutrition) sont exposés aux conséquences néfastes des infections par les virus de gastroentérites. Cependant certains emplois dans les stations d'épuration, les égouts ainsi que le tourisme en zone d'endémie exposent aux infections par les virus de l'hépatite A et de l'hépatite E. Pour le virus de l'hépatite A et les poliovirus, le risque d'infection peut être prévenu par la vaccination et l'application des mesures d'hygiène est efficace pour l'ensemble des virus.

Les virus sont excrétés dans les selles et contaminent l'environnement. Incapables de se multiplier en l'absence de cellules-hôtes, ils peuvent persister et rester infectieux plusieurs jours voire semaines, notamment à basses températures et en présence de particules. La transmission par voie féco-orale est de loin la plus habituelle et selon les virus plutôt directe de personne à personne (exemple des rotavirus) ou indirecte par ingestion d'eau (exemple du virus de l'hépatite E) ou d'aliments contaminés (exemple des norovirus). Les délais d'incubation (jusqu'à 6 semaines pour l'hépatite A) rendent parfois difficile la mise en évidence de la voie de transmission.

La présence de ces virus est détectée dans les produits biologiques, l'eau ou les matrices alimentaires par la mise en évidence du pouvoir infectieux, d'antigènes ou des génomes viraux. Dans le cas de l'eau et des aliments, une étape préalable de concentration est le plus souvent nécessaire. Des techniques de biologie moléculaire (PCR ou RT-PCR) sont également utilisées pour une caractérisation plus fine des virus impliqués dans des épidémies. La détection du génome d'un virus ne prouve pas son caractère infectieux, lequel est associé à une répllication du virus sur cellules. Malheureusement la plupart de ces virus cultive difficilement sur cellules, voire pas du tout, comme les norovirus et sapovirus. Pour ces virus, les données concernant la survie ou la résistance aux traitements sont souvent déduites par analogie avec celles obtenues avec un virus proche.

Les aliments et l'eau sont une des sources importantes de contamination par ces virus à l'origine d'épidémies. Parmi les virus entériques, les principaux en termes de risque sanitaire sont les norovirus et le virus de l'hépatite A. Les rotavirus posent également un problème de santé publique. Mais ce problème est surtout lié à l'importance des épidémies hivernales récurrentes qui surviennent chez les nourrissons avec le risque de déshydratation pouvant conduire à une hospitalisation. Quant aux autres virus, ils représentent en France un risque sanitaire moindre voire, pour certains virus, minime ou encore à démontrer.

Le risque viral nécessite la mise en place de mesures de maîtrise aux différentes étapes de production d'eaux ou d'aliments. La gestion des ressources en eau et les règles d'hygiène sont éventuellement associées à des traitements chimiques (chlore, ozone) ou physiques (chaleur notamment) selon la nature des produits à traiter. Leur mise en place et la surveillance de leur efficacité sont en partie réglementées par des réglementations françaises et européennes.

## **Question 2 : Quel est le cadre réglementaire actuel, national et international, concernant les virus dans les aliments (denrées et eaux de consommation) ?**

Diverses mesures portant sur l'ensemble de la production et de la distribution d'eau permettent d'assurer la **sécurité sanitaire des eaux de consommation via des obligations de moyens et des obligations de résultats**. Dans le Code de la santé publique il est précisé que « *les eaux destinées à la consommation humaine doivent (...) ne pas contenir un nombre ou une concentration de micro-organismes, de parasites ou de toutes autres substances constituant un danger potentiel pour la santé des personnes.*»

Les mesures réglementaires visent à :

- protéger la ressource par l'instauration d'un périmètre de protection autour des captages : de protection immédiate, rapprochée et éventuellement éloignée ;
- adapter le traitement de l'eau à la ressource ;
- surveiller le respect de la qualité microbiologique de l'eau par l'intermédiaire d'indicateurs microbiologiques et physico-chimiques.

Toutefois, les virus ne font pas l'objet d'une recherche en routine et la pertinence des indicateurs microbiologiques pour témoigner de la présence de virus dans l'eau est contestable. En cas de détection de la présence anormale d'un ou de plusieurs micro-organismes dépassant les valeurs réglementaires dans un (ou plusieurs) échantillon(s) d'eau de même origine, une procédure à suivre est proposée dans un avis du CSHPF, qui peut conduire à la recherche de virus dans l'eau.

Enfin, l'article R. 1321-24 du code de la santé publique encourage la mise en place d'un plan d'assurance qualité au sein du système de production et de distribution avec notamment, une analyse régulière des risques, comportant l'identification des points critiques et les actions permettant de maîtriser les risques, et la mise en œuvre de vérifications et de suivis efficaces au niveau de ces points.

Par ailleurs, les réglementations proposées dans d'autres pays européens ou d'Amérique du nord sont présentées dans ce document.

**Dans le domaine de l'hygiène des denrées alimentaires**, aux niveaux français et européen, il n'existe pas à l'heure actuelle de textes réglementaires concernant les denrées alimentaires fixant de critères microbiologiques réglementaires pour les virus.

Au niveau européen, le règlement de la Commission du 15 novembre 2005 n°2703/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires, qui est entré en application dans tous les États-membres au 1<sup>er</sup> janvier 2006, s'inscrit dans le cadre de la réforme de la réglementation européenne dans le domaine de l'hygiène des denrées alimentaires. Le règlement (CE) n°2073/2005 rappelle ainsi dans son premier considérant que l'obtention d'un niveau élevé de protection de la santé humaine et de la santé animale est l'un des objectifs fondamentaux de la législation alimentaire, comme l'énonce le règlement (CE) no 178/2002. Il souligne que les risques microbiologiques liés aux denrées alimentaires constituent une source majeure de maladies d'origine alimentaire chez l'homme. Il rappelle que la sécurité des denrées alimentaires est principalement assurée par une approche préventive telle que la mise en œuvre de bonnes pratiques d'hygiène et de fabrication et l'application des principes HACCP (analyse des dangers - points critiques pour leur maîtrise). Dès lors, les critères microbiologiques peuvent servir pour la validation et la vérification des procédures fondées sur les principes HACCP et des autres mesures de contrôle de l'hygiène. Il convient donc d'établir des critères microbiologiques définissant l'acceptabilité de ces procédés, ainsi que des critères de sécurité microbiologique fixant une limite au-delà de laquelle on doit considérer qu'une denrée alimentaire est contaminée de manière inacceptable par les micro-organismes pour lesquels les critères sont établis.

Le règlement (CE) n°2073/2005 précise dans son deuxième considérant que les denrées alimentaires ne doivent pas contenir de micro-organismes ni leurs toxines ou métabolites dans des quantités qui présentent un risque inacceptable pour la santé humaine. Dans ce règlement, sont ainsi définis sous le terme micro-organismes *les bactéries, les virus, les levures, les moisissures, les algues, les protozoaires parasites, les helminthes parasites*

*microscopiques, ainsi que leurs toxines et métabolites.* Les virus entrent donc dans ce cadre. Néanmoins, aucun critère microbiologique réglementaire n'est fixé pour les virus dans quelque matrice alimentaire que ce soit ; ceci notamment faute de méthodes d'analyse suffisamment fiables. Le règlement précise ainsi dans son 27<sup>e</sup> considérant qu'il conviendrait en particulier de fixer des critères applicables aux virus pathogènes dans les mollusques bivalves vivants si les méthodes d'analyse sont suffisamment développées.

Par ailleurs, le règlement (CE) n°2073/2005 précise, dans son 12<sup>e</sup> considérant que les 30 et 31 janvier 2002, le CSMVSP a délivré un avis sur les virus de type Norwalk (ou norovirus). Dans son avis, le comité est parvenu à la conclusion que les indicateurs fécaux conventionnels n'étaient pas fiables pour démontrer la présence ou l'absence de virus de type Norwalk et que le recours à l'élimination des indicateurs bactériens fécaux pour déterminer les durées de purification des mollusques constituait une pratique dangereuse. Le comité a également recommandé d'utiliser *E. coli* au lieu des coliformes fécaux pour déterminer la contamination fécale dans les zones de ramassage des mollusques lorsque des indicateurs bactériens sont appliqués.

C'est donc l'indicateur *E. coli* qui est préconisé pour les produits décortiqués et décoquillés de crustacés et de mollusques cuits, et qui permet de tester la qualité des lots analysés.

Le développement des méthodes d'analyse apparaît essentiel avant de fixer des critères applicables aux virus pathogènes dans les mollusques bivalves vivants. Pour cela un groupe de travail a été mis en place afin de valider une méthode horizontale pour la détection des norovirus et VHA dans les aliments par RT-PCR en temps réel (groupe CEN/TC275/WG6/TAG4).

### **Question 3 : Comment interpréter la présence de génome viral dans des matrices alimentaires et en milieu hydrique en termes d'infectiosité potentielle ?**

Compte tenu de la faible densité virale susceptible d'être présente dans l'eau ou les aliments, il est impératif d'utiliser, en amont de la détection, des techniques de concentration des virus lorsqu'il s'agit d'eau ou des techniques d'extraction/concentration lorsqu'il s'agit d'aliments comme d'autres matrices solides. La concentration des virus à partir d'un volume d'eau est fondée sur le principe de l'adsorption-élution souvent suivie d'une étape de concentration secondaire (précipitation des protéines, ultrafiltration ou ultracentrifugation). La concentration des virus à partir des matrices alimentaires utilise des techniques d'extraction/concentration. Selon la technique de détection choisie, il sera nécessaire d'y ajouter un traitement de détoxification (culture cellulaire) ou une étape d'élimination des inhibiteurs (PCR pour l'eau usée brute ou l'eau de mer).

Trois techniques de détection sont disponibles. La culture cellulaire est sensible, spécifique et quantitative pour les virus capables de se multiplier en culture de cellules, mais elle ne permet pas la détection des norovirus, sapovirus, virus de l'hépatite E et reste limitée à quelques souches de laboratoire pour les virus de l'hépatite A, rotavirus, astrovirus et adénovirus. L'amplification d'une partie de génome viral par RT-PCR ou PCR permet de détecter toutes les souches virales dont la séquence est connue. C'est une technique sensible, spécifique, rapide et, dans certaines conditions, quantitative. L'association de ces deux techniques – culture cellulaire/RT-PCR ou PCR - est particulièrement sensible. Toutefois, elle ne permet pas la détection des virus non cultivables.

Les techniques d'amplification génique (RT-PCR ou PCR) sont les plus adaptées aux contrôles virologiques des eaux et des aliments. Cependant, la constatation de la présence d'un génome viral ne permet pas de témoigner de son caractère infectieux, critère majeur pour les gestionnaires du risque. Par ailleurs ces techniques très sensibles sont associées à d'importants risques de faux négatifs et de faux positifs exigeant des mesures d'assurance qualité adaptées et rigoureuses. Dans l'état actuel de nos connaissances, il est difficile de relier la présence d'un génome viral à la présence du virus infectieux correspondant. On connaît mal la cinétique de dégradation des génomes, la présence d'un génome viral peut être un indicateur de contamination ancienne, notamment après un traitement désinfectant. Quoiqu'il en soit, si la présence d'un génome viral risque de surestimer le risque infectieux, son absence est à l'inverse, dans les conditions d'assurance qualité adaptées, synonyme d'absence de virus infectieux.

Il est difficile et coûteux d'envisager une recherche systématique de l'ensemble des virus entériques pathogènes pour l'homme dans l'eau et les aliments. Il est donc fait appel à des indicateurs indirects de pollution fécale. Ceux-ci doivent être représentatifs des virus entériques, non pathogènes, sans risque pour l'environnement et peu coûteux. Les coliformes, les coliphages somatiques, les bactériophages F-spécifiques ou les phages de *Bacteroides fragilis* peuvent être des paramètres intéressants pour évaluer l'efficacité d'un traitement. Cependant, il n'existe pour l'instant aucun indicateur idéal pour estimer la contamination virale dans le milieu hydrique et alimentaire, et l'environnement. Il est donc important d'interpréter les résultats avec prudence et de tenir compte d'autres facteurs qui peuvent les influencer, notamment l'origine et la nature de l'eau.

Cette réflexion sur la signification de la présence de génome viral dans l'eau et les aliments en terme d'infectiosité potentielle met en évidence la difficulté d'interprétation d'un résultat positif obtenu avec des méthodes de biologie moléculaire. Il est apparu nécessaire d'élaborer un logigramme d'interprétation de ce résultat positif qui sera un outil pratique et concret pour les gestionnaires du risque. Dans ce logigramme l'intégration de données complémentaires (telles que les critères microbiologiques et physico-chimiques, le contexte environnemental, les données épidémiologiques et éventuellement d'autres critères d'infectiosité) permet de pondérer le résultat positif de la RT-PCR ou PCR. Selon les données disponibles pour chacun de ces éléments, le logigramme présente trois cas possibles d'interprétation : 1) probabilité forte de présence d'un danger ou présence avérée d'un danger ; 2) probabilité faible de présence d'un danger ; 3) résultat non-interprétable.

#### **Question 4 : Quels sont les risques sanitaires liés aux possibles sources et réservoirs environnementaux de ces virus ?**

À partir du schéma conceptuel de contamination des aliments *via* les réservoirs environnementaux présenté au début de cette question, il apparaît nécessaire de pondérer les différents éléments notés tout en prenant en compte les circonstances particulières d'exposition aux dangers et les risques associés.

Ainsi, ont été identifiées des sources primaires d'émission de virus (réservoirs vrais ou émanation de ceux-ci). Elles sont constituées des eaux usées traitées et leurs produits dérivés (boues, eaux épurées) et, au regard du potentiel zoonotique, des animaux et de leurs déjections.

Concernant les sources animales, il semble évident que certaines espèces (porcs, ruminants, rongeurs, lagomorphes) peuvent être à l'origine de contaminations humaines par le virus de l'hépatite E et les rotavirus. Ces virus semblent être de plus en plus fréquemment transmis de façon interspécifique, et étant donné le portage fréquent chez les espèces animales et leur résistance dans les déchets animaux ou le milieu extérieur, il convient d'être particulièrement vigilant à leur sujet. Les norovirus, quant à eux, ne sont pour le moment pas considérés comme des agents zoonotiques avérés mais ils présentent un potentiel de transmission qu'il convient d'étudier encore.

Peu de données renseignent sur le niveau de contamination des eaux usées par les virus. La quantité et la diversité des virus présents dans les eaux arrivant en tête de station d'épuration des eaux usées (STEP) dépendent en grande partie de l'état sanitaire de la population raccordée au réseau d'assainissement. L'abattement en virus dans la STEP, rarement total, sera fonction des processus de traitements. Toutefois, en cas de surcharge hydraulique liée notamment à des conditions météorologiques défavorables, des déversements d'eaux usées non traitées dans le milieu naturel peuvent survenir. Le risque d'une contamination durable de l'environnement et des aliments dépendant de ce milieu est alors accru.

Les procédés de traitement (traitements thermophiles, compostage, chaulage) des boues de station d'épuration, s'ils sont respectés, permettent un abattement important des virus entériques. Considérant également les mesures réglementaires stipulant les conditions d'utilisation, les boues de station d'épuration même non hygiénisées ne semblent pas être une source notable de danger viral. Dans ces conditions, les épandages ne sont pas considérés comme un facteur important de contamination de la ressource en eau.

Par ailleurs, les déchets (décharges et compostages) suivent en général un processus de collecte et de traitement efficace, qui limite énormément leur rôle potentiel dans la contamination virale des ressources.

Les compartiments environnementaux où les virus émis peuvent être retenus et persister, constituant ainsi une source secondaire virale potentielle, sont les sols, les eaux souterraines, les eaux de surface et les sédiments. Le sol semble, en général, constituer une barrière efficace au transfert des virus vers les nappes voire les denrées ; de plus, l'abattement mesuré dans la zone saturée (nappe) n'est pas négligeable. En revanche pour les eaux superficielles, la remise en suspension des sédiments contribue à une recontamination des masses d'eaux marines et environnementales. Le risque lié aux eaux de surface contaminées paraît également plus important en fonction de divers facteurs (principalement climatique et anthropique) pouvant être à l'origine de leurs contaminations.

Par effet de cascade, les ressources alimentaires comme les coquillages ou les végétaux, directement en contact avec les eaux de surface ou les eaux usées contaminées, sont des intermédiaires de contamination humaine importants (en quantité et en durée).

### **Question 5 : Quels sont les moyens mis en œuvre dans l'industrie agroalimentaire pour maîtriser le danger viral (démarche HACCP, démarche qualité...) ? Quel est l'impact des différents procédés utilisés en industrie agroalimentaire sur ce danger ?**

Selon la littérature (législation américaine relative au traitement de l'eau potable, norme Afnor relative aux tests d'efficacité virologique des désinfectants, directive pour des produits à risque dans l'industrie pharmaceutique) une réduction de 4 log (10 000 fois) du titre viral est nécessaire pour qualifier le traitement d'efficace. Toutefois, cette valeur devra être confrontée aux données de prévalence, en cours d'acquisition et futures, afin d'être adaptée aux évaluations du risque sanitaire et aux objectifs de sécurité alimentaire.

Sur le plan technologique, seule la stérilisation (température à cœur supérieure à 110°C durant plusieurs minutes) assure une très bonne sécurité au regard du risque viral. Cependant, des traitements thermiques de l'ordre de 90°C et plus, à cœur du produit et durant plusieurs minutes, démontrent, selon la littérature, une bonne efficacité sur différents aliments (chair de coquillages, purée de fraises par exemple). Toutefois, l'efficacité virucide d'un traitement thermique est très dépendante de la matrice et du virus étudié ; il est donc difficile de généraliser l'efficacité virucide de traitements moins drastiques.

On dispose de peu de données pour les autres technologies dont certaines connaissent quelques applications industrielles (hautes pressions par exemple).

L'utilisation de molécules désinfectantes est soumise à autorisation réglementaire, peu d'entre elles peuvent être utilisées comme auxiliaire technologique. Le chlore, l'acide peracétique et le système lactopéroxydase sont autorisés pour le lavage des salades pré-découpées mais s'ils sont bactéricides, leur activité virucide au contact des aliments reste à démontrer. Sous l'angle des désinfectants, peu de données sont disponibles au regard des virus transmissibles par les aliments et sur leur action dans l'environnement d'un atelier de production. De plus, la présence de biofilms potentiels est susceptible de limiter l'efficacité de ces désinfectants.

L'évaluation du risque viral lié à un aliment produit de façon industrielle reste complexe car celui-ci peut subir différents procédés durant son itinéraire technologique ; par exemple, il est susceptible de connaître plusieurs traitements thermiques selon son stade de transformation (matière première, produit semi élaboré, produit fini) aux effets encore méconnus sur les virus qui le contamineraient.

La réduction du risque passe par la mise en place d'un plan d'analyse des dangers - points critiques pour leur maîtrise (HACCP-Hazard Analysis and Critical Control Points) qui sera d'autant plus pertinent que les données utilisées seront robustes et représentatives de la réalité de terrain (prévalence sur les matières premières, efficacité des technologies, interactions avec les constituants de l'aliment, survie dans l'environnement de production...).

### **Question 6 : Quel est l'impact des mesures prises aux différentes étapes de production et de distribution d'eau des réseaux publics sur la maîtrise du danger viral ?**

Le rapport propose un rappel descriptif des différentes étapes de la production et de la distribution d'eau destinée à la consommation humaine. Un état de la situation française fait apparaître que pour la majorité des installations (90 %), des traitements peu sophistiqués sont utilisés ; cependant ces installations ne concernent qu'un peu plus de 52 % du volume distribué. Le niveau de contamination virale, des ressources brutes est directement lié à leur vulnérabilité et aux activités présentes sur le bassin versant. Un cadre réglementaire présenté dans la Question 2 permet de maîtriser la qualité des ressources en eau brute.

Le rapport se concentre ensuite sur l'efficacité des différentes étapes des procédés de traitement (1) les traitements de rétention et (2) les traitements biocides. Chaque étape de traitement contribue en partie à l'élimination des virus dans l'eau ; il en résulte qu'**une procédure multi-barrières constitue la meilleure façon d'éliminer les virus**. L'usage combiné d'un indicateur bactérien et d'un indicateur phagique semble être un outil intéressant pour évaluer l'efficacité d'une filière de traitement.

(1) Les traitements de rétention consistent à adsorber les virus sur des supports. Différents facteurs jouent un rôle important dans l'efficacité des traitements : la présence d'oxyde métallique, le point isoélectrique des particules virales et la taille des colloïdes liés aux virus. Les traitements classiques de coagulation, floculation permettent de neutraliser les particules colloïdes négatives en les transformant en agrégats ou éléments floculants puis de les éliminer par filtration. Les virus, très bien adsorbés sur les matières en suspension (notamment les argiles), sont rapidement éliminés par ce traitement. L'ensemble de ces étapes de clarification

ne dépasse pas un abattement de 2 log. La pré-ozonation permet d'améliorer les résultats de l'étape de clarification. Pour les étapes de filtration qui suivent, les paramètres qui jouent un rôle primordial sont : le type de pré-traitement subi par l'eau, la vitesse de filtration et la granulométrie des milieux. La filtration lente a une efficacité de l'ordre de 2 log. Les membranes de microfiltration ne retiennent que les particules de plus de 0,1 micromètre et sont donc inefficaces sur les virus. Les membranes d'ultrafiltration, de nanofiltration et l'osmose inverse sont efficaces mais l'intégrité des membranes et l'étanchéité des joints sont primordiales et doivent être contrôlées.

- (2) L'efficacité des traitements biocides dépend de la concentration du désinfectant et du temps de contact (constante CT). Elle ne peut être évaluée qu'à partir de critères d'infectiosité et les résultats obtenus en laboratoire ou en essais pilotes – variables selon les conditions expérimentales – doivent être transposés aux installations industrielles avec précaution. L'ozone inactive efficacement les virus. Un résiduel de 0,4 mg/L d'ozone après 4 minutes de contact permet un abattement de 2 à 4 log. Les chloramines n'ont pas d'effet virucide alors que le chlore et le dioxyde de chlore sont de bons virucides mais leur action varie en fonction du pH. La comparaison des efficacités de l'ozone et du chlore pour inactiver les virus est en faveur de l'ozone. Comme c'est l'inverse pour les bactéries, les traitements proposés associent souvent ozone et chlore. Enfin, les rayonnements ultraviolets ont une action virucide. Une dose d'irradiation de 600 J/m<sup>2</sup> permet un abattement minimum de 4 log (sauf pour l'adénovirus qui nécessite 1000 J/m<sup>2</sup>).

En France, 78,5 % des unités de distribution sont conformes au regard de leur qualité microbiologique telle qu'elle est évaluée par le contrôle sanitaire ; la population exposée au moins une fois par an à des eaux non conformes sur le plan microbiologique (au sens du code de la santé publique) est estimée à environ 5,8 % soit 3 millions de personnes. Les zones où les unités de distribution sont petites, morcelées (notamment en montagne) sont celles où les non-conformités microbiologiques sont les plus nombreuses. En France, l'impact sanitaire global lié à la qualité microbiologique de l'eau est actuellement mal évalué, en raison de la mauvaise connaissance du niveau de contamination des eaux par les virus et à l'absence d'investigation systématique des épidémies d'origine hydrique. L'amélioration de la situation repose sur la mise en place d'une meilleure connaissance épidémiologique, mais aussi sur une surveillance de la qualité de l'eau, et surtout sur des mesures portant sur la qualité de la ressource, sur le traitement, sur les réseaux de distribution d'eau et la mise en place d'une démarche globale d'évaluation et de gestion du risque de la ressource au robinet du consommateur.

### **Question 7 : Quels systèmes de détection de situation d'alerte existent et quelles investigations en situation d'alerte ?**

L'alerte correspond à toute information faisant état d'une possible menace pour la santé publique pouvant nécessiter une réponse ou une action de la part des destinataires, avec un degré d'urgence éventuellement précisé. La notification des phénomènes anormaux conduisant à l'alerte est d'origine variée : déclaration obligatoire, réseau de surveillance, acteurs de la santé ou autres personnes (élus, particuliers, etc.).

L'alerte donnée, les investigations épidémiologiques comprennent une phase descriptive qui permet de générer des hypothèses sur la source de l'épidémie qui seront testées par une enquête analytique de type cas-témoin.

Les investigations virologiques sont à réaliser de façon concomitante aux investigations bactériologiques et parasitologiques. Elles devraient reposer sur un réseau de laboratoires impliqués en santé humaine, hygiène des aliments et hygiène de l'eau. Ceci souligne la nécessité d'une structuration, sous forme de réseau, des laboratoires impliqués dans la détection des virus et d'autres microorganismes dans les matrices alimentaires et l'eau. À cette fin, il est important de disposer de laboratoires de référence, notamment pour les principales catégories de matrices alimentaires concernées (coquillages, eau, végétaux).

Si l'alerte provient de la détection d'un ou plusieurs agents viraux dans l'eau de consommation ou sur un aliment, la première étape de l'investigation a pour objectif de déterminer si la contamination détectée est à l'origine d'un excès de cas de pathologies. La suite des investigations épidémiologiques est celle décrite précédemment.

Les investigations environnementales ont pour objectif d'identifier les causes de la contamination de l'eau ou de l'aliment afin de prendre les mesures pour mettre fin à l'épisode en cours. L'enquête recherchera l'origine des produits, une éventuelle contamination à la production ou lors d'un stockage, lors de la manipulation de l'aliment par une personne excrétrice du virus.

La nature des mesures de contrôles et de prévention et leur mise en œuvre sont déterminées en fonction des résultats des investigations ; elles doivent être adaptées aux situations locales et décidées en concertation avec les partenaires concernés.

Une réponse rapide et efficace à une situation épidémique d'origine hydrique nécessiterait de développer au niveau départemental un partenariat à compétences multiples.

Les conditions de retour à la normale sont à déterminer pour chaque situation. Une surveillance renforcée doit être maintenue lors de la réouverture d'un système de distribution d'eau ou la remise sur le marché des aliments.

## **Question 8 : Quels sont les résultats de l'analyse des publications dans le domaine de l'Appréciation Quantitative des Risques alimentaires liés aux virus ?**

L'analyse des publications dans le domaine de l'appréciation quantitative des risques (AQR) répond à différents objectifs. Le premier est d'évaluer la fiabilité et la robustesse des résultats obtenus par ces approches, notamment au regard des hypothèses formulées et qui servent parfois de normes sur le plan international. Le second objectif est d'identifier les données qui ont été utilisées par ces approches AQR et les facteurs qui ont été pris en considération ou non. Le troisième objectif est un objectif prospectif : à quels exemples de questions de gestion du risque les approches AQR virus/aliments peuvent-elles répondre, quel contexte faut-il définir (population étudiée, virus), comment pourrait être construit un modèle d'AQR satisfaisant sur le plan méthodologique, sur quel indicateur sanitaire, quelles seraient les données disponibles en France et lesquelles font le plus défaut ? Le plan de l'analyse suit la démarche classique de l'approche quantitative des risques en microbiologie des aliments. L'évaluation de l'exposition montre que le principal défaut des approches AQR dans le domaine viral est lié au manque de données quantitatives sur la contamination de l'eau ou des aliments par les virus concernés, à savoir les calicivirus, les virus des hépatites, rotavirus, adénovirus... La contamination est alors extrapolée à partir de virus cultivables (entérovirus ou indicateurs bactériens), parfois à l'aide de ratios qui ne sont pas scientifiquement justifiés. Les étapes suivantes, concernant la survie ou l'efficacité de traitements sont aussi, le plus souvent, abordées par extrapolation. Le traitement effectué par les consommateurs n'est, quant à lui, jamais pris en compte, probablement car il est mal évalué. La consommation est prise en compte selon une valeur moyenne ou extrême, selon les approches. À ce propos, il faut noter l'existence de données de consommation françaises qui permettraient de mieux estimer une consommation de la population générale avec la prise en compte de sa variabilité. La caractérisation des dangers montre aussi des limites : afin de mener une approche la plus sécuritaire possible, la relation dose-infection de rotavirus est le plus souvent extrapolée à tous les virus transmissibles par voie alimentaire, avec une simplification de la relation mathématique qui n'est pas réellement satisfaisante (cf. Question 9). La relation dose-infection sur les autres principaux virus d'intérêt, à savoir les calicivirus et les virus des hépatites n'est pas actuellement disponible. Il faudra, de toute façon envisager de mieux valoriser ou de compléter les résultats d'études épidémiologiques en vue d'apporter les données permettant de valider ou de construire des modèles de relation dose-infection, dose-maladie, dose-mortalité, sur la population générale ou pour des populations plus sensibles. La part attribuable aux aliments et la part attribuable à la transmission inter-humaine peuvent être étudiées par l'investigation épidémiologique, qui peut apporter des éléments à la modélisation. Suivant les méthodes et les critères, on peut noter que la part attribuable aux aliments pour un même virus peut être très différente (ex : norovirus), ce qui pose problème. De nouvelles approches d'AQR permettront de voir l'effet immédiat de la contamination des aliments, mais aussi de comptabiliser les cas liés à une transmission secondaire inter-humaine. On aurait alors les moyens de mieux appréhender l'impact sanitaire d'une contamination alimentaire par ces virus. De nouveaux indicateurs sanitaires sont définis par l'OMS, prenant en compte la sévérité et la durée des symptômes (DALY) ; là encore, les données françaises, qui ne sont pas actuellement disponibles, pourraient valider ou non les valeurs choisies sur le plan international pour tel ou tel virus responsable de gastroentérites. La caractérisation des risques est menée de façon simplifiée, par des approches déterministes, ne permettant pas la mise en évidence de la variabilité ni de l'incertitude. Il n'y a pas non plus d'analyse de sensibilité mise en place ni de réelle validation des modèles existants. Les questions de gestion auxquelles pourraient répondre les approches AQR sont cependant nombreuses, et peuvent être classées par type d'aliment, à savoir eau de distribution, coquillages et végétaux maraîchers (le VHE n'est pas envisagé) et en fonction du stade de « la vie du produit ». En effet, il n'est pas possible d'agir sur les consommateurs, sauf en les sensibilisant davantage à l'hygiène et à la préparation des aliments, ou par la vaccination, ce qui ne sera pas abordé ici.

Il est envisageable d'améliorer les modèles d'AQR existants, pour des couples virus/aliments à condition de définir les types de résultats réellement fiables et exploitables pour la gestion du risque.

### **Question 9 : Quels sont les pré-requis à l'élaboration d'une stratégie d'échantillonnage d'eau et d'aliments pour évaluer une contamination virale, au regard d'une approche d'AQR ?**

Dans l'eau et les aliments, le suivi des différents dangers microbiens est effectué à l'aide d'indicateurs bactériens, qui ne sont pas forcément toujours corrélés à la présence de pathogènes et notamment des virus entériques. De plus, ces indicateurs ne révèlent pas la nature du virus auquel les consommateurs seraient éventuellement confrontés. Un contrôle virologique des aliments ou de l'eau pourrait servir à mieux évaluer l'exposition des consommateurs aux infections virales d'origine alimentaire, ou à améliorer la sécurité alimentaire. La première question à laquelle sont confrontées les autorités sanitaires est comment mettre en place un tel suivi. Malgré les limites évoquées dans la question 3, l'outil de RT-PCR ou de PCR en temps réel est actuellement le seul outil de détection capable d'être utilisé dans le cadre d'une surveillance des principaux virus transmissibles par voie alimentaire, à savoir les norovirus et le virus de l'hépatite A. Le niveau de concentration de virus à rechercher dépend du niveau de risque considéré comme acceptable, et les évaluateurs du risque ne disposent pour cela que de données internationales. Une approche par la méthodologie d'appréciation quantitative du risque appliquée au domaine de l'eau de distribution montre l'importance du volume choisi pour un prélèvement, du nombre de prélèvements à effectuer pour une concentration donnée de virus. L'efficacité théorique d'un plan de surveillance est extrêmement dépendante des performances de l'outil de détection, de la dispersion des virus (avec agrégats ou non) et pour une évaluation du risque sanitaire, de la proportion de génomes issus de virus infectieux sur le nombre de génomes totaux.

À titre d'exercice, à partir d'une contamination théorique en génomes de norovirus dans l'eau de distribution, il a été tenté d'établir le risque sanitaire pour des consommateurs d'eau du robinet de plus de 15 ans, à l'aide de deux critères sanitaires, à savoir le risque d'infection pour 10.000 et un coût sanitaire exprimé en DALY (cf. définition développée dans la Question 8). Cette approche tient également compte des récentes découvertes sur la sensibilité différente des personnes aux infections à norovirus, liée à l'existence d'un récepteur spécifique aux virus. La dose-réponse pour les rotavirus a été extrapolée ici aux norovirus, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus par des expériences réalisées sur des volontaires exposés aux norovirus, mais non publiés (Teunis, communication personnelle). Cependant, de nombreuses hypothèses ont dû être formulées, et l'estimation la plus difficile concernait pour l'eau de surface sans traitement, le calcul du ratio entre le nombre de virus infectieux et le nombre total de génomes détectables par les outils de biologie moléculaire. Cette estimation serait à relier au contexte, comme le montrait le logigramme de la Question 3. Toutefois, l'utilisation des deux critères sanitaires, avec des valeurs cibles définies pour chacun d'eux sur le plan international, va aboutir, dans le cas des norovirus, à des choix de concentration limites différents, plus sécuritaire, si on utilise le risque d'infection que le coût sanitaire en DALY. Le critère DALY/an oblige, dans ce cas, à réfléchir à des niveaux de concentrations acceptables différents pour chaque virus, suivant la gravité des symptômes, voire pour chaque classe d'âge. L'exercice ainsi réalisé souligne les facteurs à étudier en priorité pour mieux évaluer l'exposition des consommateurs et évaluer le gain d'un contrôle virologique, en plus d'un contrôle microbiologique. Il en découle : la nécessité d'améliorer les performances des tests ; de mettre en place des études visant à mieux connaître le niveau de contamination virale dans l'eau et les aliments, et de relier ceux-ci aux indicateurs ; d'évaluer la part de virus infectieux par rapport aux non infectieux d'étudier le devenir de ce pouvoir infectieux en fonction des traitements et des paramètres physico-chimiques de l'eau ou des aliments. D'autre part, il faudrait estimer de façon quantitative et plus précise la morbidité et la mortalité liées aux différents virus en vue d'une estimation du coût en DALY. D'une façon générale, il est nécessaire d'améliorer les investigations épidémiologiques de manière à recueillir davantage d'informations utilisables pour une AQR et valider ou infirmer les hypothèses retenues dans la modélisation. Le modèle que nous avons utilisé ne tient pas compte de la transmission inter-humaine. Toutefois, il serait important d'estimer ce paramètre, qui est directement lié au risque d'incidence accrue d'une infection virale dans la population générale. Malgré toutes ces limites, l'avancée rapide des connaissances rend de plus en plus envisageable l'idée d'un contrôle virologique pour certains produits à certaines phases de leur production.

### **Question 1: What are the most up-to-date scientific data concerning the risk of food and drinking water being contaminated by enteric viruses ?**

Viruses can be passed on to humans in various ways. The working group decided in its deliberations only to consider enteric viruses which have been shown to carry a risk of transmission to humans through ingestion of contaminated food or water, which poses problems in the food processing and water supply sectors. The work of the group therefore addressed the risks of transmission to humans from food and drinking water for the following viruses: rotaviruses, noroviruses, sapoviruses, astroviruses, adenoviruses 40 and 41, hepatitis A virus, hepatitis E virus, enteroviruses, parechoviruses and reoviruses.

These are non-enveloped viruses, most of which have an RNA genome. Only the adenovirus genome is composed of DNA. The stability of virions to acid pH allows them to cross the gastric barrier and infect the intestine or other target organs. These viruses are transmitted by the faeco-oral route.

They are not unique in their host species. Hepatitis A virus is strictly human whereas hepatitis E virus has zoonotic potential. The species barrier is not strict for other agents such as rotaviruses, although the main reservoir for human strains is generally humans: for the noroviruses, although they have been isolated from humans, cattle, pigs and mice, there is at present no proof that a zoonosis exists.

The enteric viruses are responsible for gastroenteritis or hepatitis. Various clinical forms exist however and asymptomatic infections are common. There is no at-risk population group for any of these viruses, even if the weakest people (very young children, the elderly or those suffering from malnutrition) are exposed to the harmful consequences of infections from gastroenteritis viruses. Some uses in wastewater treatment plants, sewer systems and tourism in endemic areas cause exposure to hepatitis A and E viral infections. The risk of infection from hepatitis A virus and the polioviruses may be prevented by vaccination and the implementation of hygiene measures is effective for all viruses.

Viruses are excreted in faeces and contaminate the environment. They are unable to multiply in the absence of host cells but may persist and remain infectious for several days or even weeks, particularly at low temperatures and in the presence of particles. Faeco-oral transmission is by far the most common route and, depending on the viruses, may occur either directly from person to person (for example, the rotaviruses) or indirectly through the consumption of contaminated water (for example hepatitis E virus) or food (for example noroviruses). The incubation periods (up to 6 weeks for hepatitis A) often make it difficult to identify the route of transmission.

The presence of these viruses is detected in biological substances, water or food matrices by identifying the infectious potential or viral genomes or antigens. For water and food, a preliminary concentration stage is usually required. Molecular biology techniques (PCR or RT-PCR) are also used for more detailed characterisation of the viruses involved in epidemics. Detection of the genome of a virus does not prove that it has infectious properties, associated with the replication of the virus in cells. Unfortunately, most of these viruses, such as noroviruses and sapoviruses, are difficult or even impossible to culture on cells. Information on the survival or resistance of these viruses to treatments is often deduced by analogy with information obtained from a similar virus.

Food and water are one of the major sources of contamination by these viruses, which cause epidemics. Of the enteric viruses, the major viruses in terms of health risk are the noroviruses and hepatitis A virus. Rotaviruses also pose a public health problem, although this is due above all to the scale of the recurrent winter epidemics which occur in infants and carry a risk of dehydration which may result in hospitalisation. The other viruses pose a lower health risk which, for some, is minimal or is still to be demonstrated.

Viral risk requires management measures to be applied at the different stages of water and food production. Management of water resources and hygiene rules may be combined with chemical (chlorine, ozone) or physical (particularly heat) treatments depending on the nature of the substances to be treated. Their application and monitoring of their effectiveness are partly regulated by French and European regulations.

## **Question 2: What is the current, national and international regulatory framework for viruses in dietary sources (food and drinking water)?**

Various measures affecting the entire water production and supply chain ensure that **drinking water is safe through obligatory measures and obligatory results**. The regulatory framework states that "water intended for human consumption shall be wholesome and clean if it is free from any micro-organisms and parasites and from any substances which, in numbers or concentrations, constitute a potential danger to human health".

The regulatory measures are designed to:

- protect the resource by installing a protective perimeter around water abstraction points: immediate, close and possibly distant protection;
- adapt the water treatment to the resource;
- monitor compliance of the water microbiological quality using microbiological and physico-chemical indicators.

Viruses, however, are not tested for routinely and the relevance of microbiological indicators to indicate the presence of viruses in water is debatable. If an abnormal amount of one or more micro-organisms above the regulatory limit is detected in one (or more) sample(s) of water from the same origin, a procedure to be followed is proposed in a CSHPF (The French Superior Committee of Public Health) opinion which may lead to testing for viruses in the water.

Article R. 1321-24 of the Code of Public Health encourages the establishment of a quality assurance plan within the production and supply system with, in particular, a regular risk assessment including identification of the critical points and actions to control risks and the use of checks and effective monitoring at these points.

The regulations proposed in other European or North American countries are also presented in this document.

**For food hygiene**, there are at present no French or European regulatory texts for food setting regulatory microbiological criteria for viruses.

On a European level, the Commission regulation of 15 November 2005 No. 2703/2005 on microbiological criteria for foodstuffs which came into application in all Member States on 1 January 2006, forms part of the European regulatory reforms for food hygiene. Regulation (EC) No. 2073/2005 also recalls in its first consideration that obtaining a high level of protection for human health and animal welfare is one of the fundamental objectives of food legislation, as stated in Regulation (EC) No. 178/2002. It stresses that microbiological risks from food are a major source of foodborne diseases in humans. It recalls that the safety of foods is mainly ensured by prevention, such as the use of good hygiene and manufacturing practices and application of HACCP principles (hazard analysis-critical control points). Following from this, microbiological criteria may be used to validate and check procedures based on the HACCP principles and other hygiene control measures. It is therefore appropriate to establish microbiological criteria which define the acceptability of these procedures and microbiological safety criteria setting a limit beyond which a food must be deemed to be contaminated unacceptably by the micro-organisms for which the criteria have been set.

Regulation (EC) No. 2073/2005 states in its second consideration that food must not contain micro-organisms or their toxins or metabolites in amounts which represent an unacceptable risk to human health. Bacteria, viruses, yeasts, moulds, algae, parasitic protozoa, microscopic parasitic helminths and their toxins and metabolites are also defined under the term micro-organism in this regulation. Viruses are therefore included in this framework. Nevertheless, no regulatory microbiological criterion has been set for viruses in any food matrix: particularly because of an absence of sufficiently reliable analytical methods. The regulation states in its 27<sup>th</sup> consideration that criteria applicable to pathogenic viruses in live bivalve molluscs should be set in particular if the analytical methods are sufficiently developed.

In addition, Regulation (EC) no. 2073/2005 states in its 12<sup>th</sup> consideration that on 30 and 31 January 2002, the CSMVSP issued an opinion on Norwalk viruses (or noroviruses). In its opinion the Committee reached the conclusion that conventional faecal indicators did not reliably detect the presence or absence of Norwalk virus and that removing faecal bacterial indicators to establish the purification times for molluscs was a hazardous practice. The Committee also recommended that E. coli be used instead of faecal coliforms to determine faecal contamination in mollusc collecting areas when bacterial indicators were used.

E. coli is therefore the indicator which is recommended for shelled and shucked products of cooked crustaceans and molluscan shellfish, which allows the quality of the batches analysed to be tested.

Development of analytical methods appears essential before setting criteria applicable to pathogenic viruses in live bivalve molluscs. A working group has been set up to do this in order to validate a horizontal method used to detect noroviruses and HAV in foods using real-time RT-PCR (CEN/TC275/WG6/TAG4 group).

### **Question 3: How is the presence of viral genome in food matrices and water interpreted in terms of potential infectivity?**

*In view of the low density of viruses which may be present in water or food it is essential that, prior to detection, viral concentration techniques are used for water or extraction/concentration techniques for food and other solid matrices. Viral concentration in a volume of water is based on the principle of adsorption-elution, often followed by a secondary concentration step (protein precipitation, ultrafiltration or ultracentrifugation). Viral concentration from food matrices uses extraction/concentration techniques. Depending on the detection technique chosen, a detoxification treatment (cell culture) or inhibitor removal stage (PCR for untreated wastewater or seawater) will need to be added.*

*Three detection techniques are available. Cell culture is sensitive, specific and quantitative for viruses able to multiply in cell cultures, although it does not allow noroviruses, sapoviruses or hepatitis E virus to be detected and is limited to a few laboratory strains for hepatitis A virus, rotaviruses, astroviruses and adenoviruses. Amplification of part of the viral genome by RT-PCR or PCR allows all viral strains of known sequence to be detected. This is a sensitive, specific and fast technique which is quantitative under certain conditions. Combining these two techniques – cell culture/RT-PCR or PCR – is particularly sensitive, but does not allow viruses which cannot be cultured to be detected.*

*Gene amplification techniques (RT-PCR or PCR) are the most suitable for the virological testing of waters and food. Finding a viral genome to be present, however, does not indicate that it is infectious, which is the major criterion for risk managers. These highly sensitive techniques also carry large risks of false negatives and false positives which require appropriate and strict quality assurance measures. On the basis of current knowledge it is difficult to link the presence of a viral genome to the presence of the corresponding infectious virus. The kinetics of genome degradation are poorly understood and the presence of a viral genome may indicate past contamination, particularly after disinfectant treatment. Nevertheless, whilst the presence of a viral genome may overestimate the risk of infection, its absence is, conversely, under the quality assurance conditions required, synonymous with the absence of infectious virus.*

*It is difficult and expensive to consider systematic testing for all of the enteric viruses which are pathogenic to humans in water and food. Indirect indicators or faecal pollution are therefore used. These must be representative of the enteric viruses, non-pathogenic, carry no risk to the environment and be inexpensive. Coliforms, somatic coliphages, F-specific bacteriophages or Bacteroides fragilis phages can be useful agents for assessing the effectiveness of a treatment. However, there is currently no ideal indicator for the estimation of viral contamination in water, food or in the environment. It is therefore important to interpret results with caution and take account of other influencing factors, particularly the source and nature of the water.*

*These issues about the significance of the presence of a viral genome in water and food in terms of potential infectivity demonstrates the difficulty of interpreting a positive result obtained by molecular biology techniques. It has become apparent that an interpretative flow diagram needs to be constructed for a positive result, which would be a practical and concrete tool for risk managers. Incorporating additional data (such as microbiological and physico-chemical criteria, the environmental context, epidemiological data and possibly other infectivity criteria) into this flow diagram allows a positive RT-PCR or PCR result to be weighted. Depending on the data available for each of these components, the flow diagram presents three possible interpretative scenarios: 1) high likelihood of a hazard being present or established presence of a hazard; 2) low likelihood of a hazard being present; 3) uninterpretable result.*

### **Question 4: What are the health risks from the possible environmental sources and reservoirs of these viruses?**

*Starting from the conceptual context of food contamination from environmental reservoirs described at the beginning of this question, it appears that the different findings should be weighted to take account of the specific circumstances of exposure to the hazards and the associated risks.*

*Primary sources of the virus (true reservoirs or reservoirs emanating from these) have been identified. These consist of treated wastewater and its derivatives (sludge, purified water) and in terms of zoonotic potential, animals and their waste.*

*In terms of animal sources, some species (pigs, ruminants, rodents, lagomorphs) appear to be obvious possible sources for human contamination with hepatitis E virus and rotaviruses. These viruses appear to be increasingly transmitted between species, and in view of the high carrier rate in animal species and their resistance in animal waste or in the external environment, particular attention should be paid to them. Noroviruses are not currently considered to be overt zoonotic agents, although have potential for transmission which should be further studied.*

*There is little information on the viral contamination of wastewater. The number and wide range of viruses present in water arriving at wastewater treatment plants (WWTPs) depend to a large extent on the state of health of the population served by the treatment plant. Removal of viruses in the WWTP is rarely complete and will depend on the treatment processes. Excess water, however, particularly due to bad weather conditions, may result in overflow of untreated water into natural water sources. The risk of sustained contamination of the environment and food dependent on this water is then increased.*

*The purification processes (thermophilic treatment, composting, liming) for sludge from wastewater treatment plants, if followed, greatly reduce enteric viruses. When the regulatory measures stipulating conditions for use are also considered, wastewater treatment plant sludge, even if not rendered hygienic, does not appear to be a significant source of viral hazard. Under these conditions, sludge spreading is not considered to be a key factor in the contamination of water sources.*

*In addition, waste (rubbish dumps and composting) generally follows an effective collection and treatment process which enormously reduces their potential for viral contamination of water sources.*

*The environmental compartments in which excreted viruses may be retained and persist, therefore forming a secondary potential source of virus, are soils, underground water, surface water and sediments. Soil in general appears to be an effective barrier to the transfer of viruses to groundwater and even food: in addition, significant viral reduction is found in the saturated area (groundwater). For surface water, however, resuspension of sediments contributes to the recontamination of sea and environmental water. The risk from contaminated surface water also appears to increase depending on various factors (mostly weather and human activities) which may result in the contamination.*

*Through a cascade effect, food resources such as shellfish or plants in direct contact with surface water or other contaminated wastewater are major intermediaries in human infection (both in quantity and duration).*

**Question 5: What are the measures used in the food processing industry to manage the viral hazard (HACCP approach, quality approach, etc.)? What is the impact of the different procedures used in the food processing industry on this hazard?**

*According to the literature (American legislation on the treatment of drinking water, Afnor standard on tests for the virological effectiveness of disinfectants, directive for at-risk products in the pharmaceutical industry), a reduction in viral amount of 4 log (10,000 times) is required in order to describe the treatment as being effective. This value must, however, be interpreted against the prevalence data (currently being acquired and future data) in order to be adapted for health risk assessments and food safety objectives.*

*In technological terms, only sterilisation (core temperature above 110°C for several minutes) provides very high safety against viral risk. Heat treatments in the region of 90°C and above at the core of the product lasting for several minutes have nevertheless, according to the literature, been shown to be very effective on different foods (for example, shellfish flesh, strawberry puree). But the effectiveness of a heat treatment on viruses depends largely on the matrix and virus studied: it is therefore difficult to generalise the virucidal effectiveness of less extreme treatments.*

*Limited information is available for the other technologies, some of which have a few industrial applications (for example, high pressures).*

*The use of disinfectants is subject to regulatory approval and few can be used as a processing aid. Chlorine, peracetic acid and the lactoperoxidase system are permitted for washing pre-cut salads, but whilst these are bactericidal, their virucidal activity in contact with food is yet to be demonstrated. For disinfectants, limited information is available on viruses which can be transmitted by foods and on their action on the environment of a production unit. The presence of potential biofilms is also liable to reduce the effectiveness of these disinfectants.*

*Assessment of the viral risk from an industrially produced food remains complex as the food may undergo different procedures during its technological process: it is liable, for example, to undergo several heat treatments depending on its stage of processing (raw material, semi-finished product, finished product) the effects of which on potentially contaminating viruses are still poorly understood.*

*Risk reduction involves the institution of a HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) plan which will be increasingly relevant if the data used are robust and representative of the actual ground situation (prevalence in raw materials, effectiveness of technologies, interactions with the food ingredients, survival in the production environment, etc.).*

### **Question 6: What is the impact of measures taken at the different production and supply stages for the public water supply on controlling the viral hazard?**

The report describes the different stages of the production and supply of water intended for human consumption. A review of the French situation reveals that for most installations (90%), the treatments used are basic: these installations only concern slightly over 52% of the volume supplied, however. The level of viral contamination of untreated sources is directly related to their vulnerability and to the activities in their catchment area. A regulatory framework presented in Question 2 allows the quality of untreated water sources to be managed.

The report then concentrates on the effectiveness of the different stages of the treatment procedures (1) retention treatments and (2) biocidal treatments. Each treatment stage partly contributes to the removal of viruses from water: as a result **a multi-barrier procedure is the best way of removing viruses**. The combination of a bacterial indicator and a phage indicator appears to be a useful tool for assessing the effectiveness of a treatment sub-procedure.

(1) Retention treatments involve adsorbing viruses onto supports. Different factors play an important role in the effectiveness of the treatments: the presence of metal oxide, the isoelectric point of viral particles and the size of colloids bound to the viruses. Conventional coagulation-flocculation treatments neutralise negative colloid particles by converting them into aggregates or flocculates and then remove them by filtration. Viruses are extremely well adsorbed on to suspended materials (particularly clays) and are rapidly removed by this treatment. In combination, the reduction achieved by these clarification stages is no more than 2 log units. Pre-ozonation can improve the results of the clarification stage. For the following filtration stages the parameters which play a key role are: the type of pre-treatment the water undergoes, filtration speed and the granule size of the media used. Slow filtration has an effectiveness in the region of 2 log units. Micro-filtration membranes only retain particles over 0.1 micrometer and are therefore ineffective on viruses. Ultrafiltration, nanofiltration and reverse osmosis membranes are effective, although the integrity of the membranes and tightness of the joints are key factors and must be controlled.

(2) The effectiveness of biocidal treatments depends on the concentration of the disinfectant and the contact time (CT constant). It can only be assessed from infectivity criteria, and the results obtained in a laboratory or in pilot trials – which vary depending on the test conditions – must be extrapolated to industrial installations with caution. Ozone effectively inactivates viruses. A residual amount of 0.4 mg/L of ozone after 4 minutes contact produces a 2 to 4 log unit reduction. Chloramines do not have virucidal activity whereas chlorine and chlorine dioxide are good virucides, although their action varies depending on pH. A comparison of the effectiveness of ozone and chlorine in inactivating viruses shows ozone to be superior. In contrast to bacteria, the proposed treatments frequently combine ozone and chlorine. Finally, ultraviolet irradiation has virucidal activity. An irradiation dose of 600 J/m<sup>2</sup> produces a minimum reduction of 4 log units (except for adenoviruses which require 1,000 J/m<sup>2</sup>).

78.5% of supply units in France comply in terms of their microbiological quality, as assessed by health inspections: the population exposed at least once per year to water which does not comply microbiologically (in terms of the Code of Public Health) is estimated to be approximately 5.8% or 3 million people. Areas in which the supply units are small and divided up (particularly in mountainous regions) are those in which most microbiological non-compliances occur. The overall health impact of the microbiological quality of water in France has been little assessed at present because of a lack of knowledge about the level of viral contamination of water and the absence of systematic investigation of epidemics originating from water. To improve this situation, better epidemiological knowledge needs to be developed and water quality monitored, particularly through measures relating to quality of the source, treatment, water supply networks and the introduction of a global assessment and risk management initiative for consumer tap water.

### **Question 7: What are the existing systems to detect an alert, and what investigations in an alert context?**

An alert consists of any information describing a possible threat to public health which may require a response or action by the recipients, possibly with an explicit level of urgency. The notification of abnormalities raising the alert may come from various sources: compulsory declaration, monitoring network, health sector workers or other people (elected representatives, individuals, etc.).

Once the alert has been raised, the epidemiological investigations include a descriptive phase used to generate hypotheses about the source of the epidemic which will then be tested by a case control analytical study.

Virological investigations should be performed concomitantly with bacteriological and parasitological investigations. These are based on a network of laboratories involved in human health and food hygiene.

If the alert involves the detection of one or more viral agents in drinking water or in a food, the first investigation stage is designed to establish whether the contamination detected has resulted in an excess number of cases of disease. The subsequent epidemiological investigations are conducted as described previously.

Environmental investigations are designed to identify the causes of contamination of the water or food in order to take measures to end the current episode. The investigation will research the source of the products, and any contamination during production, storage or handling of the food by a person excreting the virus.

The nature of the control and preventive measures to be used and their application are established from the results of the investigations: they must be adapted to local situations and decided on in conjunction with the partners involved.

A multi-skilled partnership developed on a regional level is needed to provide a rapid effective response to the situation of an epidemic originating from water.

Conditions for returning each situation to normal should be established. Increased monitoring must be maintained when a water supply system is reopened or foods are put back on the market.

### **Question 8: What are the results of the analysis of publications on Viral Quantitative Risk Assessments on Foods?**

The analysis of quantitative risk assessment (QRA) publications has several purposes. The first is to assess the reliability and robustness of results obtained by these approaches, particularly in terms of the hypotheses made, which in some cases are applied as international standards. The second objective is to identify data which have been used by these QRA approaches, and factors which have or have not been taken into account. The third is a prospective objective: what examples of risk management questions can the virus/foods QRA approaches answer, what context must be defined (population studied, virus), how could a satisfactory QRA model be constructed methodologically, based on what health indicator, what data would be available in France and which are the most deficient? The analytical plan follows the traditional approach of quantitative risk assessment in food microbiology. Exposure assessment shows that the major defect of QRA approaches for viruses is due to a lack of quantitative data on contamination of water or food by the viruses concerned, i.e. the caliciviruses, hepatitis viruses, rotaviruses, adenoviruses, etc. Contamination is then extrapolated from culturable viruses (enteroviruses or bacterial indicators), sometimes using ratios which are not scientifically justified. The subsequent stages concerning survival or effectiveness of treatment are also usually approached by extrapolation. Treatment performed by consumers are never taken into account since it is probably poorly assessed. The mean or extreme consumption value is used depending on the approach. On this subject it should be noted that French consumption data exist which provide a better estimate of consumption in the general population, with variability taken into account. Hazard characterisation also has limitations: in order to use the most secure approach possible, the dose-infection relationship for rotaviruses is usually extrapolated to all other viruses transmittable through food using a simplification of the mathematical relationship which is not entirely satisfactory (cf. Question 9). The dose-infection relationship for the other major viruses of interest, i.e. the caliciviruses and hepatitis viruses, is not currently available. Consideration should nevertheless be given to improving the value or adding to results of epidemiological studies in order to provide data for validating or to construct dose-infection relationship, dose-disease and dose-mortality models in the general population or for more sensitive populations. The risk proportion attributable to foods and that attributable to inter-human transmission can be studied by epidemiological investigation which can bring information to the modelling. Depending on the methods and criteria used, the risk components attributable to foods for the same virus may be very different (e.g. norovirus), which is problematic. New QRA approaches will allow the immediate effect of food contamination to be seen and also cases due to secondary inter-human transmission to be counted. This would then provide the means for better understanding the health impact of food contamination by these viruses. New health indicators have been defined by the WHO taking account of the severity and duration of symptoms (DALY): here again, French data which are not currently available may or may not validate the values chosen internationally for a given virus responsible for gastroenteritis. Risk characterisation is simplified using determinist approaches which do not allow variability or uncertainty to be identified. In addition, no sensitivity analysis or real validation of the existing models is conducted. There are, however, many management questions which the QRA approaches could answer. These may be characterised by type of food, i.e. water supply, shellfish and cultivated vegetables (HEV is not considered) and depending on the stage in the "product life". It is impossible to act on consumers other than by increasing their awareness about hygiene and food preparation or by vaccination, which will not be considered here.

Existing QRA models could be improved for virus/food couples provided that the types of results which are truly reliable and can be used for risk management are defined.

**Question 9: What are the pre-requisites for constructing a water and food sampling strategy to measure viral contamination, as regards a QRA approach?**

*The different microbial hazards are monitored in food and water using bacterial indicators which do not necessarily correlate with the presence of pathogens, particularly enteric viruses. Furthermore, these indicators do not reveal the nature of the virus to which the consumers may be exposed. Virological testing of food or water could improve the assessment of consumer exposure to viral infections of food origin and improve food safety. The first question which the health authorities face is how to set up this monitoring. Despite the limitations described in question 3, RT-PCR or real time PCR is currently the only detection instrument which can be used to monitor for the major viruses transmissible in food, i.e. noroviruses and hepatitis A virus. The level of concentration of the virus to be tested depends on the level of risk which is deemed to be acceptable, and for which risk assessors only have international data. A quantitative risk assessment approach applied to the water supply shows the importance of the volume chosen for sampling and of the number of samples to be taken for a given concentration of virus. The theoretical effectiveness of a monitoring plan depends to a considerable extent on the performances of the detection instrument, the dispersion of the viruses (with or without aggregates) and, for a health risk assessment, the proportion of genomes coming from infectious viruses out of the total number of genomes.*

*As an exercise, the health risk to people over 15 years old from drinking tap water has been calculated from a theoretical norovirus genome contamination in tap water using two health criteria, the risk of infection per 10,000 and a health cost expressed in DALY (cf. definition shown in Question 8). This approach also takes account of recent discoveries on differing sensitivity of individual people to norovirus infections because of the existence of a specific receptor for the virus. The dose-response for rotaviruses has been extrapolated in this case to noroviruses, which is consistent with the results obtained from experiments conducted, but not published, on volunteers exposed to norovirus (Teunis, personal communication). Many hypotheses had to be made, however, and the most difficult estimate was calculating the ratio of the number of infectious viruses to the total number of genomes detectable by molecular biology tools for untreated surface water. This estimate is linked to the context as shown in the flow diagram in Question 3. But the use of the two health criteria, with target values defined for each on an international basis, leads in the case of noroviruses to different possible concentration limits, more secure if the risk of infection is used rather than the DALY health cost. In this case the DALY/year criterion requires different acceptable concentration levels for each virus to be considered depending on the severity of symptoms and even for each population age band. This exercise highlights the factors to be studied as a priority to improve assessment of consumer exposure and of the benefit gained from virological testing in addition to microbiological tests. Following from this: there is a need to improve test performances; to set up studies intended to improve knowledge of viral contamination levels in water and food and to link these to the indicators; to assess the proportion of infectious viruses to non-infectious viruses and to study the fate of the infectious potential depending on treatments and the physico-chemical features of the water or food. In addition, a quantitative and more precise estimate of morbidity and mortality of the different viruses must be obtained to conduct a DALY cost estimate. Epidemiological investigations need to be improved in general in order to collect more usable information for a QRA and to confirm or invalidate the hypotheses made in the model. The model we have used does not take account of inter-human transmission. It would be important to estimate this factor however as it is directly linked to the increased risk of incidence of a viral infection in the general population. Despite all of these limitations, the rapid advances in knowledge make the concept of virological testing for products at some phases in their production increasingly envisageable.*



### Contexte et justification du projet

L'Afssa s'est auto-saisie le 12 novembre 2003 sur la thématique relative aux « virus transmissibles à l'homme par voie orale ». Cette auto-saisine, initiée par le Comité d'experts spécialisé « Microbiologie », fait suite à plusieurs considérations :

- la réception d'une saisine de l'Afssa par la direction générale de la Santé (DGS), le 23 avril 2002, dans le cadre du Comité d'experts spécialisé (CES) « Eaux », relative à « l'évaluation du risque sanitaire lié à la présence éventuelle de fragments de génome du virus Norwalk-like dans certaines eaux minérales, naturelles, européennes embouteillées », faisant suite à la parution de l'article de Christian Beuret <sup>(1)</sup>, relatif à la détection de fragments de génome du Norwalk-Like virus dans des eaux minérales naturelles embouteillées (saisine n° 2002-SA-0118) ;
- suite au projet de mise en place d'un protocole de recherche de virus dans les eaux de distribution publique de deux départements, l'Afssa est saisie (saisine n° 2003-SA-0379) par la DGS dans le cadre des travaux du groupe de travail sur le besoin d'apporter des précisions concernant le volet analytique de la recherche des virus dans l'eau ;
- la réflexion sur l'inclusion des virus dans la réglementation, dans le cadre de la révision des critères microbiologiques (réflexions nationale et communautaire) applicables aux denrées alimentaires ;
- diverses sollicitations de professionnels et de particuliers, adressées à l'Afssa, sur cette thématique.

### Objectifs du groupe de travail

Le groupe de travail dénommé « Virus transmissibles à l'homme par voie orale » de l'Afssa est chargé de l'évaluation des risques pour la santé publique liés à la présence de virus transmissibles à l'homme dans les aliments et les eaux destinées à la boisson. Pour cela, la réflexion s'articule autour des questions structurantes suivantes :

Question	Intitulé
Question 1	Quelles sont les données scientifiques les plus actualisées concernant le risque lié à la contamination des denrées alimentaires et des eaux de consommation par les virus entériques ?
Question 2	Quel est le cadre réglementaire actuel, national et international, concernant les virus dans les aliments (denrées et eaux de consommation) ?
Question 3	Comment interpréter la présence de génome viral dans des matrices alimentaires et en milieu hydrique en termes d'infectiosité potentielle ?
Question 4	Quels sont les risques sanitaires liés aux possibles sources et réservoirs environnementaux de ces virus ?
Question 5	Quels sont les moyens mis en œuvre dans l'industrie agroalimentaire pour maîtriser le danger viral (HACCP, qualité...) ? Quel est l'impact des différents procédés utilisés en industrie agroalimentaire sur ce danger ?
Question 6	Quel est l'impact des mesures prises aux différentes étapes de production et de distribution d'eau des réseaux publics sur la maîtrise du danger viral ?
Question 7	Quels systèmes de détection de situation d'alerte existent et quelles investigations en situation d'alerte ?
Question 8	Quels sont les résultats de l'analyse des publications dans le domaine de l'Appréciation Quantitative des risques alimentaires liés aux virus ?
Question 9	Quels sont les pré-requis à l'élaboration d'une stratégie d'échantillonnage d'eau et d'aliments pour évaluer une contamination virale, au regard d'une approche d'AQR ?

(1) Beuret C., Kohler D., Luthi T. Norwalk-like virus sequences detected by reverse transcription-polymerase chain reaction in mineral waters imported into or bottled in Switzerland. J Food Prot. 2000 Nov; 63(11): 1576-82.

## **Composition du groupe de travail**

Ce groupe pluri-disciplinaire est constitué d'experts compétents dans les domaines requis par ses objectifs : épidémiologie, virologie médicale et vétérinaire, hydrogéologie, analyse des eaux, etc.

## **Fonctionnement du groupe de travail**

En juillet 2004, une réponse a été apportée à la demande « d'évaluation du risque sanitaire lié à la présence éventuelle de fragments de génome du virus Norwalk-like dans certaines eaux minérales, naturelles, européennes embouteillées ». Dans cet avis, l'Afssa souligne que les résultats des études menées par la suite, n'ont pas confirmé cette présence et estime que la détection de génomes viraux ne permet pas de témoigner systématiquement de la présence de particules virales complètes et encore moins de leur caractère infectieux. Elle souligne qu'en l'état actuel des connaissances, le contrôle de routine des eaux minérales par les techniques de biologie moléculaire ne permet pas caractériser de façon indiscutable un risque infectieux lié à ces eaux.

Par ailleurs, une réponse à la question 3 : « Comment interpréter la présence de génome viral dans des matrices alimentaires et en milieu hydrique en termes d'infectiosité potentielle ? » a été publiée de manière indépendante en novembre 2005. Elle permet d'aboutir à la construction d'un logigramme d'interprétation d'un résultat positif par les techniques de biologie moléculaire.

Sur le plan pratique, chaque question a fait l'objet d'une rédaction par plusieurs experts du groupe, aidés si besoin par des experts extérieurs.

La progression du travail du groupe a fait l'objet de présentations régulières au sein des CES « Microbiologie » et « Eaux », puis d'une présentation en fin de parcours à ces deux CES.

L'ensemble des personnes qui a contribué à l'élaboration et/ou à la validation de ce rapport ainsi que toutes les personnalités scientifiques qui ont été consultées figurent en début de ce document.

**Question 1 : Quelles sont les données scientifiques les plus actualisées concernant le risque lié à la contamination des denrées alimentaires et des eaux de consommation par les virus entériques ?**



## Question 1 : Quelles sont les données scientifiques les plus actualisées concernant le risque lié à la contamination des denrées alimentaires et des eaux de consommation par les virus entériques ?

*Coordinateur de la question : M. Lina*

*Co-rédacteurs et personnes sollicitées : Mme Brachet, M. Chomel, M. Dubois, Mme Dussaix, M. Le Faou, Mme Le Guyader, Mme Morfin, Mme Nicand, M. Pothier, M. Traoré*

### Résumé de la Question 1

Le mode de transmission des virus à l'homme peut être varié. Dans la réflexion conduite par ce groupe de travail, il a été décidé de considérer uniquement les virus entériques pour lesquels le risque de transmission à l'homme par ingestion d'un aliment ou d'eau contaminé a été démontré et pose des problèmes dans les secteurs de l'agroalimentaire et de la distribution de l'eau. Ainsi, le travail du groupe a porté sur les risques de transmission à l'homme, par les denrées alimentaires et les eaux de consommation, des virus suivants : rotavirus, norovirus, sapovirus, astrovirus, adénovirus 40 et 41, virus de l'hépatite A, de l'hépatite E, les entérovirus, paréchovirus et réovirus.

Il s'agit de virus sans enveloppe dont la plupart ont un génome à ARN, seul le génome des adénovirus est constitué d'ADN. La stabilité des virions aux pH acides permet le passage de la barrière gastrique et l'infection de l'intestin ou d'autres organes cibles. La transmission de ces virus se fait selon un mode féco-oral.

Il n'y a pas d'unicité quant à leur spectre d'hôte. Le virus de l'hépatite A est strictement humain alors que le virus de l'hépatite E a un potentiel zoonotique. Pour d'autres comme les rotavirus, la barrière d'espèce n'est pas stricte bien que l'homme soit généralement le principal réservoir des souches humaines ; quant aux norovirus, bien qu'ils aient été isolés chez l'homme, les bovins, les porcins et les souris, il n'y a aujourd'hui aucune preuve de l'existence d'une zoonose.

Les virus entériques sont responsables de gastroentérites ou d'hépatites. Toutefois, il existe des formes cliniques variées et les infections asymptomatiques sont fréquentes. Il n'y a pas un groupe de population à risque pour l'ensemble de ces virus même si les individus les plus faibles (très jeunes enfants, personnes âgées ou souffrant de malnutrition) sont exposés aux conséquences néfastes des infections par les virus de gastroentérites. Cependant certains emplois dans les stations d'épuration, les égouts ainsi que le tourisme en zone d'endémie exposent aux infections par les virus de l'hépatite A et de l'hépatite E. Pour le virus de l'hépatite A et les poliovirus, le risque d'infection peut être prévenu par la vaccination et l'application des mesures d'hygiène est efficace pour l'ensemble des virus.

Les virus sont excrétés dans les selles et contaminent l'environnement. Incapables de se multiplier en l'absence de cellules-hôtes, ils peuvent persister et rester infectieux plusieurs jours voire semaines, notamment à basses températures et en présence de particules. La transmission par voie féco-orale est de loin la plus habituelle et selon les virus plutôt directe de personne à personne (exemple des rotavirus) ou indirecte par ingestion d'eau (exemple du virus de l'hépatite E) ou d'aliments contaminés (exemple des norovirus). Les délais d'incubation (jusqu'à 6 semaines pour l'hépatite A) rendent parfois difficile la mise en évidence de la voie de transmission.

La présence de ces virus est détectée dans les produits biologiques, l'eau ou les matrices alimentaires par la mise en évidence du pouvoir infectieux, d'antigènes ou des génomes viraux. Dans le cas de l'eau et des aliments, une étape préalable de concentration est le plus souvent nécessaire. Des techniques de biologie moléculaire (PCR ou RT-PCR) sont également utilisées pour une caractérisation plus fine des virus impliqués dans des épidémies. La détection du génome d'un virus ne prouve pas son caractère infectieux, lequel est associé à une répllication du virus sur cellules. Malheureusement la plupart de ces virus cultive difficilement sur cellules, voire pas du tout, comme les norovirus et sapovirus. Pour ces virus, les données concernant la survie ou la résistance aux traitements sont souvent déduites par analogie avec celles obtenues avec un virus proche.

Les aliments et l'eau sont une des sources importantes de contamination par ces virus à l'origine d'épidémies. Parmi les virus entériques, les principaux en termes de risque sanitaire sont les norovirus et le virus de l'hépatite A. Les rotavirus posent également un problème de santé publique. Mais ce problème est surtout

lié à l'importance des épidémies hivernales récurrentes qui surviennent chez les nourrissons avec le risque de déshydratation pouvant conduire à une hospitalisation. Quant aux autres virus, ils représentent en France un risque sanitaire moindre voire, pour certains virus, minime ou encore à démontrer.

Le risque viral nécessite la mise en place de mesures de maîtrise aux différentes étapes de production d'eaux ou d'aliments. La gestion des ressources en eau et les règles d'hygiène sont éventuellement associées à des traitements chimiques (chlore, ozone) ou physiques (chaleur notamment) selon la nature des produits à traiter. Leur mise en place et la surveillance de leur efficacité sont en partie réglementées par des réglementations françaises et européennes.

## Introduction

Parmi les virus transmissibles à l'homme par voie orale, les virus responsables de gastroentérite aiguë et d'hépatite aiguë sont un des fléaux les plus redoutés à l'échelle planétaire. Les sources infectieuses (aliments, eau) ne sont pas identiques selon que l'on est dans un pays développé ou en voie de développement. Toutefois, l'importation de denrées alimentaires à partir de pays où certains virus ont une forte prévalence peut conduire à l'introduction accidentelle d'aliments souillés dans le circuit alimentaire des pays développés, et être à l'origine de cas sporadiques ou de réelles épidémies.

Le mode de transmission des virus à l'homme peut être varié. De nombreuses routes d'infection ont été décrites, parmi lesquelles la voie orale. Cette voie est utilisée par les virus qui vont se multiplier au niveau des organes lymphoïdes de l'oropharynx, l'arbre respiratoire et le tube digestif. Pour la majorité des virus respiratoires, le franchissement de la barrière stomacale est impossible. Par opposition, les virus entériques ont cette capacité, et peuvent donner des signes digestifs après multiplication dans la muqueuse digestive.

Dans la réflexion conduite par ce groupe de travail, il a été immédiatement décidé de n'évoquer et d'évaluer le risque pour les virus à multiplication entérique pour lesquels le risque de transmission à l'homme par ingestion d'un aliment ou d'eau contaminés a été démontré et pour lequel le risque est réel. Dans ce contexte, les virus respiratoires dont la transmission et la réplication peuvent occasionnellement se faire par les selles des personnes infectées (exemple : Adénovirus respiratoires), les virus aviaires ou porcins à transmission fécale (exemples : les Coronavirus porcins), et les virus humains dont le mode de transmission par voie orale est exceptionnelle ne seront pas évoqués (exemple : Virus de l'immunodéficience Humaine, virus de l'Hépatite B ou C). De même, les virus dont la multiplication se fait aussi au niveau oropharyngé ne seront pas évoqués (exemples : Morbillivirus, Virus de la Varicelle et du Zona, Cytomégalovirus, virus Epstein Barr).

De même, nous ne parlerons pas non plus des virus *Influenza* aviaire dont la transmission à l'homme est le fruit d'une exposition respiratoire aux déjections et/ou aux plumes des oiseaux infectés, ni du Coronavirus du SARS (ex : souche CoV) pour lesquels aucune transmission à l'homme par la consommation d'un aliment ou d'eau de boisson souillés n'a été rapporté. Pour les virus *Influenza A* aviaire H5N1, un avis de l'Afssa a été spécifiquement rendu (Avis du 15 mars 2006 relatif à l'évaluation qualitative du risque sanitaire pour l'homme lié à la présence dans l'eau destinée à la consommation humaine et dans divers effluents aqueux de virus *Influenza* hautement pathogène, dans le cas d'une épizootie ou dans le cas d'une épidémie humaine).

Enfin, la transmission du virus de la Rage par des aliments ou eaux de boisson contaminés n'a jamais été rapportée.

Au total, ce travail sur le risque de transmission de virus à l'homme par des denrées alimentaires et/ou des eaux de consommation sera dirigé sur les virus suivants :

- Le virus de l'Hépatite A
- Le virus de l'Hépatite E
- Les Calicivirus (Norovirus et Sapovirus)
- Les Rotavirus
- Les Astrovirus
- Les Adénovirus des sous-types 40 et 41
- Les Réovirus
- Les Entérovirus et Paréchovirus

Chacun des virus de cette liste fait partie de ce qui est communément appelé le « péril fécal ». Il s'agit des agents infectieux viraux qui sont de transmission inter-humaine, pour lesquels la contamination se fait par l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés, et qui, dans ce contexte, sont responsables d'épidémies de gastroentérites ou d'hépatites parfois très étendues.

En l'état actuel de nos connaissances, il s'agit d'une liste exhaustive. Mais la présentation choisie ne correspond pas à un degré de risque sanitaire, car dans ce cas nous aurions commencé par le virus de l'hépatite A et les norovirus. Nous avons choisi un regroupement par cadre pathologique, commençant par les virus responsables d'hépatites aiguës (hépatite A et E), puis ceux responsables de gastroentérites (norovirus, sapovirus, rotavirus, astrovirus et adénovirus) et enfin ceux dont la pathologie induite est moins définie (réovirus et entérovirus).

Pour chaque virus, il sera fait un état des lieux sur les données scientifiques les plus actuelles concernant leur nature et habitat, les maladies associées, le rôle des aliments dans la transmission de l'infection, et les mesures d'hygiène domestique permettant de limiter le risque de contamination.

### **Classification introductionnelle**

Voir Tableau 1 page 50.

Tableau 1 : les virus entériques humains responsables de pathologies liées aux aliments

Virus	Famille/genre	Caractéristique	Transmission	Clinique	Prophylaxie
<b>VHA</b> <i>Picornaviridae</i> <i>Hepatovirus</i>		ARN Non enveloppé Difficilement cultivable (14 à 21 j)	Manuportage Transmission inter-humaine Vecteurs inertes - mollusques et produits de la mer - eaux usées Restauration collective	- DI : 4 semaines - Asymptomatique (< 6 ans) - Hépatite aiguë - Hépatite fulminante (1/1 000) - Pas de forme chronique - Epidémies décrites	Vaccin inactivé administré par voie parentérale. Vaccination non obligatoire, recommandée pour : - les sujets exposés professionnellement (personnels des crèches et d'internats des établissements pour l'enfance et la jeunesse handicapée ; personnels de traitement des eaux usées ; personnels impliqués dans la préparation alimentaire en restauration collective) ; - les voyageurs en pays endémiques pour le VHA ; - les patients infectés chroniques par le virus de l'hépatite B ou porteurs d'une hépatopathie chronique ; - les homosexuels masculins ; - mesures d'hygiène
<b>VHE</b> <i>Hepeteviridae</i> <i>Hepevirus</i>		ARN Non enveloppé Difficilement cultivable	Manuportage Transmission inter-humaine Vecteurs inertes - eaux usées Zoonose	- DI : 40 jours - Hépatite aiguë - Hépatite fulminante (1 % jusqu'à 30 % chez la femme enceinte) - Pas de forme chronique - Epidémies décrites en zone d'endémie	Pas de vaccin Mesures d'hygiène
<b>Calicivirus</b> <i>Caliciviridae</i> Norovirus (virus de type Norwalk) 2 génogroupes chez l'homme (I et II) <i>Sapovirus</i> (sapporo-like virus ou SoV) ; 4 génogroupes		ARN Non enveloppé Non cultivable	Manuportage Transmission inter-humaine Vecteurs inertes - eaux, aliments contaminés (framboise, coquillage) Restauration collective	- DI : 1 à 2 jours - Gastroentérite aiguë (SoV surtout chez les enfants et les personnes âgées) - Epidémies de Noro liées à la consommation de produits de la mer - Epidémies de SoV décrites	Pas de vaccin Mesures d'hygiène
<b>Rotavirus</b> <i>Reoviridae</i> 7 groupes mais seuls A,B et C chez l'homme		ARN segmenté Non enveloppé Cultivable	Manuportage Transmission inter-humaine Vecteurs inertes - surfaces, objets - aliments contaminés	DI : 3 j Gastroentérite aiguë (enfant) Asymptomatique (adulte) Epidémies hivernales en collectivité	Vaccin vivant administré par voie orale disponible en France Mesures d'hygiène
<b>Astrovirus</b> <i>Astroviridae</i> 8 sérotypes		ARN Non enveloppé Difficilement cultivable	Manuportage Transmission inter-humaine Vecteurs inertes - surfaces, objets, eaux - aliments contaminés	DI : 1 à 4 j Gastroentérite aiguë Fréquence chez les immunodéprimés Epidémies décrites	Pas de vaccin Mesures d'hygiène
<b>Adénovirus</b> <i>Adenoviridae</i> <i>Mastadenovirus</i> 6 espèces (A à F) ; > 50 sérotypes ; 40 et 41 responsables de diarrhée		ADN Non enveloppé Cultivable sauf sérotypes 40 et 41	Transmission inter-humaine Manuportage Vecteurs inertes - surfaces, - objets, eaux - aliments contaminés	DI : 3 à 10 j Gastroentérites aiguës de l'enfant Signes respiratoires dans 20 % des cas Epidémies décrites	Pas de vaccin Mesures d'hygiène
<b>Réovirus</b> <i>Reoviridae</i> <i>Orthoreovirus</i> 3 sérotypes (1,2 et 3)		ARN segmenté Non enveloppé Cultivable	Transmission orale ou aérienne Vecteurs inertes - surfaces, objets, eaux, - aliments contaminés	Asymptomatique le plus souvent Infections de la sphère ORL Gastroentérites bénignes	Pas de vaccin Mesures d'hygiène
<b>Entérovirus</b> <i>Picornaviridae</i> <i>Human enterovirus A</i> (11 Coxsackie A et enterovirus 71) <i>Human enterovirus B</i> (6 Coxsackie B, 29 échovirus, entero 69) <i>Human enterovirus C</i> (8 Coxsackie A ; 3 poliovirus) <i>Human enterovirus D</i> (enterovirus 68 et 70)		ARN Non enveloppé Cultivable (sauf certains Cox A appartenant au génogroupe C	Manuportage Transmission inter-humaine Eaux usées Mollusques	Asymptomatique Fièvre Neurologie Diarrhée rare Epidémies à Coxsackie A/B et Echovirus	Vaccin anti poliomyélique trivalent et monovalents (inactif et atténué) Mesures d'hygiène
<b>Parechovirus</b> <i>Picornaviridae</i> <i>Human parechovirus</i> (échovirus 22 et 23)		ARN Non enveloppé Cultivable	Manuportage Transmission inter-humaine Eaux usées Mollusques	Asymptomatique Fièvre Neurologie Diarrhée rare	Pas de vaccin Mesures d'hygiène

\* van Regenmortel 2000.

## Virus de l'hépatite A

**Nom scientifique :** *Human hepatitis virus A*, **acronyme :** HVA, **nom usuel :** virus de l'hépatite A.

### 1. Nature et habitat

#### 1.1. Principales caractéristiques microbiologiques

Le virus de l'hépatite A (VHA) est un virus non enveloppé dont le génome est constitué d'un ARN monocaténaire de polarité positive. Il fait partie de la famille des *Picornaviridae*, genre *Hepatovirus*. Trois génotypes (I, II, III) subdivisés chacun en 2 génogroupes A et B sont décrits actuellement chez l'homme.

#### 1.2. Caractère zoonotique

Les singes en captivité ou sauvages peuvent être infectés par le VHA mais il semblerait que l'homme soit peu réceptif aux souches simiennes.

#### 1.3. Réservoir (tellurique, environnemental, animal, humain)

L'homme infecté est le principal réservoir de virus qu'il excrète dans ses selles 15 j à 1 mois après sa contamination et jusqu'à 1 mois (voire 5 mois chez les nourrissons) après le début des signes cliniques ou l'augmentation des ALAT <sup>(2)</sup>.

### 2. Maladie

#### 2.1. Formes infectieuses symptomatiques (y compris complications, létalité) et formes infectieuses asymptomatiques, durée de la maladie (incubation, symptomatologie), distribution par classes d'âge. Caractère épidémique

L'hépatite A (HA) est une infection aiguë généralement bénigne qui évolue vers la guérison sans séquelles dans 95 % des cas. Le délai d'incubation est en moyenne de 1 mois (10-50 j). La sévérité des signes cliniques augmente avec l'âge. Plus de 90 % des enfants infectés avant l'âge de 5 ans sont complètement asymptomatiques, alors que 70 à 80 % des adultes infectés sont symptomatiques. La forme ictérique représente plus de la moitié des formes symptomatiques. La mortalité globale liée à l'infection par le VHA est estimée entre 0,2 % et 0,4 % des cas symptomatiques mais elle dépasse 2 % après 40 ans. Si l'HA n'évolue jamais vers la chronicité, des rechutes peuvent se voir 4 à 15 semaines après une HA symptomatique apparemment guérie. Les formes graves sub-fulminantes ou fulminantes s'observent plus volontiers chez les adultes porteurs d'une hépatopathie chronique sous-jacente. Ces formes graves associant une hépatite aiguë, une encéphalopathie métabolique et un taux de facteur V < 50 % ont un taux de létalité spontanée de 70 à 90 %. L'épidémiologie de l'hépatite A, comme celle de l'ensemble des maladies à transmission féco-orale, évolue parallèlement à l'élévation du niveau de vie et l'amélioration des conditions d'hygiène. Dans les pays en voie de développement, les jeunes enfants sont exposés très tôt au VHA. En Afrique, Asie et Amérique latine, le taux de séroprévalence est voisin de 100 % ; cependant les progrès en matière d'hygiène collective dont bénéficient surtout les populations des grandes villes conduisent à une diminution de l'incidence des infections. Dans les pays industrialisés, l'amélioration des conditions sanitaires s'est accompagnée d'une diminution de l'immunité collective naturelle contre le VHA. En France, le taux de prévalence des anticorps anti-VHA chez les jeunes recrues du service national a diminué de façon spectaculaire en passant de 50 % en 1978 à 11,5 % en 1997. Cette tendance épidémiologique est constatée dans l'ensemble des pays de l'Europe et des États-Unis. L'augmentation de la réceptivité au VHA dans la classe adulte a entraîné, en revanche, une augmentation des formes sévères d'HA.

#### 2.2. Modalités de contamination humaine autres que par les aliments et risque de transmission interhumaine secondaire (modalités et durée d'excrétion des germes)

La **transmission par voie féco-orale** est de loin la plus habituelle ; elle est le plus souvent directe, de personne à personne, avec un taux d'attaque secondaire pouvant atteindre 20 à 50 % dans l'entourage du sujet infecté. La contamination indirecte par ingestion d'eau ou d'aliments contaminés est plus rare. Bien que faible, le risque de **transmission par voie parentérale**, à partir de produits sanguins labiles ou de médicaments dérivés du sang existe. En effet, une virémie se produit chez les sujets infectés 1 à 2 semaines avant le pic des ALAT et peut

(2) Alanine Amino Transférase.

persister jusqu'à 79 jours. Il existe aussi une **transmission sexuelle** du VHA surtout dans les communautés homosexuelles, favorisée par les contacts oro-anaux et une possible, bien que non démontrée, **transmission salivaire ou urinaire**. Cependant, dans près de la moitié des cas, aucune source infectieuse n'est retrouvée.

### 2.3. Populations à risque

Compte tenu des modes de contamination, les facteurs de risque d'HA sont essentiellement les séjours touristiques dans les régions de haute ou moyenne endémie et la vie en promiscuité avec un sujet infecté. Cela concerne particulièrement l'entourage familial, les collectivités d'enfants, le personnel des crèches et des institutions pour handicapés, et d'une manière générale les adultes exerçant une activité de soins. Sont également exposés : les employés des blanchisseries, les techniciens de laboratoires, les employés des égouts et des stations d'épuration. Les prisonniers, les toxicomanes, les homosexuels masculins, constituent aussi des groupes à risque.

### 2.4. Relations dose-effet<sup>(3)</sup> et dose-réponse<sup>(4)</sup> (loi/équation généralement appliquée, $DI_{50}^{(5)}$ , $DL_{50}^{(6)}$ pour l'homme si disponibles)

La dose infectieuse est inconnue mais probablement faible, elle est estimée entre 10 et 100 particules virales. Des extrapolations de données obtenues à partir d'autres virus entériques ont permis d'estimer le risque de morbidité à  $9 \times 10^{-3}$ , chez une personne consommant 60 g de coquillages crus (poids de mollusque) contaminés par 6 virus infectieux en culture de cellules.

### 2.5. Diagnostic (sérologique, immunologique, etc.)

Le diagnostic repose essentiellement sur la détection en ELISA des immunoglobulines spécifiques de type M qui sont détectables, chez la plupart des patients, 5 à 10 jours avant l'ictère et jusqu'à 3 à 6 mois voire 1 an après. Le virus est difficile à isoler *in vitro* et la recherche de l'ARN viral par RT-PCR, à partir des selles ou du sérum, est rarement réalisée dans un but diagnostic.

### 2.6. Traitement et prévention médicale (par exemple, vaccination)

Il n'existe pas de traitement curatif spécifique, une transplantation hépatique en urgence peut être nécessaire en cas de forme fulminante. En revanche il existe un vaccin efficace. Cette vaccination n'est pas obligatoire mais elle est recommandée chez les sujets exposés professionnellement, les voyageurs (adultes non immunisés et enfants au-dessus de un an) séjournant dans les pays endémiques pour le VHA, les patients porteurs d'une hépatopathie chronique, les homosexuels masculins. La prévention de l'hépatite A repose aussi sur les mesures habituelles d'hygiène prises dans le cadre des infections à transmission fécale.

### 2.7. Prévalence et/ou incidence annuelle des décès, des malades, des porteurs sains (séroconversion, portage digestif) et/ou des cas d'hospitalisation. Comparaison entre la France et d'autres pays (en précisant l'année et l'évolution récente)

L'incidence nationale de l'hépatite A, évaluée à partir des données du réseau sentinelle, a été estimée en 2003 à 13 cas pour 100 000 habitants contre 15 à 28 pour 100 000 habitants en 1996. Cependant, en raison du faible nombre de cas notifiés, ces estimations ne sont qu'approximatives. La déclaration obligatoire de l'HA, effective depuis janvier 2006, devrait permettre d'avoir une idée plus précise de l'incidence de l'HA en France.

En 1999, selon l'InVS, 31 % des patients présentant une HA ont été hospitalisés et 1 % a présenté une forme fulminante.

## 3. Rôle des aliments

### 3.1. Aliment(s) impliqué(s) (eaux, denrées animales et végétales)

Estimée être à l'origine de 5 % des cas d'HA aux États-Unis et de 18 % en France, la contamination d'origine alimentaire est responsable de cas isolés ou d'épidémies massives d'HA. Les cas survenant à moins de 14 jours d'intervalle correspondent généralement aux cas primaires ayant la même source alimentaire de contamination.

(3) Relation entre la dose et l'effet chez un individu.

(4) Pour un effet donné, relation entre la dose et la réponse dans la population.

(5) Si l est l'infection, la  $DI_{50}$  est la dose qui provoque l'apparition de l'infection dans 50 % des individus exposés.

(6) La  $DL_{50}$  est la dose qui provoque la mort de 50 % des individus exposés.

Ceux observés au-delà de 60 jours après l'origine de l'épidémie correspondent à des cas secondaires, liés à la transmission directe du virus de personne à personne.

Si les coquillages bivalves, les fruits et les crudités ont la réputation d'être la principale source alimentaire d'HA, d'autres aliments ont été incriminés : desserts, glaces, sandwiches. D'une manière générale, toute denrée manipulée sans précautions d'hygiène par une personne infectée et qui, ensuite, est consommée crue ou insuffisamment cuite peut être responsable d'HA.

### 3.2. Conditions conduisant à la contamination, au développement et à la survie du micro-organisme dans les aliments impliqués

La contamination des aliments peut survenir aux différentes étapes de la chaîne alimentaire : culture, récolte, traitement, emballage, distribution, voire lors de leur préparation culinaire. L'eau peut être aussi la source d'infections. Un dysfonctionnement du procédé de désinfection associé à une contamination des ressources ou une pollution accidentelle du réseau de distribution par des eaux usées peut être à l'origine de la contamination des eaux potables et secondairement des aliments lavés avec ces eaux souillées et consommés crus. Les procédés de traitement des eaux usées ne sont pas totalement efficaces sur le VHA. Le rejet des eaux usées contaminées dans l'eau de mer peut être ainsi à l'origine d'une contamination des fruits de mer, en particulier des coquillages bivalves (palourdes, huîtres, coques et moules). La désinfection par chloration inactive les virus mais son efficacité est souvent réduite par la présence de matières organiques dans l'eau. Les eaux épurées rejetées dans l'environnement peuvent donc encore contenir des virus, en revanche les traitements de désinfection des eaux de boisson sont généralement efficaces. Les eaux de surfaces (rivières) et les eaux du littoral marin reçoivent les virus adsorbés à des sédiments et les transportent parfois sur de longues distances. Les particules finissent par se déposer à la surface des sédiments mais peuvent être remises en suspension notamment en cas de tempête.

Enfin, certaines pratiques agraires, telles l'irrigation de cultures avec des eaux contaminées ou l'amendement des sols avec des boues urbaines insuffisamment traitées, risquent de contaminer des légumes ou des fruits consommés crus. Des denrées végétales, consommées crues et souillées par des eaux d'irrigation polluées, ont été à l'origine d'épidémies dans le monde entier. En 1997 aux États-Unis, la consommation de fraises congelées contaminées importées du Mexique a été responsable de 262 cas d'HA observés dans 36 cantines scolaires réparties sur 5 États. En novembre 2003, une épidémie d'hépatite A touchant plus de 700 personnes est survenue chez les clients d'un restaurant en Pennsylvanie suite à l'absorption d'oignons verts. Elle a fait 3 morts.

### 3.3. Mesures de maîtrise <sup>(7)</sup> dans le secteur alimentaire

#### 3.3.1. Bonnes pratiques d'hygiène

L'hygiène personnelle et collective reste la base de la prévention primaire. Il convient d'insister sur le lavage des mains aux sorties des toilettes et avant chaque repas. Le personnel de cuisine ou toute personne amenée à manipuler des aliments, surtout si ces aliments sont destinés à être consommés crus ou peu cuits, doit être sensibilisé sur le risque féco-oral et les mesures d'hygiène alimentaire. Ils doivent comprendre l'importance de ne pas manipuler des aliments s'ils présentent des symptômes d'hépatite. Leur vaccination contre l'hépatite A est recommandée. De plus, le respect des procédures de nettoyage-désinfection et le choix des matières premières (traçabilité, risque de contamination virale...) contribuent à une meilleure maîtrise du risque viral.

#### 3.3.2. Caractéristiques des traitements physiques, chimiques et biologiques assainissants

Le VHA est connu pour sa résistance aux agents chimiques et physiques, qui lui confère une survie prolongée dans le milieu extérieur.

##### *i. Inactivation par les moyens chimiques*

Le VHA résiste aux pH acides, aux solvants des lipides (éther à 20 %, chloroforme) en raison de l'absence d'enveloppe, aux concentrations de chlore présentes dans les eaux de piscine ou l'eau de boisson (0,1 à 0,2 ppm). Il n'est pas détruit par le cycle d'épuration biologique des eaux usées : en effet leur désinfection au chlore ou à l'ozone n'est pratiquée qu'en amont des zones de baignade ou des parcs conchylicoles. Le pouvoir infectieux du virus est réduit de 99,99 % après traitement avec 0,5 ppm de chlore libre en 6 min 30 s à pH 6 ; avec 0,4 à 2 ppm d'ozone en 5s.

(7) « actions et activités auxquelles on peut avoir recours pour prévenir ou éliminer un danger qui menace la sécurité des aliments ou pour le ramener à un niveau acceptable », norme AFNOR NF V01-002.

## ii. Inactivation par des moyens physiques

Le VHA est résistant à la chaleur, il est stable 1h à 60°C et partiellement inactivé après 10 à 12 heures à 60°C. En revanche, il est inactivé par l'autoclavage (121°C pendant 20 min), un chauffage à 100°C pendant 5 min. Cependant les conditions environnementales dans lesquelles est présent le virus peuvent influencer sa sensibilité à la chaleur :

- les virus présents dans les selles sont plus résistants à la chaleur que ceux cultivés *in vitro* ;
- l'inactivation de virus dans des coquillages nécessite d'appliquer une température à cœur de 85-90°C pendant 2 minutes ;
- si 30 secondes à 85°C sont suffisantes pour réduire de 5 log le titre de VHA présent dans différents produits laitiers en revanche à 80°C deux fois plus de temps sont nécessaires pour obtenir la même réduction du titre respectivement à partir de lait (42s) et de crème à 18 % de matière grasse (1 minute 24). Une pasteurisation à plus de 71°C pendant 15 sec réduit de 38 fois la quantité de VHA infectieux dans le lait écrémé et seulement de 7 fois dans une crème ;
- dans des préparations sucrées à base de fraises, présentant un taux de sucre d'environ 28 %, des traitements thermiques de 1,22 min à 80°C ou 0,32 min à 90°C sont nécessaires pour réduire par 10 le titre infectieux du VHA. Ces durées sont de 8,94 min et 3 min à 80°C et 90°C respectivement lorsque le taux de sucre est de 52 %.

### 3.4. Surveillance des aliments

#### 3.4.1. Réglementation en vigueur applicable aux denrées alimentaires identifiées comme à risque (règlement et directives européennes, critères microbiologiques, etc.) et obligation d'autocontrôle

Il n'existe pas de système de contrôle de la contamination des aliments par le VHA. Dans le cas de l'eau et des boues urbaines utilisées en agriculture, la qualité virologique est évaluée en recherchant les bactériophages et les entérovirus. Quant aux boues d'épuration hygiénisées, utilisées en agriculture, elles doivent contenir moins de 3 entérovirus par 10 g. Cependant, l'absence de ces virus, comme des bactéries entériques, n'est pas un indicateur fiable de non-contamination par le VHA.

Si le VHA est responsable d'une toxi-infection alimentaire collective (TIAC), la déclaration est obligatoire. Une enquête épidémiologique et vétérinaire est alors réalisée pour identifier les aliments responsables et prendre des mesures spécifiques pour prévenir les récurrences.

L'Ifremer a été nommé Laboratoire National de Référence (LNR) pour le contrôle des contaminations bactériologiques et virales des mollusques bivalves et a développé les outils pour détecter ces virus dans les coquillages.

#### 3.4.2. Principes des méthodes de détection, de dénombrement et de typage

La quantité de virus dans les aliments comme dans l'environnement étant généralement faible, des méthodes de concentration sont indispensables. Elles diffèrent en fonction des matrices utilisées.

**Eau** : Pour l'analyse de l'eau, de 1 à 100 litres est (sont) généralement nécessaire(s). Une norme AFNOR (XP T 90-451) décrit une méthode applicable pour la recherche du VHA. Une détection par RT-PCR peut être réalisée à partir de l'eau, soit directement, soit à partir de concentrats.

**Aliments** : Les coquillages sont analysés entiers ou bien disséqués pour analyser la glande digestive seule. Peu de travaux proposent des méthodes de concentration des virus à partir d'aliments contaminés en surface, comme les denrées végétales ou les produits de traiteurs. Les protocoles comportent généralement un lavage de la surface de l'aliment et une concentration soit par filtration, soit par précipitation. La RT-PCR est la méthode la plus sensible pour détecter les virus à partir des aliments. Elle ne permet pas toutefois d'affirmer le caractère infectieux du virus détecté.

Des eaux inoculées avec au moins 1 à 10 VHA infectieux en culture de cellule par litre, et des coquillages contaminés avec au moins 10 à 100 VHA infectieux en culture de cellule par gramme, sont détectés positifs. Ceci correspond à au moins 100 à 1 000 particules virales VHA infectieuses et non-infectieuses.

## 4. Hygiène domestique

Le virus de l'hépatite A résiste aux méthodes classiques de conservation des aliments (froid et congélation).

Avant consommation, les fruits et légumes consommés crus doivent être abondamment rincés avec de l'eau potable. Seuls les coquillages provenant de zones de culture contrôlées et propres peuvent être consommés.

Le respect des règles d'hygiène permet d'éviter la transmission inter-humaine. Il est recommandé de se laver les mains chaque fois que l'on s'est rendu aux toilettes et avant chaque repas. Les sujets infectés par le VHA ne doivent pas manipuler les aliments.

## 5. Liens

**Hollinger and Ticehurst. 1996.** Hepatitis A virus. *Fields Virology*, 3rd edition, p 735 - 782.

**Koopmans M, von Bonsdorff C-H, Vinjé J, de Medici D, Monroe S. 2002.** Foodborne viruses. *FEMS Microbiol Reviews* 26 : 187-205.

**Nicand E. 2000.** Évolution de l'épidémiologie de l'hépatite A. Hépatites virales entérotransmissibles. Editions Elsevier, p33-44.

Institut de Veille Sanitaire (France) : [www.invs.sante.fr](http://www.invs.sante.fr)

Sentiweb (France) : [www.b3e.jussieu.fr](http://www.b3e.jussieu.fr)

Eurosurveillance : [www.eurosurveillance.org](http://www.eurosurveillance.org)

Institute of Food Science and Technology (Royaume-Uni) : [www.ifst.org](http://www.ifst.org)

Center for Food Safety and Applied Nutrition (U.S.A.) : [www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov)

Centers for Diseases Control and Prevention (U.S.A) : [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)

Centre National de Référence des virus à transmission entérique (VHA et VHE) : [www.cnr.vha-vhe.aphp.fr](http://www.cnr.vha-vhe.aphp.fr)

## Virus de l'hépatite E

**Nom scientifique :** *Human hepatitis virus E*, **acronyme :** HEV, **nom usuel :** virus de l'hépatite E.

### 1. Nature et habitat

#### 1.1. Principales caractéristiques microbiologiques

Le virus de l'hépatite E (VHE) est un virus non enveloppé dont le génome est constitué d'un ARN monocaténaire de polarité positive. Il appartient à la famille des *Hepeviridae*, genre *Hepevirus*. Neuf génotypes dont 4 majeurs ont été identifiés chez l'homme.

#### 1.2. Caractère zoonotique

Il est actuellement clairement démontré que l'hépatite E est une zoonose et que de nombreuses espèces animales domestiquées et sauvages (porcs, poulets, rats, chiens, vaches, cerfs...) sont infectées par le VHE, constituant le réservoir naturel du virus.

#### 1.3. Réservoir (tellurique, environnemental, animal, humain)

L'homme infecté élimine le VHE dans ses selles 4 à 8 jours avant la phase ictérique et pendant les 3 à 4 semaines après, avec une durée maximum de 50 jours. Il participe également à la diffusion du virus.

### 2. Maladie

#### 2.1. Formes infectieuses symptomatiques (y compris complications, létalité) et formes infectieuses asymptomatiques, durée de la maladie (incubation, symptomatologie), distribution par classes d'âge. Caractère épidémique

L'hépatite E (HE) est une infection aiguë, habituellement bénigne, qui n'évolue jamais vers la chronicité. La période d'incubation est de 40 jours en moyenne. Les formes ictériques s'observent dans 50 % des cas plus fréquemment chez les adultes que chez les enfants. Les formes sévères fulminantes se voient principalement

au cours d'épisodes épidémiques, avec une fréquence de 1 % dans la population générale pouvant atteindre 45 % chez les femmes enceintes. La fréquence et la gravité de l'infection chez la femme enceinte sont d'autant plus élevées que l'âge de la grossesse est avancé. Une transmission verticale *in utero* du VHE survient dans un tiers des cas. L'hépatite E est endémo-épidémique dans de nombreux pays économiquement défavorisés où le niveau d'hygiène collective est insuffisant (Asie, Moyen-Orient, Afrique). Des cas sporadiques sont observés dans les pays industrialisés : il s'agit de le plus souvent de cas importés mais des cas autochtones ont été décrits sans qu'aucun mode de contamination ait pu être identifié pour certains d'entre eux.

### **2.2. Modalités de contamination humaine autres que par les aliments et risque de transmission interhumaine secondaire (modalités et durée d'excrétion des germes)**

Maladie du péril fécal, l'hépatite E est transmise surtout de façon indirecte, le plus souvent par l'eau de boisson contaminée. Le rôle des aliments semble secondaire. De même reste accessoire la transmission directe de personne à personne (1 à 3 % des cas). Une transmission par le sang est théoriquement possible puisqu'il existe une phase de virémie, mais celle-ci est transitoire et ne dure que quelques jours.

### **2.3. Populations à risque**

Le risque d'infection par le VHE est lié essentiellement aux séjours en zones d'endémie. Quant au risque d'hépatite fulminante, il est lié principalement à la grossesse et à l'existence d'une hépatopathie préexistante ou une co-infection par un autre virus hépatotrope (VHB, VHA ou VHC). Certaines catégories de personnels exposés par leur métier aux animaux domestiques pourraient constituer des groupes à risque.

### **2.4. Relations dose-effet et dose-réponse (loi/équation généralement appliquée, $DI_{50}$ , $DL_{50}$ pour l'homme si disponibles)**

La dose infectieuse a été déterminée expérimentalement par inoculation intraveineuse chez les primates (*Macaques Cynomolgus*) ; l'inoculation de 100 particules virales est suffisante pour provoquer une infection.

### **2.5. Diagnostic (sérologique, immunologique, etc.)**

Le manque de sensibilité des tests sérologiques actuellement commercialisés pour la recherche des IgG et des IgM anti-VHE, fait que le diagnostic repose principalement sur la recherche du génome viral à partir de différents types de prélèvements (selles, sérums, prélèvements biliaires). Il est de ce fait accessible à un nombre restreint de laboratoires.

### **2.6. Traitement et prévention médicale (par exemple, vaccination)**

Actuellement, aucun vaccin commercialisé n'est disponible. Le traitement reste symptomatique.

### **2.7. Prévalence et/ou incidence annuelle des décès, des malades, des porteurs sains (séroconversion, portage digestif) et/ou des cas d'hospitalisation. Comparaison entre la France et d'autres pays (en précisant l'année et l'évolution récente)**

L'incidence des cas d'hépatite E en France n'est pas connue.

## **3. Rôle des aliments**

### **3.1. Aliment(s) impliqué(s) (eaux, denrées animales et végétales)**

Dans les conditions habituelles, la source d'infection par le VHE est le plus souvent l'eau de boisson contaminée par des selles infectées. Les contaminations d'origine alimentaire sont plus rares et peu documentées. Cependant, récemment, plusieurs cas d'hépatite E secondaire à la consommation de viande de cerf ou de sanglier mal cuite ont été décrits au Japon, suggérant une possible contamination à partir du réservoir animal. En revanche aucun cas secondaire à la consommation de viandes de porc ou de poulet infectées mal cuites n'a été signalé à ce jour. L'hépatite E étant une maladie du péril fécal, une contamination des aliments manipulés sans précaution d'hygiène par une personne infectée et qui sont ensuite consommés crus ou insuffisamment cuits, peuvent être à l'origine d'hépatite.

Comme tous les virus entériques non enveloppés, le VHE est relativement résistant dans le milieu extérieur ; cependant aucune étude spécifique n'a été conduite *in vitro* pour préciser l'efficacité des traitements physiques ou chimiques.

La recherche du virus dans l'eau fait appel à des techniques de RT-PCR identiques à celles utilisées pour la recherche des autres virus entériques et nécessite des méthodes de concentration.

Il n'existe pas actuellement de système de surveillance de contrôle de la contamination des aliments par le VHE.

### **3.2. Conditions conduisant à la contamination, au développement et à la survie du virus de l'hépatite E dans les aliments impliqués**

Les épidémies ont été décrites dans les pays à bas niveau socio-économique. Les principales épidémies décrites (New Delhi 1956, Chine 1986-1988, Soudan 2004) avaient comme source de contamination, la consommation d'eau souillée par les déjections fécales. Dans les pays industrialisés, pour la plupart des cas autochtones, la source potentielle de contamination n'est pas identifiée. Toutefois, il est généralement mis en évidence une promiscuité avec la filière animale et particulièrement les porcs car ces animaux sont sensibles à l'infection par le virus de l'hépatite E en excréant de grandes quantités de virus dans les selles. La consommation de coquillages bivalves crus a été décrite comme source de contamination, comme cela est observé pour le virus de l'hépatite A ou les Calicivirus. Par ailleurs, récemment la consommation d'abats crus de sangliers et de cervidés a été identifiée comme à l'origine de cas sporadiques de contamination au Japon.

### **3.3. Mesures de maîtrise dans le secteur alimentaire**

#### **3.3.1. Bonnes pratiques d'hygiène**

L'hygiène personnelle et collective reste la base de la prévention primaire. Il convient d'insister sur le lavage des mains aux sorties des toilettes et avant chaque repas. Le personnel de cuisine ou toute personne amenée à manipuler des aliments, surtout si ces aliments sont destinés à être consommés crus ou peu cuits, doit être sensibilisé sur le risque féco-oral et les mesures d'hygiène alimentaire. Ils doivent comprendre l'importance de ne pas manipuler des aliments s'ils présentent des symptômes d'hépatite. De plus, le respect des procédures de nettoyage-désinfection et le choix des matières premières (traçabilité, risque de contamination virale...) contribuent à une meilleure maîtrise du risque viral.

#### **3.3.2. Caractéristiques des traitements physiques, chimiques et biologiques assainissants**

Bien que le virus de l'hépatite E soit un virus entérique, il est moins résistant que la plupart des autres virus entériques. Le virus de l'hépatite E tolère des températures 5 à 10°C moindres que pour le virus de l'hépatite A. La plupart des souches (95 %) de VHE sont inactivées à 60 °C pendant 15 minutes. Par ailleurs il est relativement stable à + 4°C.

La résistance aux agents physico-chimiques est moins élevée que pour le virus de l'hépatite A. Le virus de l'hépatite E est inactivé par les mêmes produits et procédés : chlore, UV, hypochlorite de sodium, glutaraldéhyde 2 %, ozone à 0,25mg/L pendant 20 minutes.

### **3.4. Surveillance des aliments**

#### **3.4.1. Réglementation en vigueur applicable aux denrées alimentaires identifiées comme à risque (règlement et directives européennes, critères microbiologiques, etc.) et obligation d'autocontrôle**

Il n'existe pas de système de contrôle de la contamination des aliments par le VHE. Dans le cas de l'eau et des boues urbaines utilisées en agriculture, la qualité virologique est évaluée en recherchant les bactériophages et les entérovirus. Quant aux boues d'épuration hygiénisées, utilisées en agriculture, elles doivent contenir moins de 3 entérovirus par 10 g. Cependant, l'absence de ces virus, comme des bactéries entériques, n'est pas un indicateur fiable de non-contamination par le VHE.

Si le VHE est responsable d'une toxi-infection alimentaire collective (TIAC), il fait l'objet d'une notification par le CNR à l'InVS (en particulier les cas autochtones), pour qu'une enquête environnementale et épidémiologique soit menée.

#### **3.4.2. Principes des méthodes de détection, de dénombrement et de typage**

Le principal mode de détection du virus dans les aliments et l'environnement se fait par des techniques d'amplification génique, par méthodes conventionnelles et PCR en temps réel. Actuellement, la recherche systématique du VHE dans les aliments n'est pas réalisée. En particulier, dans le cas de transmission verticale mère-enfant, le VHE n'a pas été mis en évidence dans le lait maternel de mères qui répliquaient le virus.

## 4. Hygiène domestique

Le virus de l'hépatite E résiste aux méthodes classiques de conservation des aliments (froid et congélation).

Avant consommation, les fruits et légumes consommés crus doivent être abondamment rincés avec de l'eau potable. Pour limiter le risque de contamination par le VHE, la recommandation est la cuisson des aliments (température à cœur de 90°C pendant 2 minutes). La consommation de viandes crues (abats) est à éviter compte tenu des données récentes sur le diagnostic de cas sporadiques survenus au Japon après la consommation de ce type d'aliments. Dans les pays industrialisés, pour limiter le risque de contamination, ce sont également les habitudes de vie (professionnels comme les éleveurs, les vétérinaires) ou de loisirs (comme chasse) qui doivent être pris en compte car l'hépatite E est avant tout une zoonose.

Le respect des règles d'hygiène permet d'éviter la transmission inter-humaine. Il est recommandé de se laver les mains chaque fois que l'on s'est rendu aux toilettes et avant chaque repas. Les sujets infectés par le VHE ne doivent pas manipuler les aliments.

## 5. Liens

Centre National de Référence des virus à transmission entérique (VHA et VHE) : [www.cnr.vha-vhe.aphp.fr](http://www.cnr.vha-vhe.aphp.fr)  
Institut de Veille Sanitaire (France) : [www.invs.fr](http://www.invs.fr)

## Norovirus

**Nom scientifique :** *Norovirus*, **acronyme :** NoV, **nom usuel :** norovirus.

### 1. Nature et habitat

#### 1.1. Principales caractéristiques microbiologiques

Les norovirus (NoV) sont des virus non enveloppés dont le génome est constitué d'un ARN monocaténaire de polarité positive. Ils appartiennent à la famille des *Caliciviridae*, genre *Norovirus*. Le genre *Norovirus* comprend cinq génogroupes parmi lesquels les génogroupes I, II et IV concernent l'homme. Les norovirus sont caractérisés par une très grande variabilité aboutissant à la définition de plusieurs génotypes. Ainsi pour les génogroupes I et II, les plus importants chez l'homme, on différencie actuellement respectivement au moins 8 et 17 génotypes.

#### 1.2. Caractère zoonotique

Il existe des souches animales dont certaines sont génétiquement proches des souches humaines, mais aujourd'hui il n'existe aucune donnée sur le risque de zoonose.

#### 1.3. Réservoir (tellurique, environnemental, animal, humain)

L'homme est le réservoir des norovirus humains. Ces virus persistent dans le milieu extérieur et ils sont résistants aux traitements d'épuration qu'ils soient physiques ou chimiques. L'environnement sera contaminé par des rejets humains.

### 2. Maladie

#### 2.1. Formes infectieuses symptomatiques (y compris complications, létalité) et formes infectieuses asymptomatiques, durée de la maladie (incubation, symptomatologie), distribution par classes d'âge. Caractère épidémique

Les norovirus sont les principaux agents des gastroentérites aiguës toutes classes d'âges confondues. Ces gastroentérites sont caractérisées par l'apparition brutale de vomissements et/ou de diarrhée après une courte incubation de 24 à 48 heures. La majorité des personnes infectées guérit spontanément en moins de 2 à 3 jours. Cependant, des formes cliniques plus sévères ont été observées, notamment chez les immunodéprimés, chez qui ont été décrites des formes chroniques.

Le virus est présent dans toutes les régions du globe. En Europe les infections à norovirus sont marquées par une saisonnalité hivernale, mais des épidémies ponctuelles au printemps et en été sont observées.

## 2.2. Modalités de contamination humaine autres que par les aliments et risque de transmission interhumaine secondaire (modalités et durée d'excrétion des germes)

La transmission par voie féco-orale est la plus importante. Elle est souvent directe, de personne à personne ou indirecte par ingestion d'eau ou d'aliments contaminés, souvent poursuivie par une diffusion de personne à personne. La transmission par voie aérienne (aérosols) est probable notamment lors des vomissements et pourrait participer à la diffusion du virus. Dans ces épidémies dues aux norovirus, le taux d'attaque est important.

La transmission des norovirus est favorisée par son excrétion fécale élevée ( $10^7$  à  $10^{10}$  particules/g de selles) et prolongée (environ 7 à 10 jours).

## 2.3. Populations à risque

Il n'y a pas de groupes à risque parfaitement caractérisés. Les personnes stressées (par exemple les militaires en campagne) et les immunodéprimés peuvent présenter des formes plus sévères ou prolongées.

## 2.4. Relations dose-effet et dose-réponse (loi/équation généralement appliquée, $DI_{50}$ , $DL_{50}$ pour l'homme si disponibles)

La dose infectieuse est vraisemblablement faible (sans doute environ 10 virions), mais elle n'est pas connue de façon précise et de plus elle varie probablement selon les souches et les individus.

## 2.5. Diagnostic (sérologique, immunologique, etc.)

**Chez l'homme** : la méthode de diagnostic de référence est la **détection génomique** par RT-PCR. Les amorces utilisées sont localisées dans la région de l'ORF1 codant l'ARN polymérase ou dans la région 5' de l'ORF2.

Deux réactifs commerciaux sont disponibles pour **détecter les antigènes viraux** par une méthode ELISA. Ces techniques sont cependant moins sensibles que la détection génomique.

La sérologie ne présente aucun intérêt.

**Dans l'environnement et les aliments** la détection des virus s'effectue uniquement par RT-PCR. L'extraction des ARN génomiques diffère selon la matrice.

La **caractérisation moléculaire des souches** nécessite le séquençage des produits d'amplification et la comparaison avec une banque de données.

## 2.6. Traitement et prévention médicale (par exemple, vaccination)

Il n'existe aucun traitement spécifique et aucun vaccin n'est disponible.

## 2.7. Prévalence et/ou incidence annuelle des décès, des malades, des porteurs sains (séroconversion, portage digestif) et/ou des cas d'hospitalisation. Comparaison entre la France et d'autres pays (en précisant l'année et l'évolution récente)

Les norovirus sont la cause majeure des gastroentérites toutes classes d'âge confondues et quels que soient les pays. C'est notamment l'agent infectieux le plus fréquemment responsable des épidémies de gastroentérites survenant en collectivités notamment celles d'origine alimentaire ou hydrique. La diffusion du virus en collectivité est favorisée par les personnes infectées asymptomatiques, la résistance du virus et la dose infectieuse faible. Cependant, la sensibilité des individus n'est pas uniforme, elle est liée à certains de leurs caractères génétiques et varie selon les souches virales. C'est aussi la deuxième cause d'hospitalisation des gastroentérites infantiles après les rotavirus.

# 3. Rôle des aliments

## 3.1. Aliment(s) impliqué(s) (eaux, denrées animales et végétales)

Les norovirus présents dans les rejets peuvent contaminer les eaux ainsi que divers aliments. Toutes les formes d'aliments peuvent être impliquées : eau de boisson ou de distribution, coquillages ou autres denrées animales, végétaux, aliments crus ou non transformés, produits consommés en l'état ou utilisés comme ingrédients dans un produit élaboré (huîtres, salades, fruits ou produits dérivés comme les glaces ou coulis, sandwiches, etc.).

### 3.2. Conditions conduisant à la contamination, au développement et à la survie du micro-organisme dans les aliments impliqués

Les norovirus sont très résistants et persistent après rejets dans l'environnement, entraînant la contamination des eaux. Les mollusques filtreurs peuvent concentrer ce virus et constituer un risque de contamination pour l'homme. La contamination des aliments peut survenir aux différentes étapes de la chaîne alimentaire : culture ou irrigation, récolte, emballage et préparation. La contamination de l'eau de distribution est associée à un dysfonctionnement du réseau.

### 3.3. Mesures de maîtrise dans le secteur alimentaire

#### 3.3.1. Bonnes pratiques d'hygiène

L'hygiène personnelle et collective reste la base de la prévention primaire. Il convient d'insister sur le lavage des mains aux sorties des toilettes et avant chaque repas. Le personnel de cuisine ou toute personne amenée à manipuler des aliments, surtout si ces aliments sont destinés à être consommés crus ou peu cuits, doit être sensibilisé sur le risque féco-oral et les mesures d'hygiène alimentaire. Ils doivent comprendre l'importance de ne pas manipuler des aliments s'ils présentent des symptômes de gastroentérite. De plus, le respect des procédures de nettoyage-désinfection et le choix des matières premières (traçabilité, risque de contamination virale...) contribuent à une meilleure maîtrise du risque viral.

#### 3.3.2. Caractéristiques des traitements physiques, chimiques et biologiques assainissants

Les norovirus humains ne cultivant pas, la plupart des données présentées sont extrapolées des résultats obtenus avec les calicivirus canins ou félin ou bien déduites de la quantification de génome résiduel par RT-PCR en temps réel.

##### Traitements physiques

Les norovirus sont résistants à la chaleur (37°C pendant 120 heures, ou 100°C pendant 1 min). De même il faut des doses d'UV supérieures à 10<sup>3</sup> mJ/cm<sup>2</sup> pour les inactiver. Leur résistance aux radiations gamma fait que les doses de 2 à 4 kGy souvent utilisées pour contrôler les bactéries dans l'industrie agroalimentaire pourraient ne pas être suffisantes.

##### Traitements chimiques

Les norovirus sont très résistants aux pH acides (pH 2, 30 min à 37°C) ou basiques (pH 12, 30 min à 37°C). Les calicivirus sont inactivés par des doses d'hypochlorite de sodium supérieures à 300 ppm. L'inactivation par l'éthanol à 70 % nécessite une exposition d'au moins 30 minutes pour réduire de 3 log<sub>10</sub> les titres de virus.

### 3.4. Surveillance des aliments

#### 3.4.1. Réglementation en vigueur applicable aux denrées alimentaires identifiées comme à risque (règlement et directives européennes, critères microbiologiques, etc.) et obligation d'autocontrôle

La qualité virologique des eaux est évaluée en recherchant les bactériophages. Les norovirus ne sont pas recherchés systématiquement dans l'eau, les coquillages ou les aliments. Lors d'une gastroentérite collective, les selles des patients mais aussi des échantillons d'eau ou des aliments suspectés sont adressés aux Centres Nationaux de Référence respectifs qui recherchent les norovirus afin de les caractériser sur le plan moléculaire.

Il n'existe pas de normes AFNOR se rapportant aux norovirus.

#### 3.4.2. Principes des méthodes de détection, de dénombrement et de typage

Actuellement, l'évaluation de l'efficacité d'un traitement ou la détermination des virus infectieux résiduels est extrapolée des résultats obtenus avec le calicivirus félin. L'utilisation du norovirus murin comme modèle est envisageable.

La détection du virus dans l'eau ou les aliments est réalisée par des méthodes de RT-PCR suivies d'un séquençage du produit amplifié pour confirmer et caractériser le génotype du norovirus en cause.

L'utilisation de la quantification génomique par RT-PCR en temps réel pour apprécier la charge virale dans l'eau ou les aliments fait partie des réflexions d'un groupe de travail européen (groupe CEN/TAG4).

## 4. Hygiène domestique

Les norovirus résistent aux méthodes classiques de conservation des aliments (froid et congélation), ainsi qu'à la température (30 min à 60°C) et aux variations de pH (3h à pH 3 à température ambiante).

Avant consommation, les fruits et légumes consommés crus doivent être abondamment rincés avec de l'eau potable. Seuls les coquillages provenant de zones de culture contrôlées et propres peuvent être consommés ; ceux qui sont cuits doivent subir une température à cœur de 90°C pendant 2 minutes.

Le respect des règles d'hygiène permet d'éviter la transmission inter-humaine. Il est recommandé de se laver les mains chaque fois que l'on s'est rendu aux toilettes et avant chaque repas. Les sujets infectés ne doivent pas manipuler les aliments.

## 5. Liens

**Green KY, Chanock RM, Kapikian AZ. 2001.** Human caliciviruses. In Knipe DM, Howley PM, Griffin DE et al. eds. *Fields Virology*, 4th ed., New York : Raven Press : 841-74.

Coordonnées des laboratoires de références (CNR, LCR, LNR) :  
CNR : Laboratoire de Virologie, CHU Dijon, Prof. P. Pothier.  
LNR Microbiologie des Coquillages, IFREMER Nantes.

## Sapovirus

Nom scientifique : *Sapovirus*, acronyme : SaV, nom usuel : sapovirus.

### 1. Nature et habitat

#### 1.1. Principales caractéristiques microbiologiques

Les sapovirus (SaV) sont des virus non enveloppés dont le génome est constitué d'un ARN monocaténaire de polarité positive. Ils appartiennent à la famille des *Caliciviridae*, genre *Sapovirus* ; ils sont non enveloppés. Le genre *Sapovirus* comprend cinq génogroupes divisés en plusieurs génotypes.

#### 1.2. Caractère zoonotique

Des souches porcines ont été caractérisées, mais nous ne disposons d'aucune preuve pour évoquer un risque de zoonose.

#### 1.3. Réservoir (tellurique, environnemental, animal, humain)

L'homme est le réservoir des sapovirus humains. Ces virus sont résistants et persistent dans le milieu extérieur et contamineront l'environnement. Toutefois, nous ne disposons d'aucune donnée spécifique sur la résistance de sapovirus dans le milieu extérieur.

### 2. Maladie

#### 2.1. Formes infectieuses symptomatiques (y compris complications, létalité) et formes infectieuses asymptomatiques, durée de la maladie (incubation, symptomatologie), distribution par classes d'âge. Caractère épidémique

Les sapovirus sont responsables de gastroentérites surtout chez les jeunes enfants et les personnes âgées. Ils sont également responsables d'épidémies dans les groupes à risque (crèches, maisons de retraite...).

Ces gastroentérites sont caractérisées par l'apparition brutale de vomissements et/ou de diarrhée après une courte incubation de 24 à 48 heures. La majorité des personnes infectées guérit spontanément en moins de 2 à 3 jours.

## 2.2. Modalités de contamination humaine autres que par les aliments et risque de transmission interhumaine secondaire (modalités et durée d'excrétion des germes)

La transmission par voie féco-orale est la plus importante. Elle est le plus souvent directe, de personne à personne mais aussi indirecte par ingestion d'eau ou d'aliments contaminés souvent poursuivie par une diffusion de personne à personne. La transmission par voie aérienne (aérosols) est probable notamment lors des vomissements et pourrait participer à la diffusion du virus.

## 2.3. Populations à risque

Il n'y a pas de groupes à risque parfaitement caractérisés. Les jeunes enfants (< 3 ans) et les personnes âgées sont les plus fréquemment infectés.

## 2.4. Relations dose-effet et dose-réponse (loi/équation généralement appliquée, $DI_{50}$ , $DL_{50}$ pour l'homme si disponibles)

La dose infectieuse précise n'est pas connue mais elle pourrait être comparable à celle des norovirus, c'est-à-dire faible.

## 2.5. Diagnostic (sérologique, immunologique, etc.)

Chez l'homme, dans l'environnement et les aliments, la méthode de détection de référence est la détection génomique par RT-PCR. L'extraction des ARN génomiques diffère selon la nature du prélèvement (matrice), mais les amorces choisies dans la région de la polymérase sont propres aux sapovirus.

La caractérisation moléculaire des souches nécessite le séquençage des produits d'amplification et la comparaison avec une banque de données.

## 2.6. Traitement et prévention médicale (par exemple, vaccination)

La prévention préconisée est un contrôle très strict de l'hygiène en cas de contact avec une personne infectée. Il n'existe aucun traitement spécifique ni vaccin disponible.

## 2.7. Prévalence et/ou incidence annuelle des décès, des malades, des porteurs sains (séroconversion, portage digestif) et/ou des cas d'hospitalisation. Comparaison entre la France et d'autres pays (en précisant l'année et l'évolution récente)

La prévalence varie de 0,3 à 9 % selon les pays, elle est plus importante chez les jeunes enfants. En France, elle serait d'environ 1 % chez les enfants hospitalisés pour gastroentérites.

# 3. Rôle des aliments

## 3.1. Aliment(s) impliqué(s) (eaux, denrées animales et végétales)

La transmission par les aliments est peu connue, mais *a priori* au vu des communautés de structure avec les norovirus, toutes les formes d'aliments ainsi que l'eau peuvent être souillés par des rejets humains et impliqués dans la transmission du virus à l'homme.

## 3.2. Conditions conduisant à la contamination, au développement et à la survie du micro-organisme dans les aliments impliqués

Les sapovirus sont très résistants en milieu extérieur et ils sont donc susceptibles de persister dans l'eau et les aliments. La contamination des aliments peut survenir aux différentes étapes de la chaîne alimentaire : culture ou irrigation, récolte, emballage et préparation. La contamination de l'eau de distribution est associée à un dysfonctionnement du réseau.

## 3.3. Mesures de maîtrise dans le secteur alimentaire

### 3.3.1. Bonnes pratiques d'hygiène

L'hygiène personnelle et collective reste la base de la prévention primaire. Il faut insister sur le lavage des mains aux sorties des toilettes et avant chaque repas. Le personnel de cuisine et toute personne amenée à manipuler des aliments, surtout si ces aliments sont destinés à être consommés crus ou peu cuits, doivent être sensibilisés

sur le risque féco-oral et les mesures d'hygiène alimentaire. Ils doivent comprendre l'importance de ne pas manipuler des aliments s'ils présentent des symptômes de gastroentérite. De plus, le respect des procédures de nettoyage-désinfection et le choix des matières premières (traçabilité, risque de contamination virale...) contribuent à une meilleure maîtrise du risque viral.

### 3.3.2. Caractéristiques des traitements physiques, chimiques et biologiques assainissants

Les sapovirus ne possédant pas d'enveloppe sont très résistants aux agents physiques et chimiques. Leur résistance est difficile à évaluer car il n'y a pas de système de multiplication *in vitro*. Nous ne possédons aucune donnée précise sur la résistance de ce virus aux agents chimiques et physiques.

## 3.4. Surveillance des aliments

### 3.4.1. Réglementation en vigueur applicable aux denrées alimentaires identifiées comme à risque (règlement et directives européennes, critères microbiologiques, etc.) et obligation d'autocontrôle

La qualité virologique des eaux est évaluée en recherchant les bactériophages. Les sapovirus ne sont pas recherchés systématiquement dans l'eau, les coquillages ou les aliments. Lors d'une gastroentérite collective, les selles des patients mais aussi des échantillons d'eau ou des aliments suspectés sont adressés aux Centres Nationaux de Référence respectifs qui recherchent les sapovirus afin de les caractériser sur le plan moléculaire.

Il n'existe pas de normes AFNOR se rapportant aux sapovirus.

### 3.4.2. Principes des méthodes de détection, de dénombrement et de typage

La détection du virus dans l'eau ou les aliments est réalisée par des méthodes de RT-PCR suivies d'un séquençage du produit amplifié pour confirmer et caractériser le génotype du sapovirus en cause.

À l'heure actuelle, il n'existe aucune méthode de référence pour quantifier le virus dans les prélèvements. L'utilisation de la quantification génomique par RT-PCR en temps réel pour apprécier la charge virale dans l'eau ou les aliments avec les limites liées à cette technique quantifie un élément du virus pouvant ne pas être infectieux.

## 4. Hygiène domestique

Les sapovirus résistent aux méthodes classiques de conservation des aliments (froid et congélation), ainsi qu'à la température (30 min à 60°C) et aux variations de pH (3h à pH 3 à température ambiante).

Avant consommation, les fruits et légumes consommés crus doivent être abondamment rincés avec de l'eau potable. Seuls les coquillages provenant de zones de culture contrôlées et propres peuvent être consommés ; ceux qui sont cuits doivent subir une température à cœur de 90°C pendant 2 minutes.

Le respect des règles d'hygiène permet d'éviter la transmission inter-humaine. Il est recommandé de se laver les mains chaque fois que l'on s'est rendu aux toilettes et avant chaque repas. Les sujets infectés ne doivent pas manipuler les aliments.

## 5. Liens

**Green KY, Chanock RM, Kapikian AZ. 2001.** Human caliciviruses. In Knipe DM, Howley PM, I. (Eds). *Fields Virology*, 4th ed., . Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. 2001: 841-74.

Coordonnées des laboratoires de références (CNR, LCR, LNR) :  
CNR : Laboratoire de Virologie, CHU Dijon prof. P. Pothier

## Rotavirus

**Nom scientifique :** *Rotavirus*, **acronyme :** HRV (HRV-A : Human rotavirus A), **nom usuel :** rotavirus.

### 1. Nature et habitat

#### 1.1. Principales caractéristiques microbiologiques

Les rotavirus (HRV) sont des virus non enveloppés, leur capsid est composée de trois couches concentriques. Leur génome est constitué de 11 segments d'ARN bicaténaire. Ils appartiennent à la famille des *Reoviridae* et sont classés en 7 groupes (A à G). Le groupe A, le plus important en pathologie humaine, est classé en plusieurs génotypes ou sérotypes selon une classification binaire G (gène 9/VP7 ; 14 sous-types différents) et P (gène 4/VP4 ; au moins 20 sous-types différents). Les rotavirus présentent donc une grande diversité génétique et antigénique.

#### 1.2. Caractère zoonotique

Les rotavirus peuvent infecter de nombreuses espèces. S'ils semblent spécifiques de leur espèce d'origine, il existe des arguments expérimentaux et épidémiologiques en faveur d'une transmission inter espèce. Les **coquillages bivalves** concentrent les particules virales présentes dans l'eau qu'ils filtrent, mais ils ne permettent pas la multiplication du virus.

#### 1.3. Réservoir (tellurique, environnemental, animal, humain)

L'homme est le réservoir des rotavirus humains. Ces virus résistants sont présents dans l'environnement. Après des cycles de congélation-décongélation et après lyophilisation, ils restent infectieux au moins 17 jours. Les rotavirus survivent sur **différentes surfaces poreuses ou non** : papier, aluminium, porcelaine, carrelage, gants en latex, polystyrène, vêtements en coton (90 % de l'inoculum infectieux est retrouvé après 60 jours). La présence de matières fécales augmente leur persistance. Les rotavirus survivent plusieurs heures **sur les mains**, 9 jours en **aérosol** (lors des vomissements) et plus de 64 jours à 20°C **dans l'eau du robinet**.

### 2. Maladie

#### 2.1. Formes infectieuses symptomatiques (y compris complications, létalité) et formes infectieuses asymptomatiques, durée de la maladie (incubation, symptomatologie), distribution par classes d'âge. Caractère épidémique

La **période d'incubation** est en moyenne de 3 jours. Chez les **nourrissons et les jeunes enfants**, les rotavirus provoquent une gastroentérite aiguë fébrile dont l'importance peut entraîner une déshydratation nécessitant une hospitalisation. La guérison est la règle lorsque la réhydratation est adaptée. Les infections de l'adulte sont le plus souvent asymptomatiques.

**Zone d'endémie :** Le virus est présent dans toutes les régions du globe avec une évolution par épidémies hivernales dans les pays tempérés et tout au long de l'année dans les pays tropicaux.

#### 2.2. Modalités de contamination humaine autres que par les aliments et risque de transmission interhumaine secondaire (modalités et durée d'excrétion des germes)

Virus résistant de transmission féco-orale. L'excrétion fécale (durant 5 à 12 jours) est estimée à  $10^{11}$  particules virales par gramme de selle. Le **transmission de personne à personne** est le mode de dissémination le plus fréquemment rapporté. La présence et la persistance du virus dans l'environnement, sur les surfaces poreuses ou non et sur les mains, permettent sa transmission directe par contact. La transmission aérienne par aérosol pourrait participer à la diffusion du virus.

#### 2.3. Populations à risque

Il n'y a pas de groupe à risque en dehors des enfants de moins de 3 ans. Les adultes peuvent être contaminés et ainsi diffuser le virus, mais l'infection est souvent asymptomatique.

#### 2.4. Relations dose-effet et dose-réponse (loi/équation généralement appliquée, $DI_{50}$ , $DL_{50}$ pour l'homme si disponibles)

La dose infectieuse est inconnue. On sait seulement qu'à partir des fèces 1 particule sur 50 000 est capable d'infecter des cellules en culture.

#### 2.5. Diagnostic (sérologique, immunologique, etc.)

**Chez l'homme :** détection des antigènes du virus dans les selles (ELISA, agglutination latex ou immunochromatographie) ou par microscopie électronique. La recherche du génome viral dans les selles (RT-PCR) est utilisée dans les investigations épidémiologiques.

**Dans l'environnement et les aliments :** la détection des virus s'effectue uniquement par RT-PCR. L'extraction des ARN diffère selon la matrice.

**Analyse de la variabilité génétique :** la détermination du génotype des rotavirus analyse la taille des « amplicons » obtenus par RT-PCR des gènes 4 (génotypage P) et 9 (génotypage G).

#### 2.6. Traitement et prévention médicale (par exemple, vaccination)

Deux vaccins sont disponibles en France. L'un est monovalent (RotaRix®, GlaxoSmithKline) et provient d'une souche humaine atténuée de génotype G1P[8] (ou sérotype G1P1A). Le second est pentavalent (RotaTeq®, Sanofi Pasteur MSD) ; il est composé d'un virus bovin recombinant exprimant des protéines de surface de rotavirus humains (VP7) de sérotype G1, G2, G3, G4 et VP4 de génotype P[8] (sérotype P1A). Les premiers essais cliniques ont montré l'innocuité de ces deux vaccins et leur efficacité pour protéger des diarrhées sévères.

#### 2.7. Prévalence et/ou incidence annuelle des décès, des malades, des porteurs sains (séroconversion, portage digestif) et/ou des cas d'hospitalisation. Comparaison entre la France et d'autres pays (en précisant l'année et l'évolution récente)

Les rotavirus sont à l'origine d'un nombre important d'épisodes diarrhéiques, que les progrès de l'hygiène n'ont pas réussi à maîtriser, y compris dans les pays industrialisés. Ces diarrhées sont la cause d'environ 500 000 morts essentiellement dans les pays en voie de développement.

### 3. Rôle des aliments

#### 3.1. Aliment(s) impliqué(s) (eaux, denrées animales et végétales)

L'eau de boisson, de distribution et les eaux récréatives peuvent être contaminées et impliquées dans la transmission des rotavirus à l'homme. Toutes les formes d'aliments peuvent être impliquées : denrées animales ou végétales, aliments préparés, crus ou non transformés, produits consommés en l'état ou utilisés comme ingrédients dans un produit élaboré.

#### 3.2. Conditions conduisant à la contamination, au développement et à la survie du micro-organisme dans les aliments impliqués

La contamination de l'aliment peut survenir aux différentes étapes de la chaîne alimentaire : culture, traitement, récolte, emballage, préparation.

La contamination de l'eau de distribution est associée à un dysfonctionnement et une contamination du réseau.

#### 3.3. Mesures de maîtrise dans le secteur alimentaire

##### 3.3.1. Bonnes pratiques d'hygiène

L'hygiène personnelle et collective reste la base de la prévention primaire. Il convient d'insister sur le lavage des mains à la sortie des toilettes et avant chaque repas. Le personnel de cuisine et toute personne amenée à manipuler des aliments, surtout si ces aliments sont destinés à être consommés crus ou peu cuits, doivent être sensibilisés sur le risque féco-oral et les mesures d'hygiène alimentaire. Ils doivent comprendre l'importance de ne pas manipuler des aliments s'ils présentent des symptômes de gastroentérite. De plus, le respect des procédures de nettoyage-désinfection et le choix des matières premières (traçabilité, risque de contamination virale...) contribuent à une meilleure maîtrise du risque viral.

### 3.3.2. Caractéristiques des traitements physiques, chimiques et biologiques assainissants

#### i. Traitements thermiques (aliments)

Les procédés thermiques utilisés pour la transformation des aliments sont divers : pasteurisation, concentration, séchage, confisage/semi-confisage, congélation. Il n'existe pas de données se rapportant aux rotavirus pour l'ensemble des matrices alimentaires et celles-ci ont un effet important sur la thermosensibilité virale, soit protecteur (sucres/matières grasses), soit synergique (pH, molécules spécifiques). À titre d'exemple un traitement thermique à 98°C de 8 min appliqué à une préparation de crabe permet une réduction de plus de 4 log<sub>10</sub>.

#### ii. Autres traitements

Les rotavirus sont résistants aux agents chimiques et physiques, ce qui leur confère une survie prolongée dans le milieu extérieur, notamment sur les surfaces. Les données concernent principalement l'action de décontamination de l'eau ; les données concernant les désinfectants, les moyens chimiques et physiques sont plus rares et ces produits, utilisés comme auxiliaires technologiques, sont soumis à autorisation réglementaire pour leur utilisation sur les aliments. D'une façon générale, les rotavirus sont moins sensibles aux désinfectants lorsqu'ils sont adsorbés sur des matrices alimentaires ou des surfaces non poreuses qu'en suspension. De même, la présence de matières fécales protège de l'inactivation.

- **Dérivés chlorés** : les rotavirus sont inactivés par le **chlore libre** (concentration supérieure à 0,3mg/L). L'inactivation est plus rapide à pH 6 qu'à pH 10 ; le **dioxyde de chlore** à pH alcalin (> pH 8) et à + 4°C. L'inactivation est plus lente voire incomplète à pH neutre ou acide ; **l'eau de Javel** dosée à 800 ppm de chlore libre (solution d'hypochlorite de sodium à 6 %) permet une diminution de 98 % si le contact a été de 10 minutes. Par contre, le **monochloramine** ne permet pas une inactivation du rotavirus.

- **L'acide peracétique** : son efficacité virucide a été montrée sur des eaux de lavage de salades ou de fraises pour le poliovirus mais pas pour les rotavirus.

- **L'ozone** : Les rotavirus humains sont rapidement inactivés par un traitement à **l'ozone**.

**Parmi les autres désinfectants** : l'éthanol à 70 %, l'isopropanol à 70 %, les solutions phénoliques sont efficaces. Le formaldéhyde 1 %, le Lysol 2 %, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 % sont également efficaces après un contact d'une heure. Par contre le gluconate de chlorhexidine, le cetrimide et les autres ammoniums quaternaires, le savon liquide sont peu efficaces.

#### iii. Moyens physiques

Les traitements **UV** nécessitent entre 36 à 50 mJ/cm<sup>2</sup> pour obtenir une réduction de 4 log.

Les traitements par les **hautes pressions** sont partiellement efficaces.

Les traitements par les **champs électriques pulsés** sont inefficaces sur les rotavirus.

## 3.4. Surveillance des aliments

### 3.4.1. Réglementation en vigueur applicable aux denrées alimentaires identifiées comme à risque (règlement et directives européennes, critères microbiologiques, etc.) et obligation d'autocontrôle

La qualité virologique des eaux est évaluée en recherchant les bactériophages. Les rotavirus ne sont pas recherchés systématiquement dans l'eau ni dans les aliments. Lors d'une gastroentérite collective les aliments, les huîtres et les selles des malades sont adressés aux Centres Nationaux de Référence respectifs qui recherchent la présence de rotavirus.

Il n'existe pas de normes AFNOR se rapportant aux rotavirus.

### 3.4.2. Principes des méthodes de détection, de dénombrement et de typage

- L'évaluation de l'efficacité d'une méthode est réalisée par titrage par la méthode des plages ou par dilution limite. Il est admis qu'une réduction de 4 log du titre viral est nécessaire pour qualifier le traitement d'efficace.

- La détection des rotavirus dans les aliments nécessite des méthodes sensibles de biologie moléculaire (RT-PCR) qui seules peuvent permettre la détection et le typage du virus, ainsi que la comparaison des souches avec celles retrouvées chez les patients infectés. Pour l'analyse de l'eau, un volume de 1 à 100 litres est nécessaire.

## 4. Hygiène domestique

Les rotavirus résistent aux méthodes classiques de conservation des aliments (froid et congélation), ainsi qu'au chauffage (30 min à 60°C).

Avant consommation, les fruits et légumes consommés crus doivent être abondamment rincés avec de l'eau potable. Seuls les coquillages provenant de zones de culture contrôlées et propres peuvent être consommés ; ceux qui sont cuits doivent subir une température à cœur de 90°C pendant 2 minutes.

Le respect des règles d'hygiène permet d'éviter la transmission inter-humaine. Il est recommandé de se laver les mains chaque fois que l'on s'est rendu aux toilettes, lorsqu'on a changé un enfant présentant une diarrhée, et avant chaque repas. Les sujets infectés ne doivent pas manipuler les aliments.

## 5. Liens

Institut de Veille Sanitaire : [www.invs.sante.fr](http://www.invs.sante.fr)

Centers for Diseases Control and prevention (USA) : [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)

Eurosurveillance : [www.eurosurveillance.org](http://www.eurosurveillance.org)

Sentiweb : [www.b3e.jussieu.fr](http://www.b3e.jussieu.fr)

Centre National de référence des virus entériques, CHU de Dijon, 21079 Dijon cedex.

Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM. Rotaviruses. In Knipe DM, Howley PM (Eds.), Fields Virology, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. 2001 : 1787-1833.

## Astrovirus

**Nom scientifique :** *Astrovirus*, **acronyme :** HastV, **nom usuel :** astrovirus.

### 1. Nature et habitat

#### 1.1. Principales caractéristiques microbiologiques

Les astrovirus sont des virus non enveloppés dont le génome est constitué d'un ARN monocaténaire à polarité positive. Ils appartiennent à la famille des *Astroviridae* dont ils sont les seuls membres. Les astrovirus humains comprennent actuellement huit sérotypes.

#### 1.2. Caractère zoonotique

Les astrovirus humains sont strictement humains. Les astrovirus isolés chez l'animal ne sont pas transmissibles à l'homme.

#### 1.3. Réservoir (tellurique, environnemental, animal, humain)

Les infections à astrovirus ont une distribution mondiale. La circulation des astrovirus dans l'environnement, notamment dans les eaux usées ou épurées, a été fréquemment rapportée. Le réservoir ainsi que la source de contamination de l'environnement est l'homme.

### 2. Maladie

#### 2.1. Formes infectieuses symptomatiques (y compris complications, létalité) et formes infectieuses asymptomatiques, durée de la maladie (incubation, symptomatologie), distribution par classes d'âge. Caractère épidémique

Les astrovirus sont une des principales étiologies des gastroentérites des jeunes enfants de moins de deux ans, des personnes âgées et des immunodéprimés. Ils semblent peu pathogènes pour l'adulte sain. Les études sur volontaires et les études descriptives des épidémies ont permis de déterminer que l'incubation peut varier de un à quatre jours avant survenue d'une diarrhée aqueuse et/ou d'autres symptômes généraux ou digestifs comme des douleurs abdominales, des nausées, des vomissements. Ces symptômes peuvent durer pendant deux à trois jours.

## 2.2. Modalités de contamination humaine autres que par les aliments et risque de transmission interhumaine secondaire (modalités et durée d'excrétion des germes)

Virus résistant de transmission féco-orale. L'excrétion virale peut précéder les symptômes et se prolonger plusieurs jours après la fin de la diarrhée. L'épandage de boues de stations d'épuration, qui peuvent contenir des astrovirus lorsqu'elles ont été hygiénisées de façon insuffisante représente un mode théorique de contamination de populations à risque.

Les immunodéprimés, notamment les patients atteints de pathologies hématologiques sévères, représentent un groupe à risque de gastroentérites à astrovirus.

## 2.3. Relations dose-effet et dose-réponse (loi/équation généralement appliquée, $DI_{50}$ , $DL_{50}$ pour l'homme si disponibles)

La dose infectieuse minimale n'est pas connue. Il a été mesuré que certains échantillons de selles peuvent contenir un nombre élevé de particules virales (jusqu'à  $10^{10}$  particules par mL).

## 2.4. Diagnostic (sérologique, immunologique, etc.)

Possible avec des techniques immuno enzymatiques sous la forme de kits commerciaux, plus sensibles et plus pratiques que la microscopie électronique. Ces techniques utilisent des anticorps polyclonaux ou monoclonaux et sont développées. La technique ELISA permet uniquement la détermination des sérotypes. La RT-PCR avec des amorces spécifiques des souches humaines est maintenant très utilisée, et est devenue la référence pour la détection des astrovirus.

## 2.5. Traitement et prévention médicale (par exemple, vaccination)

Aucun.

## 2.6. Prévalence et/ou incidence annuelle des décès, des malades, des porteurs sains (séroconversion, portage digestif) et/ou des cas d'hospitalisation. Comparaison entre la France et d'autres pays (en précisant l'année et l'évolution récente)

Les infections à astrovirus sont d'origine communautaire ou nosocomiale, parfois associées à d'autres agents étiologiques. Selon la méthode de détection employée et les caractéristiques de la population, la fréquence des infections varie de 2,5 % à 9 % des diarrhées observées. Les fréquences les plus faibles sont observées en milieu hospitalier car la symptomatologie modérée des infections à astrovirus conduit rarement à une hospitalisation. Environ 50 % des enfants de 5 à 12 mois ont des anticorps anti sérotype 1.

Les astrovirus représentent également une étiologie fréquente de diarrhées chez les personnes âgées et les immunodéprimés. Les rares infections symptomatiques de l'adulte sont dues à des sérotypes autres que le sérotype 1.

## 3. Rôle des aliments

### 3.1. Aliment(s) impliqué(s) (eaux, denrées animales et végétales)

Contamination possible par des aliments végétaux mal lavés ou souillés par de l'eau contaminée. Les coquillages filtreurs sont aussi des sources infectieuses ; ils peuvent concentrer les astrovirus à partir d'eau douce ou d'eau de mer contaminée et contaminer l'homme lorsqu'ils sont consommés crus ou peu cuits. **Les coquillages bivalves** concentrent les particules virales présentes dans l'eau qu'ils filtrent, mais ils ne permettent pas la multiplication du virus.

### 3.2. Conditions conduisant à la contamination, au développement et à la survie du micro-organisme dans les aliments impliqués

La transmission des astrovirus humains s'effectue par la voie féco-orale par contact inter-individuel, par l'intermédiaire d'objets ou de surfaces souillés, ou par des aliments ou de l'eau contaminés. Les aliments peuvent être contaminés par contact avec de l'eau, un objet ou une personne qui jouera alors le rôle de vecteur. Il n'y a pas de développement de l'agent infectieux dans les aliments souillés.

### 3.3. Mesures de maîtrise dans le secteur alimentaire

Pas de mesure particulière.

#### 3.3.1. Bonnes pratiques d'hygiène

L'hygiène personnelle et collective reste la base de la prévention primaire. Il convient d'insister sur le lavage des mains aux sorties des toilettes et avant chaque repas. Le personnel de cuisine et toute personne amenée à manipuler des aliments, surtout si ces aliments sont destinés à être consommés crus ou peu cuits, doivent être sensibilisés sur le risque féco-oral et les mesures d'hygiène alimentaire. Ils doivent comprendre l'importance de ne pas manipuler des aliments s'ils présentent des symptômes de gastroentérite. De plus, le respect des procédures de nettoyage-désinfection et le choix des matières premières (traçabilité, risque de contamination virale...) contribuent à une meilleure maîtrise du risque viral.

#### 3.3.2. Caractéristiques des traitements physiques, chimiques et biologiques assainissants

Les particules virales, non enveloppées, ne sont pas détruites par le chloroforme, les détergents et les solvants des lipides. Elles sont stables à pH 3, et à une température de 60°C pendant 5 min. La sensibilité des astrovirus aux désinfectants n'est pas connue.

### 3.4. Surveillance des aliments

Pas de surveillance particulière. L'éventuelle recherche d'astrovirus se fait par RT-PCR.

#### 3.4.1. Réglementation en vigueur applicable aux denrées alimentaires identifiées comme à risque (règlement et directives européennes, critères microbiologiques, etc.) et obligation d'autocontrôle

Pas de suivi particulier.

#### 3.4.2. Principes des méthodes de détection, de dénombrement et de typage

Pas de norme. Détection par RT-PCR.

## 4. Hygiène domestique

Les astrovirus résistent aux méthodes classiques de conservation des aliments (froid et congélation), ainsi qu'à la température (30 min à 60°C).

Avant consommation, les fruits et légumes consommés crus doivent être abondamment rincés avec de l'eau potable. Seuls les coquillages provenant de zones de culture contrôlées et propres peuvent être consommés ; ceux qui sont cuits doivent subir une température à cœur de 90°C pendant 2 minutes.

Le respect des règles d'hygiène permet d'éviter la transmission inter-humaine. Il est recommandé de se laver les mains chaque fois que l'on s'est rendu aux toilettes et avant chaque repas. Les sujets infectés ne doivent pas manipuler les aliments.

## 5. Liens

Centers for Diseases Control and prevention (USA) : [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)

Centre National de référence des virus entériques, CHU de Dijon, 21079 Dijon cedex.

Matsui SM, Greenberg HB. Astroviruses. In Knipe DM, Howley PM (Eds.), Fields Virology, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. 2001 : 875-893.

## Adénovirus

**Nom scientifique :** *Human adenovirus F* ou *Human adenovirus 40, 41*, **acronyme :** HAdV (AdV-40, 41), **nom usuel :** adénovirus.

### 1. Nature et habitat

#### 1.1. Principales caractéristiques microbiologiques

Les adénovirus sont des virus à ADN bicaténaire non enveloppés. Ils appartiennent à la famille des *Adenoviridae*, genre *Mastadenovirus* et il existe plus de 50 sérotypes d'adénovirus classés en 6 groupes (A à F). Seuls les sérotypes 40 et 41 (groupe F) sont responsables de diarrhées.

#### 1.2. Caractère zoonotique

Il n'y a pas de réservoir ni de vecteur animal.

#### 1.3. Réservoir (tellurique, environnemental, animal, humain)

L'homme est le réservoir des adénovirus 40 et 41. Ces virus sont présents dans l'environnement et ils ont été mis en évidence dans les eaux de surface.

Les adénovirus sont résistants à de nombreux agents physico-chimiques et peuvent persister dans le milieu extérieur. Ils sont difficilement éliminés de la peau souillée par un simple lavage des mains avec un savon et la plupart des antiseptiques ne sont pas efficaces ; il faut donc insister sur l'utilisation de gants pour éviter une contamination manuportée. En pratique, les virus sont détruits par l'hypochlorite de sodium à 1,5° chlorométrique en 1 minute, par le glutaraldéhyde à 2 % en quelques minutes et par le formaldéhyde. La chlorhexidine, les ammoniums quaternaires, les alcools et les iodophores tels que la polyvinylpyrrolidone iodée ne sont pas efficaces vis-à-vis des adénovirus. Ils sont inactivés par la chaleur (56°C, 30 min) et par les rayonnements ionisants.

### 2. Maladie

#### 2.1. Formes infectieuses symptomatiques (y compris complications, létalité) et formes infectieuses asymptomatiques, durée de la maladie (incubation, symptomatologie), distribution par classes d'âge. Caractère épidémique

L'incubation est de 3 à 10 jours. Les signes cliniques sont en général modérés avec nausées, vomissements et diarrhées. L'épisode infectieux dure habituellement 10 à 12 jours. Les vomissements sont fréquents (80 %) et surtout présents au début des symptômes (2 premiers jours). Des signes respiratoires peuvent être associés dans 20 % des cas. Les infections asymptomatiques sont fréquentes avec présence de virus dans les selles. La période d'infectivité des adénovirus 40 et 41 est importante pendant toute la durée des signes cliniques. Cependant, ils peuvent aussi être excrétés de façon prolongée dans les selles après guérison de l'infection.

#### 2.2. Modalités de contamination humaine autres que par les aliments et risque de transmission interhumaine secondaire (modalités et durée d'excrétion des germes)

La contamination est interhumaine directe ou indirecte. Dans l'enfance, le virus est transmis par contact (mains sales) et passe rapidement d'enfant à enfant. Aussi après 4 ans, plus de 50 % des enfants ont des anticorps contre les adénovirus 40 et 41. Il n'a pas été démontré la présence d'adénovirus dans les aliments, cependant une transmission hydrique est possible.

#### 2.3. Populations à risque

Les patients recevant une greffe de moelle sont à risque d'infection grave à adénovirus.

#### 2.4. Relations dose-effet et dose-réponse (loi/équation généralement appliquée, $DI_{50}$ , $DL_{50}$ pour l'homme si disponibles)

Elle n'est pas connue.

## 2.5. Diagnostic (sérologique, immunologique, etc.)

Chez l'homme, le diagnostic de l'infection repose sur la détection des antigènes spécifiques des adénovirus 40 et 41. La recherche dans les selles des adénovirus par microscopie électronique est possible, bien que fastidieuse. Elle ne permet pas de différencier les sérotypes 40 et 41 des autres. Les adénovirus 40 et 41 ne se multiplient pas sur les lignées cellulaires usuelles ; ils doivent être cultivés sur les cellules 293 (cellules HEK transformées par un adénovirus de type 5).

Les techniques de biologie moléculaire permettent de détecter l'ADN des adénovirus 40 et 41 après amplification par PCR. Elles ont un intérêt surtout épidémiologique et dans la recherche du virus dans l'eau ou les aliments.

## 2.6. Traitement et prévention médicale (par exemple, vaccination)

Les adénovirus 40 et 41 sont sensibles *in vitro* à la ribavirine. Cependant, ce médicament n'est pas utilisé lors des gastroentérites. Il n'existe aucune vaccination.

## 2.7. Prévalence et/ou incidence annuelle des décès, des malades, des porteurs sains (séroconversion, portage digestif) et/ou des cas d'hospitalisation. Comparaison entre la France et d'autres pays (en précisant l'année et l'évolution récente)

Ces virus ont une répartition mondiale et ils sont responsables d'épidémies et de cas sporadiques. Les infections se produisent tout au long de l'année sans périodes de flambées précises.

## 3. Rôle des aliments

### 3.1. Aliment(s) impliqué(s) (eaux, denrées animales et végétales)

Il n'a pas été démontré la présence d'adénovirus dans les aliments, cependant une transmission hydrique est possible.

### 3.2. Conditions conduisant à la contamination, au développement et à la survie du micro-organisme dans les aliments impliqués

La contamination de l'aliment pourrait survenir aux différentes étapes de la chaîne alimentaire.

La contamination de l'eau de distribution est associée à un dysfonctionnement et une contamination du réseau.

### 3.3. Mesures de maîtrise dans le secteur alimentaire

#### 3.3.1. Bonnes pratiques d'hygiène

L'hygiène personnelle et collective reste la base de la prévention primaire. Il faut insister sur le lavage des mains aux sorties des toilettes et avant chaque repas. Le personnel de cuisine et toute personne amenée à manipuler des aliments, surtout si ces aliments sont destinés à être consommés crus ou peu cuits, doivent être sensibilisés sur le risque féco-oral et les mesures d'hygiène alimentaire. Ils doivent comprendre l'importance de ne pas manipuler des aliments s'ils présentent des symptômes de gastroentérite. De plus, le respect des procédures de nettoyage-désinfection et le choix des matières premières (traçabilité, risque de contamination virale...) contribuent à une meilleure maîtrise du risque viral.

#### 3.3.2. Caractéristiques des traitements physiques, chimiques et biologiques assainissants

##### i. Traitements par la chaleur

Ils sont inactivés par la chaleur (56°C, 30 min).

##### ii. Autres traitements

Dans l'eau, les adénovirus sont détruits par l'hypochlorite de sodium à 1,5° chlorométrique en 1 minute et par les rayonnements ionisants.

### 3.4. Surveillance des aliments

#### 3.4.1. Réglementation en vigueur applicable aux denrées alimentaires identifiées comme à risque (règlement et directives européennes, critères microbiologiques, etc.) et obligation d'autocontrôle

Les adénovirus ne sont pas habituellement recherchés dans l'eau ou les aliments. Lors de l'investigation d'une gastroentérite collective, les adénovirus 40/41 peuvent être recherchés dans les selles des malades. La norme AFNOR T72-180 détermine les conditions d'évaluation de l'activité virucide des désinfectants et des antiseptiques sur les adénovirus.

#### 3.4.2. Principes des méthodes de détection, de dénombrement et de typage

La détection des adénovirus 40 et 41 dans les aliments ou dans l'eau nécessite des méthodes de biologie moléculaire (PCR) qui seules peuvent permettre la détection et le typage du virus.

## 4. Hygiène domestique

Les adénovirus résistent aux méthodes classiques de conservation des aliments (froid et congélation).

Avant consommation, les fruits et légumes consommés crus doivent être abondamment rincés avec de l'eau potable. Les aliments qui sont cuits doivent subir une température à cœur de 90°C pendant 2 minutes.

Le respect des règles d'hygiène permet d'éviter la transmission inter-humaine. Il est recommandé de se laver les mains chaque fois que l'on s'est rendu aux toilettes et avant chaque repas. Les sujets infectés par les adénovirus ne doivent pas manipuler les aliments.

## 5. Liens

Institut de Veille Sanitaire : [www.invs.sante.fr](http://www.invs.sante.fr)

Centers for Diseases Control and prevention (USA) : [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)

Eurosurveillance : [www.eurosurveillance.org](http://www.eurosurveillance.org)

Centre National de référence des virus entériques, CHU de Dijon, 21079 Dijon cedex.

Afnor : [www.afnor.org](http://www.afnor.org)

## Réovirus

**Nom scientifique** : *R.E.O. virus* = Respiratoire , Entérique, Orphelin virus., **acronyme** : ReoV, **nom usuel** : Reo, réovirus.

### 1. Nature et habitat

#### 1.1. Principales caractéristiques microbiologiques

Les réovirus sont des virus non enveloppés, leur capsid est composée de trois couches concentriques. Leur génome est constitué de segments d'ARN bicaténaire. Les réovirus appartiennent à la famille des *Reoviridae*, genre *Orthoreovirus*. Il existe 3 sérotypes et 17 génogroupes.

#### 1.2. Caractère zoonotique

Pas de réservoir animal connu, même si d'autres réovirus sont isolés chez l'animal.

#### 1.3. Réservoir (tellurique, environnemental, animal, humain)

Humain strict, avec diffusion dans l'environnement.

## 2. Maladie

### 2.1. Formes infectieuses symptomatiques (y compris complications, létalité) et formes infectieuses asymptomatiques, durée de la maladie (incubation, symptomatologie), distribution par classes d'âge. Caractère épidémique

Aujourd'hui, il n'y a encore aucune certitude que ces virus soient responsables de pathologies cliniques bien définies chez l'homme. Il s'agit de virus orphelins chez l'homme alors qu'ils peuvent être responsables de manifestations cliniques sévères chez les animaux. Les infections existent, mais elles sont asymptomatiques. Exceptionnellement, des cas d'infection respiratoire haute et de diarrhée ont été observés chez l'enfant, ainsi que de très rares cas de méningites, myocardites et pneumonie. Aucune épidémie n'a été rapportée à ce jour.

### 2.2. Modalités de contamination humaine autres que par les aliments et risque de transmission interhumaine secondaire (modalités et durée d'excrétion des germes)

Il s'agit de virus ubiquitaires tant dans leur distribution géographique que dans leur spectre d'hôte. Ils sont détectés habituellement dans les eaux stagnantes et les boues résiduaires. Ces virus ont aussi été isolés d'autres animaux comme les singes, les vaches, cochons, chats, chiens, souris, oiseaux.

### 2.3. Populations à risque

Aucune population à risque identifiée à ce jour.

### 2.4. Relations dose-effet et dose-réponse (loi/équation généralement appliquée, $DI_{50}$ , $DL_{50}$ pour l'homme si disponibles)

Chez l'homme, l'administration de  $10^{7.7}$  DICT<sub>50</sub><sup>(8)</sup> n'a pas entraîné de symptômes chez 27 volontaires sains. Lors d'épreuves d'infections expérimentales, seuls 30 % des patients infectés avec T1L ont développé des signes cliniques (syndrome grippal). Le virus peut être détecté sur un prélèvement nasal, de selles. Aucun signe n'a été observé pour les patients infectés avec T2J, et seul 1 des 8 patients infectés expérimentalement par T3D a développé une rhinite. Le virus a été isolé des selles de la majorité des patients (95 %).

### 2.5. Diagnostic (sérologique, immunologique, etc.)

Pas de diagnostic sérologique commercialisé à ce jour. Une étude sérologique faite chez les adolescents montre que 80 % d'entre eux ont des anticorps neutralisants vis-à-vis des trois sérotypes à l'âge de 18 ans. Seul le diagnostic direct (mise en culture ou RT-PCR) est possible.

### 2.6. Traitement et prévention médicale (par exemple, vaccination)

Aucun traitement, aucune vaccination disponible.

### 2.7. Prévalence et/ou incidence annuelle des décès, des malades, des porteurs sains (séroconversion, portage digestif) et/ou des cas d'hospitalisation. Comparaison entre la France et d'autres pays (en précisant l'année et l'évolution récente)

Pas de notion de prévalence.

## 3. Rôle des aliments

### 3.1. Aliment(s) impliqué(s) (eaux, denrées animales et végétales)

Pas de notion d'infection par ingestion de produits contaminés.

### 3.2. Conditions conduisant à la contamination, au développement et à la survie du micro-organisme dans les aliments impliqués

Pas d'information.

(8) Dose infectieuse en culture cellulaire 50.

### 3.3. Mesures de maîtrise dans le secteur alimentaire

#### 3.3.1. Bonnes pratiques d'hygiène

L'hygiène personnelle et collective reste la base de la prévention primaire. Il convient d'insister sur le lavage des mains aux sorties des toilettes et avant chaque repas. Le personnel de cuisine ou toute personne amenée à manipuler des aliments, surtout si ces aliments sont destinés à être consommés crus ou peu cuits, doit être sensibilisé sur le risque féco-oral et les mesures d'hygiène alimentaire. De plus, le respect des procédures de nettoyage-désinfection et le choix des matières premières (traçabilité, risque de contamination virale...) contribuent à une meilleure maîtrise du risque viral.

#### 3.3.2. Caractéristiques des traitements physiques, chimiques et biologiques assainissants

Les réovirus sont stables à température ambiante et à 4°C. Ils résistent aussi aux pH entre 2 et 9, et aux températures de 55°C.

**Oxydants** : chlore (eau de Javel à 800 ppm), inactive 10<sup>5</sup> UFP de réovirus 3 en 30 secondes. En parallèle, le brome et l'iode sont aussi efficaces. La dilution de l'eau de Javel (600 ppm) réduit très significativement l'efficacité de la désinfection (seulement 10<sup>2</sup> UFP en 30 secondes).

**Éthanol** à 95 % inactive 10<sup>5</sup> UFP de réovirus 3 en 30 secondes (dilution finale dans test 76 %). Par contre, l'éthanol à 70 % est inefficace (dilution finale dans test 56 %).

**Autres produits chimiques** : Glutaraldéhyde à la concentration finale de 5 % efficace, mais le degré d'efficacité n'est pas mesuré.

Des produits commerciaux ont aussi été évalués comme Wescodyne, One stroke Vespene et Sonacide. Ils sont moins efficaces que l'éthanol ou le chlore concentrés (10<sup>2</sup> UFP en 30 secondes en moyenne).

### 3.4. Surveillance des aliments

#### 3.4.1. Réglementation en vigueur applicable aux denrées alimentaires identifiées comme à risque (règlement et directives européennes, critères microbiologiques, etc.) et obligation d'autocontrôle

Pas de surveillance spécifique prévue.

#### 3.4.2. Principes des méthodes de détection, de dénombrement et de typage

Pas de Norme spécifique.

## 4. Hygiène domestique

Les réovirus résistent aux méthodes classiques de conservation des aliments (froid et congélation).

Avant consommation, les fruits et légumes consommés crus doivent être abondamment rincés avec de l'eau potable. Les aliments qui sont cuits doivent subir une température à cœur de 90°C pendant 2 minutes.

Ces virus sont hébergés exclusivement par l'homme. Le respect des règles d'hygiène permet d'éviter la transmission inter-humaine. Il est recommandé de se laver les mains chaque fois que l'on s'est rendu aux toilettes et avant chaque repas. Les sujets infectés ne doivent pas manipuler les aliments.

## 5. Liens

Tyler KL. Mammalian Reoviruses. In Knipe DM, Howley PM (Eds.), Fields Virology, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. 2001 : 1729-1745.

Principles and practice of clinical virology (5th edition)

Centre National de référence des virus entériques, CHU de Dijon, 21079 Dijon cedex.

CNR des entérovirus, Lyon ([www.univ-lyon1.fr](http://www.univ-lyon1.fr))

## Entérovirus

**Nom scientifique :** *Human Enterovirus*, **acronyme :** HEV, **nom usuel :** entérovirus.

### 1. Nature et habitat

#### 1.1. Principales caractéristiques microbiologiques

Les entérovirus humains (HEV) sont des virus non enveloppés dont le génome est constitué d'un ARN monocaténaire de polarité positive. Ils font partie de la famille des *Picornaviridae*, genre *Enterovirus*. Les entérovirus humains comprennent 5 espèces et au moins 64 sérotypes. La classification actuelle divise les entérovirus en 4 génogroupes (A, B, C et D). De nouveaux sérotypes sont régulièrement décrits.

#### 1.2. Caractère zoonotique

Il ne s'agit pas d'agents zoonotiques.

#### 1.3. Réservoir (tellurique, environnemental, animal, humain)

La transmission des entérovirus est d'autant facilitée que ces virus sont extrêmement résistants aux conditions extérieures telles que les pH acides, les températures extrêmes. Ces propriétés assurent aux entérovirus une très bonne dissémination dans les sols, les eaux de surface ou encore les eaux usées de stations d'épuration. Notons que les entérovirus humains ne sont pas inactivés dans l'eau de mer et se retrouveront donc souvent captés par les mollusques filtreurs tels que les huîtres.

L'excrétion virale chez les personnes infectées est souvent prolongée, pendant au moins 4 à 6 semaines. Chez le patient immunodéprimé, cette excrétion fécale peut être prolongée pendant plusieurs mois, voire années.

### 2. Maladie

#### 2.1. Formes infectieuses symptomatiques (y compris complications, létalité) et formes infectieuses asymptomatiques, durée de la maladie (incubation, symptomatologie), distribution par classes d'âge. Caractère épidémique

Les entérovirus sont des pathogènes largement ubiquitaires, présents dans toutes les régions du monde. Leur mode de transmission principal est oro-fécal (*via* des objets, aliments liquides ou solides souillés par la salive ou les matières fécales), ce qui explique une prévalence élevée des infections pendant la petite enfance, notamment dans les pays à bas niveau socio-économique et d'hygiène.

Les infections à entérovirus comptent parmi les plus fréquentes viroses humaines, pouvant conduire tant à des infections asymptomatiques qu'à des troubles cliniques sévères. Il est considéré que près de 95 % des infections sont asymptomatiques. Parmi les formes cliniques les plus fréquentes, il est observé :

- i. des syndromes gastro-intestinaux (diarrhée) ;
- ii. des méningites lymphocytaires à liquide clair et des encéphalites ;
- iii. des Poliomyélites Paralytiques Aiguës (pour le poliovirus) ;
- iv. des infections généralisées du nouveau-né ;
- v. des atteintes respiratoires hautes et basses ;
- vi. des atteintes cardiaques ;
- vii. des infections cutanéomuqueuses.

#### 2.2. Modalités de contamination humaine autres que par les aliments et risque de transmission interhumaine secondaire (modalités et durée d'excrétion des germes)

La transmission est oro-fécale. Il est possible de se contaminer en ingérant de l'eau ou des aliments contaminés. L'incubation est courte, habituellement de moins de 1 semaine, mais pouvant aller jusqu'à 15 jours, notamment pour le poliovirus. La transmission est essentiellement assurée par la voie fécale, la durée d'excrétion pouvant atteindre 4 à 6 semaines. Cette durée d'excrétion est de plusieurs mois chez l'immunodéprimé.

### 2.3. Populations à risque

La transmission nosocomiale a également été rapportée, notamment pour les Coxsackievirus B et Echovirus 11, particulièrement redoutables chez les nouveau-nés. Chez les enfants agammaglobulinémiques, les infections évoluent sur un mode chronique et peuvent entraîner le décès.

### 2.4. Relations dose-effet et dose-réponse (loi/équation généralement appliquée, $DI_{50}$ , $DL_{50}$ pour l'homme si disponibles)

Pas de données précises pour chaque sérotype. Pour les poliovirus, il semble qu'une dose entre 4 et 72  $DICT_{50}$  (soit environ 1 000 ufp) induise l'infection chez l'homme dans 50 % des cas. Pour Échovirus 12, la dose de 1 500 ufp induit une infection asymptomatique dans 60 % des cas.

### 2.5. Diagnostic (sérologique, immunologique, etc.)

Essentiellement par détection directe par mise en culture et/ou détection par RT-PCR. Pour la poliomyélite, la sérologie n'est pas utilisable en France du fait de la présence d'une excellente couverture vaccinale.

### 2.6. Traitement et prévention médicale (par exemple, vaccination)

Vaccination contre la poliomyélite, possibilité d'utiliser le Pléconaril (disponible en autorisation temporaire d'utilisation).

### 2.7. Prévalence et/ou incidence annuelle des décès, des malades, des porteurs sains (séroconversion, portage digestif) et/ou des cas d'hospitalisation. Comparaison entre la France et d'autres pays (en précisant l'année et l'évolution récente)

Les données de surveillance du CNR montrent une prévalence élevée des infections à entérovirus en France, avec une recrudescence des cas en période estivo-automnale. L'estimation précise est impossible car plus de 95 % des infections à entérovirus sont asymptomatiques. L'infection à entérovirus la mieux surveillée en France est la méningite lymphocytaire.

Il existe un centre de référence des entérovirus basé à Lyon (Pr Lina-Dr Chomel).

RSE : Réseau de surveillance des entérovirus (26 laboratoires volontaires sur le territoire métropolitain).

Réseau d'étude des virus d'origine alimentaire en Europe « Foodborne viruses in Europe ».

## 3. Rôle des aliments

### 3.1. Aliment(s) impliqué(s) (eaux, denrées animales et végétales)

Les aliments qui ont été identifiés comme contaminés ont été les fruits (framboises), des légumes et salades lavés avec de l'eau contaminée. La contamination de ces aliments est souvent faible, les virus sont le plus souvent adsorbés sur des particules et/ou sous forme d'agglomérats.

La plus importante source de contamination est constituée par les coquillages bivalves filtreurs. Pour ces coquillages, la concentration en virus est parfois très élevée ; les virus persistent essentiellement dans le tractus digestif du coquillage. Le degré de contamination dépend de nombreux facteurs (saison, pluies, etc.).

### 3.2. Conditions conduisant à la contamination, au développement et à la survie du micro-organisme dans les aliments impliqués

Cette contamination est liée à l'exposition des coquillages à des sources de contamination d'origine tellurique ou humaine.

Les aliments peuvent alors être contaminés lors de la production. Ainsi, des coquillages élevés dans un site souillé par des rejets peuvent concentrer les virus, tandis que les végétaux sont contaminés soit par apport de fertilisants d'origine humaine (encore utilisés dans certains pays), soit par de l'eau d'irrigation contaminée. Par ailleurs, les contaminations introduites lors de la préparation et des manipulations humaines ne doivent pas être négligées et sont de plus en plus mises en cause. Ainsi, le simple fait de prendre à main nue de la salade permet le transfert de 10 % des virus présents sur les doigts.

### 3.3. Mesures de maîtrise dans le secteur alimentaire

Une surveillance étroite des coquillages est réalisée par les laboratoires IFREMER, notamment.

#### 3.3.1. Bonnes pratiques d'hygiène

L'hygiène personnelle et collective reste la base de la prévention primaire. Il convient d'insister sur le lavage des mains aux sorties des toilettes et avant chaque repas. Le personnel de cuisine et toute personne amenée à manipuler des aliments, surtout si ces aliments sont destinés à être consommés crus ou peu cuits, doivent être sensibilisés sur le risque féco-oral et les mesures d'hygiène alimentaire. De plus, le respect des procédures de nettoyage-désinfection et le choix des matières premières (traçabilité, risque de contamination virale...) contribuent à une meilleure maîtrise du risque viral.

#### 3.3.2. Caractéristiques des traitements physiques, chimiques et biologiques assainissants

Les entérovirus sont inactivés par une exposition à une température de 50°C pendant 2 heures ; ils sont stables en milieu acide (pH : 3-5) et sous l'effet de l'éther.

Leur sensibilité aux désinfectants a été mesurée sur un virus prototype : le poliovirus de type 1. Ce virus résiste à des expositions courtes aux désinfectants d'usage courant comme l'éthanol à 70 %, le lysol à 5 % ; les composés d'ammonium quaternaire à 1 %. Ils sont par contre inactivés rapidement par le formol à 3 % et par un traitement prolongé par le glutaraldéhyde à 2 % (réduction de 3 log en 30 min). Ces virus sont inactivés par l'hypochlorite de sodium à 1 % et le chlore libre (une solution de chlore à 1mg/L réduit le titre infectieux de 4 log en 5 minutes).

L'acide peracétique est aussi efficace à pH neutre et à température ambiante ; la réduction du titre est de 1 log en 10 min et de 2,5 log en 60 min.

Des essais de comparaison de résistance vis-à-vis des désinfectants entre les poliovirus et les non-poliovirus ont montré que le poliovirus était plus résistant que le Cox B5 ou l'ECHO 30.

### 3.4. Surveillance des aliments

#### 3.4.1. Réglementation en vigueur applicable aux denrées alimentaires identifiées comme à risque (règlement et directives européennes, critères microbiologiques, etc.) et obligation d'autocontrôle

Surveillance des coquillages et des eaux de boisson : il n'existe aucune réglementation imposée.

#### 3.4.2. Principes des méthodes de détection, de dénombrement et de typage

Cette surveillance se fait par détection de virus et/ou de séquences d'ARN viral par des techniques adaptées.

## 4. Hygiène domestique

Les entérovirus résistent aux méthodes classiques de conservation des aliments (froid et congélation), ainsi qu'à la température (30 min à 60°C) et aux variations de pH (3h à pH 3 à température ambiante).

Avant consommation, les fruits et légumes consommés crus doivent être abondamment rincés avec de l'eau potable. Seuls les coquillages provenant de zones de culture contrôlées et propres peuvent être consommés ; ceux qui sont cuits doivent subir une température à cœur de 90°C pendant 2 minutes.

Le respect des règles d'hygiène permet d'éviter la transmission inter-humaine. Il est recommandé de se laver les mains chaque fois que l'on s'est rendu aux toilettes et avant chaque repas. Les sujets infectés ne doivent pas manipuler les aliments.

## 5. Liens

Pallansch MA & Roos RP. Enteroviruses: polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In Knipe DM, Howley PM (Eds.), Fields Virology, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. 2001 : 723-775. Picornavirus, ASM book.

CNR des entérovirus, Lyon

Institut de Veille Sanitaire : [www.invs.sante.fr](http://www.invs.sante.fr)

Centers for Diseases Control and prevention (USA) : [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)

Eurosurveillance : [www.eurosurveillance.org](http://www.eurosurveillance.org)

## Paréchovirus

**Nom scientifique :** *Human Parechovirus*, **acronyme :** HPeV, **nom usuel :** paréchovirus.

### 1. Nature et habitat

#### 1.1. Principales caractéristiques microbiologiques

Les paréchovirus humains (HPeV) sont des virus non enveloppés dont le génome est constitué d'un ARN monocaténaire de polarité positive. Ils font partie de la famille des *Picornaviridae*, genre *Parechovirus*. Les paréchovirus humains comprennent 3 sérotypes.

#### 1.2. Caractère zoonotique

Il ne s'agit pas d'agents zoonotiques.

#### 1.3. Réservoir (tellurique, environnemental, animal, humain)

La transmission des paréchovirus est d'autant facilitée que ces virus sont résistants aux conditions extérieures telles que les pH acides, les températures extrêmes. Ces propriétés leur assurent une très bonne dissémination dans les sols, les eaux de surface ou encore les eaux usées de stations d'épuration (Morens & Pallansch, 1995).

L'excrétion virale dans le réservoir est assurée exclusivement par l'homme. Elle est souvent prolongée, pendant au moins 4 à 6 semaines.

### 2. Maladie

#### 2.1. Formes infectieuses symptomatiques (y compris complications, létalité) et formes infectieuses asymptomatiques, durée de la maladie (incubation, symptomatologie), distribution par classes d'âge. Caractère épidémique

Les paréchovirus sont des pathogènes largement ubiquitaires, présents dans toutes les régions du monde. Leur mode de transmission principal est oro-fécal (*via* des objets, aliments liquides ou solides souillés par la salive ou les matières fécales), ce qui explique une prévalence élevée des infections pendant la très petite enfance, notamment dans les pays à bas niveau socio-économique et d'hygiène.

Les infections à paréchovirus sont rapportées exceptionnellement. Comme pour les entérovirus, il est probable qu'il y ait de très nombreuses infections asymptomatiques. Parmi les rares formes cliniques observées sont retrouvés :

- des syndromes gastro-intestinaux (diarrhée) ;
- des méningites lymphocytaires à liquide clair.

#### 2.2. Modalités de contamination humaine autres que par les aliments et risque de transmission interhumaine secondaire (modalités et durée d'excrétion des germes)

La transmission est oro-fécale. Il est possible de se contaminer en ingérant de l'eau ou des aliments contaminés. L'incubation est courte, habituellement de moins de 1 semaine, mais pouvant aller jusqu'à 15 jours. La transmission est essentiellement assurée par la voie fécale, la durée d'excrétion pouvant atteindre 4 à 6 semaines.

#### 2.3. Populations à risque

Pas de population à risque.

#### 2.4. Relations dose-effet et dose-réponse (loi/équation généralement appliquée, $DI_{50}$ , $DL_{50}$ pour l'homme si disponibles)

Pas de données précises. Il est possible d'extrapoler les données présentées pour les entérovirus (dose infectante 50 % : environ 1 000 ufp).

### 2.5. Diagnostic (sérologique, immunologique, etc.)

Essentiellement par détection directe par mise en culture et/ou détection par RT-PCR.

### 2.6. Traitement et prévention médicale (par exemple, vaccination)

Aucun traitement disponible.

### 2.7. Prévalence et/ou incidence annuelle des décès, des malades, des porteurs sains (séroconversion, portage digestif) et/ou des cas d'hospitalisation. Comparaison entre la France et d'autres pays (en précisant l'année et l'évolution récente)

Les données de surveillance du CNR montrent une prévalence quasi nulle.

## 3. Rôle des aliments

### 3.1. Aliment(s) impliqué(s) (eaux, denrées animales et végétales)

Les aliments qui pourraient être vecteurs sont reconnus pour véhiculer les entérovirus. Il n'y a aujourd'hui pas de preuve de transmission par les aliments.

### 3.2. Conditions conduisant à la contamination, au développement et à la survie du micro-organisme dans les aliments impliqués

Cette contamination est liée à l'exposition des coquillages à des sources de contamination d'origine tellurique ou humaine.

Les aliments peuvent alors être contaminés lors de la production. Ainsi, des coquillages élevés dans un site souillé par des rejets peuvent concentrer les virus, tandis que les végétaux sont contaminés soit par apport de fertilisants d'origine humaine (encore utilisés dans certains pays), soit par de l'eau d'irrigation contaminée. Par ailleurs, les contaminations introduites lors de la préparation et des manipulations humaines ne doivent pas être négligées et sont de plus en plus mises en cause. Ainsi, on sait que pour des virus similaires (HAV), le simple fait de prendre à main nue de la salade permet le transfert de 10 % des virus présents sur les doigts.

### 3.3. Mesures de maîtrise dans le secteur alimentaire

Une surveillance étroite des coquillages est réalisée par le laboratoire IFREMER notamment.

#### 3.3.1. Bonnes pratiques d'hygiène

L'hygiène personnelle et collective reste la base de la prévention primaire. Il faut insister sur le lavage des mains aux sorties des toilettes et avant chaque repas. Le personnel de cuisine et toute personne amenée à manipuler des aliments, surtout si ces aliments sont destinés à être consommés crus ou peu cuits, doivent être sensibilisés sur le risque féco-oral et les mesures d'hygiène alimentaire. De plus, le respect des procédures de nettoyage-désinfection et le choix des matières premières (traçabilité, risque de contamination virale...) contribuent à une meilleure maîtrise du risque viral.

#### 3.3.2. Caractéristiques des traitements physiques, chimiques et biologiques assainissants

Les paréchovirus sont inactivés par une exposition à une température de 50°C pendant 2 heures ; ils sont stables en milieu acide (pH : 3-5) et sous l'effet de l'éther.

Leur sensibilité aux désinfectants est mesurée en fonction de résultats obtenus sur un virus prototype : le poliovirus de type 1. Ce virus résiste à des expositions courtes aux désinfectants d'usage courant comme l'éthanol à 70 %, le lysol à 5 % ; les composés d'ammonium quaternaire à 1 %. Ils sont par contre inactivés rapidement par le formol à 3 %, en 10 min par une solution à 2 ‰ d'iode et par un traitement prolongé par le glutaraldéhyde à 2 % (réduction de 3 log en 30 min). Ces virus sont inactivés par l'hypochlorite de sodium à 1 % et le chlore libre (une solution à 1 mg de chlore par L réduit le titre infectieux de 4 log en 5 minutes).

L'acide peracétique est aussi efficace à pH neutre et à température ambiante ; la réduction du titre est de 1 log en 10 min et de 2,5 log en 60 min.

Des essais de comparaison de résistance vis-à-vis des désinfectants entre les poliovirus et les non-poliovirus ont montré que le polio était plus résistant que le Cox B5 ou l'ECHO 30.

### 3.4. Surveillance des aliments

#### 3.4.1. Réglementation en vigueur applicable aux denrées alimentaires identifiées comme à risque (règlement et directives européennes, critères microbiologiques, etc.) et obligation d'autocontrôle

Surveillance des coquillages et des eaux de boisson : il n'existe aucune réglementation imposée.

#### 3.4.2. Principes des méthodes de détection, de dénombrement et de typage

Cette surveillance se fait par détection de virus et/ou de séquences d'ARN viral par des techniques adaptées.

## 4. Hygiène domestique

Les paréchovirus résistent aux méthodes classiques de conservation des aliments (froid et congélation).

Avant consommation, les fruits et légumes consommés crus doivent être abondamment rincés avec de l'eau potable. Les aliments qui sont cuits doivent subir une température à cœur de 90°C pendant 2 minutes.

Le respect des règles d'hygiène permet d'éviter la transmission inter-humaine. Il est recommandé de se laver les mains chaque fois que l'on s'est rendu aux toilettes et avant chaque repas. Les sujets infectés ne doivent pas manipuler les aliments.

## 5. Liens

Pallansch MA & Roos RP. Enteroviruses: polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In Knipe DM, Howley PM (Eds.), Fields Virology, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. 2001 : 723-775. Picornavirus, ASM book

CNR des entérovirus, Lyon

Institut de Veille Sanitaire : [www.invs.sante.fr](http://www.invs.sante.fr)

Centers for Diseases Control and prevention (USA) : [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)

Eurosurveillance : [www.eurosurveillance.org](http://www.eurosurveillance.org)

## Conclusion

Pour conclure, le risque n'est pas identique pour tous ces virus. À l'heure actuelle, les risques sanitaires les plus importants sont liés à la consommation d'aliments ou d'eaux contaminés par les norovirus ou le virus de l'hépatite A responsables respectivement de gastroentérites et d'hépatites aiguës. Ces virus très résistants sont largement excrétés dans les selles et contaminent l'environnement. Ces virus n'étant pas ou difficilement cultivables, leur détection et leur quantification dans les selles, les aliments ou l'eau reposent essentiellement sur des méthodes de biologie moléculaire (RT-PCR classiques ou en temps réel).

Les rotavirus posent également un problème de santé publique. Mais ce problème est surtout lié à l'importance des épidémies hivernales récurrentes qui surviennent chez les nourrissons avec le risque de déshydratation pouvant conduire à une hospitalisation.

Quant aux autres virus, ils représentent en France un risque sanitaire moindre voire, pour certains virus, minime ou encore à démontrer.

**Question 2 : Quel est le cadre réglementaire actuel, national et international, concernant les virus dans les aliments (denrées et eaux de consommation) ?**



## Question 2 : Quel est le cadre réglementaire actuel, national et international, concernant les virus dans les aliments (denrées et eaux de consommation) ?

Coordinateurs de la question : M. Grimault, Mme Bultel

Personnalités consultées : M. Saout, Mme Novelli, M. Robin, Mme Kremer, M. Cunin

### Résumé de la Question 2

Diverses mesures portant sur l'ensemble de la production et de la distribution d'eau permettent d'assurer la **sécurité sanitaire des eaux de consommation via des obligations de moyens et des obligations de résultats**. Dans le Code de la santé publique il est précisé que « *les eaux destinées à la consommation humaine doivent (...) ne pas contenir un nombre ou une concentration de micro-organismes, de parasites ou de toutes autres substances constituant un danger potentiel pour la santé des personnes.*»

Les mesures réglementaires visent à :

- protéger la ressource par l'instauration d'un périmètre de protection autour des captages : de protection immédiate, rapprochée et éventuellement éloignée ;
- adapter le traitement de l'eau à la ressource ;
- surveiller le respect de la qualité microbiologique de l'eau par l'intermédiaire d'indicateurs microbiologiques et physico-chimiques.

Toutefois, les virus ne font pas l'objet d'une recherche en routine et la pertinence des indicateurs microbiologiques pour témoigner de la présence de virus dans l'eau est contestable. En cas de détection de la présence anormale d'un ou de plusieurs micro-organismes dépassant les valeurs réglementaires dans un (ou plusieurs) échantillon (s) d'eau de même origine, une procédure à suivre est proposée dans un avis du CSHPF, qui peut conduire à la recherche de virus dans l'eau.

Enfin, l'article R. 1321-24 du code de la santé publique encourage la mise en place d'un plan d'assurance qualité au sein du système de production et de distribution avec notamment, une analyse régulière des risques, comportant l'identification des points critiques et les actions permettant de maîtriser les risques, et la mise en œuvre de vérifications et de suivis efficaces au niveau de ces points.

Par ailleurs, les réglementations proposées dans d'autres pays européens ou d'Amérique du nord sont présentées dans ce document.

**Dans le domaine de l'hygiène des denrées alimentaires**, aux niveaux français et européen, il n'existe pas à l'heure actuelle de textes réglementaires concernant les denrées alimentaires fixant de critères microbiologiques réglementaires pour les virus.

Au niveau européen, le règlement de la Commission du 15 novembre 2005 n° 2703/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires, qui est entré en application dans tous les États-membres au 1<sup>er</sup> janvier 2006, s'inscrit dans le cadre de la réforme de la réglementation européenne dans le domaine de l'hygiène des denrées alimentaires. Le règlement (CE) n° 2073/2005 rappelle ainsi dans son premier considérant que l'obtention d'un niveau élevé de protection de la santé humaine et de la santé animale est l'un des objectifs fondamentaux de la législation alimentaire, comme l'énonce le règlement (CE) no 178/2002. Il souligne que les risques microbiologiques liés aux denrées alimentaires constituent une source majeure de maladies d'origine alimentaire chez l'homme. Il rappelle que la sécurité des denrées alimentaires est principalement assurée par une approche préventive telle que la mise en œuvre de bonnes pratiques d'hygiène et de fabrication et l'application des principes HACCP (analyse des dangers - points critiques pour leur maîtrise). Dès lors, les critères microbiologiques peuvent servir pour la validation et la vérification des procédures fondées sur les principes HACCP et des autres mesures de contrôle de l'hygiène. Il convient donc d'établir des critères microbiologiques définissant l'acceptabilité de ces procédés, ainsi que des critères de sécurité microbiologique fixant une limite au-delà de laquelle on doit considérer qu'une denrée alimentaire est contaminée de manière inacceptable par les micro-organismes pour lesquels les critères sont établis.

Le règlement (CE) n° 2073/2005 précise dans son deuxième considérant que les denrées alimentaires ne doivent pas contenir de micro-organismes ni leurs toxines ou métabolites dans des quantités qui présentent un risque inacceptable pour la santé humaine. Dans ce règlement, sont ainsi définis sous le terme micro-organismes *les bactéries, les virus, les levures, les moisissures, les algues, les protozoaires parasites, les helminthes parasites microscopiques, ainsi que leurs toxines et métabolites*. Les virus entrent donc dans ce cadre. Néanmoins, aucun critère microbiologique réglementaire n'est fixé pour les virus dans quelque matrice alimentaire que ce soit ; ceci notamment faute de méthodes d'analyse suffisamment fiables. Le règlement précise ainsi dans son 27<sup>e</sup> considérant qu'il conviendrait en particulier de fixer des critères applicables aux virus pathogènes dans les mollusques bivalves vivants si les méthodes d'analyse sont suffisamment développées.

Par ailleurs, le règlement (CE) n° 2073/2005 précise, dans son 12<sup>e</sup> considérant que les 30 et 31 janvier 2002, le CSMVSP a délivré un avis sur les virus de type Norwalk (ou norovirus). Dans son avis, le comité est parvenu à la conclusion que les indicateurs fécaux conventionnels n'étaient pas fiables pour démontrer la présence ou l'absence de virus de type Norwalk et que le recours à l'élimination des indicateurs bactériens fécaux pour déterminer les durées de purification des mollusques constituait une pratique dangereuse. Le comité a également recommandé d'utiliser *E. coli* au lieu des coliformes fécaux pour déterminer la contamination fécale dans les zones de ramassage des mollusques lorsque des indicateurs bactériens sont appliqués.

C'est donc l'indicateur *E. coli* qui est préconisé pour les produits décortiqués et décoquillés de crustacés et de mollusques cuits, et qui permet de tester la qualité des lots analysés.

Le développement des méthodes d'analyse apparaît essentiel avant de fixer des critères applicables aux virus pathogènes dans les mollusques bivalves vivants. Pour cela un groupe de travail a été mis en place afin de valider une méthode horizontale pour la détection des norovirus et VHA dans les aliments par RT-PCR en temps réel (groupe CEN/TC275/WG6/TAG4).

## A. État des lieux et perspectives concernant la réglementation relative aux virus dans les eaux destinées à la consommation humaine

### A.1 Réglementation concernant les virus dans les eaux de consommation

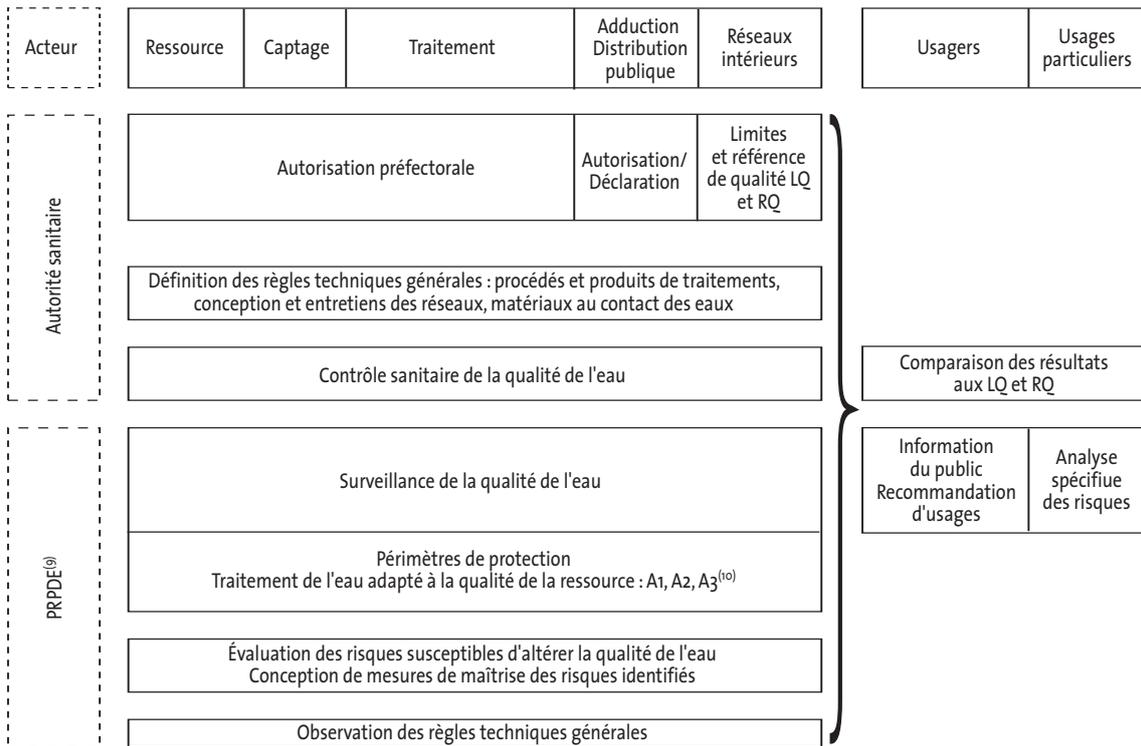
#### A.1.1 Au niveau français

Dans le but d'assurer la sécurité sanitaire des eaux, les autorités sanitaires ont pris diverses mesures :

- des obligations de **moyens** par le biais de :
  - dispositions administratives : un régime d'autorisation préfectorale, un régime d'autorisation de prélèvement d'eau dans le milieu naturel (application de la loi sur l'eau de 1992),
  - dispositions techniques :
    - . des règles techniques sur les captages,
    - . des périmètres de protection,
    - . des normes de qualité des eaux brutes,
    - . des dispositions sur les produits et procédés de traitement,
    - . des dispositions sur les matériaux au contact des eaux,
    - . des règles d'hygiène sur les réseaux,
    - . des règles en matière de suivi de la qualité des eaux (surveillance et contrôle sanitaire indépendant)
  - l'avis d'instances nationales d'expertise : l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa), le Conseil supérieur d'hygiène publique de France (CSHPF) ;
- des obligations de **résultats** : la qualité des eaux est exigée au robinet du consommateur.

Ces mesures portent sur l'ensemble de la production – distribution d'eau. Pour l'essentiel, ces mesures sont fixées par le code de la santé publique relatif aux eaux destinées à la consommation humaine à l'exclusion des eaux minérales naturelles, en application de la directive européenne.

Figure 1 : les principales règles applicables aux eaux destinées à la consommation humaine



**A.1.1.1 Protection de la ressource et des captages**

La réglementation prévoit l'instauration de périmètres de protection autour des captages utilisés pour la production d'eau destinée à la consommation humaine. Les usages sont réglementés à l'intérieur de ces périmètres afin de prévenir des contaminations éventuelles.

Ce point est détaillé dans la question 6.

**A.1.1.2 Adaptation du traitement des eaux à la ressource : obligation de moyens**

Des exigences de qualité existent pour les eaux douces superficielles utilisées ou destinées à être utilisées pour la production d'eau destinée à la consommation humaine.

Ces exigences permettent, en application de la directive 75/440/CEE du 16 juin 1975, de caractériser globalement une ressource en eau et d'apprécier les possibilités et le niveau de traitement à réaliser. Ainsi les eaux douces superficielles utilisées pour la production d'eau d'alimentation sont classées selon leur qualité dans les groupes A1, A2, A3 en fonction de critères définis dans l'arrêté du 11 janvier 2007<sup>(11)</sup>. Leur utilisation pour la consommation humaine est subordonnée pour les eaux classées en :

- Groupe A1 : à un traitement physique simple et à une désinfection ;
- Groupe A2 : à un traitement normal physique, chimique et à une désinfection ;
- Groupe A3 : à un traitement physique et chimique poussé, à des opérations d'affinage et de désinfection.

(9) Personne responsable de la production ou de la distribution de l'eau.

(10) Voir paragraphe 1.1.2.

(11) Arrêté du 11 janvier 2007 relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine mentionnées aux articles R. 1321-2, R. 1321-3, R. 1321-7 et R. 1321-38 du code de la santé publique.

**Tableau 2 : limite de qualité pour les eaux douces superficielles utilisées ou destinées à être utilisées pour la production d'eaux destinées à la consommation humaine (valeurs guides pour les paramètres microbiologiques)**

Groupe d'eau	A1 (valeur guide)	A2 (valeur guide)	A3 (valeur guide)
Coliformes totaux 37°C (/100 ml)	50	5 000	50 000
<i>Escherichia coli</i> (/100 ml)	20	2 000	20 000
Entérocoques (/100 ml)	20	1 000	10 000
Salmonelles	Absent dans 5 000 ml	Absent dans 1 000 ml	

En outre, les eaux brutes, quelle que soit leur origine, utilisées pour la production d'eau destinée à la consommation humaine **ne doivent pas contenir plus de 20 000 *Escherichia coli* et plus de 10 000 entérocoques pour 100 millilitres** d'eau prélevée comme précisé dans l'arrêté du 11 janvier 2007.

**A.1.1.3 Des limites et références de qualité pour les eaux distribuées : obligation de résultats**

**i. Eaux de distribution**

Il est précisé dans le Code de la santé publique en article R. 1321-2 que « *les eaux destinées à la consommation humaine doivent (...) ne pas contenir un nombre ou une concentration de micro-organismes, de parasites ou de toutes autres substances constituant un danger potentiel pour la santé des personnes.* »

**Tableau 3 : critères microbiologiques auxquels doivent répondre les eaux destinées à la consommation humaine - Annexe I de l'arrêté du 11 janvier 2007**

<b>Limites de qualité</b>	<b>Points de conformité :</b>	Robinet
	<i>E. coli</i> Entérocoques	0 dans 100 mL 0 dans 100 mL
<b>Référence de qualité</b>	<b>Points de conformité</b>	Robinet
	Bactéries coliformes Bactéries sulfito-réductrices y compris les spores Numération de germes aérobies revivifiants à 22°C et à 37°C	0 dans 100 mL 0 dans 100 mL <sup>(12)</sup>  Variation dans un rapport de 10 par rapport à la valeur habituelle

Le Code de la santé publique distingue deux types de paramètres :

- les **limites de qualité** pour les paramètres dont la présence dans l'eau pourrait présenter des risques immédiats ou à plus long terme pour la santé du consommateur ;
- les **références de qualité** pour des paramètres indicateurs de qualité, témoins du fonctionnement des installations de production et de distribution. Lorsque les caractéristiques des eaux s'écartent de ces valeurs, des enquêtes et des vérifications particulières doivent être conduites pour comprendre la situation, apprécier les risques éventuels et pouvoir remédier à la situation.

(12) Eaux d'origine superficielle ou influencée par une eau d'origine superficielle - en cas de non respect : mener une enquête pour évaluer la présence d'autres micro-organismes (par exemple *Cryptosporidium*).

**Tableau 4 : fréquences annuelles d'échantillonnages et d'analyses au point de mise en distribution et d'utilisation - Annexe II de l'arrêté du 11 janvier 2007 <sup>(13)</sup>**

Population desservie (habitants)	Débit (m <sup>3</sup> /j)	Point de mise en distribution	Distribution (robinets)
0 à 49	0-9	1	Entre 2 et 4
50 à 499	10-99	2	Entre 3 et 4
500 à 1 999	100-399	2	6
2 000 à 4 999	400-999	3	9
5 000 à 14 999	1 000-2 999	5	12
15 000 à 29 999	3 000-5 999	6	25
30 000 à 99 999	6 000-19 999	12	61
100 000 à 149 999	20 000-29 999	24	150
150 000 à 199 999	30 000-39 999	36	210
200 000 à 299 999	40 000-59 999	48	270
300 000 à 499 999	60 000-99 999	72	390
500 000 à 625 000	100 000-125 000	100	630
> 625 000	> 125 000	144	800*

\* pour cette catégorie, 3 analyses supplémentaires doivent être réalisées par tranche supplémentaire de 100 000 m<sup>3</sup>/j du volume total.

En cas de détection de la présence anormale d'un ou de plusieurs micro-organismes dépassant les valeurs réglementaires dans un(plusieurs) échantillon(s) d'eau de même origine, une procédure à suivre est proposée dans un avis du CSHPF, qui peut conduire à la recherche de virus dans l'eau (CSHPF 2005).

Hormis les critères microbiologiques, certains paramètres pour lesquels des limites et/ou des références de qualité sont fixées dans le code de la santé publique peuvent avoir un impact sur la qualité microbiologique des eaux distribuées.

La turbidité <sup>(14)</sup> constitue un indicateur global qui prend en compte toutes les matières colloïdales et insolubles d'origine minérale (argile, limons, hydroxydes de fer, aluminium, manganèse, etc.) ou organiques (acides humiques et fulviques, protéines, micro-organismes de taille supérieure à 0,1 µm). Ces éléments peuvent constituer des supports pour les micro-organismes (parasites, virus, bactéries).

Pour les eaux de surface et les eaux souterraines influencées par des eaux superficielles et/ou polluées par des eaux de ruissellement, l'arrêté du 11 janvier 2007 prévoit pour la turbidité au point de mise en distribution :

- une référence de qualité de 0,5 NFU ;
- une limite de qualité de 1 NFU.

Le Code de la santé publique fixe de nouvelles contraintes concernant les sous-produits susceptibles d'être formés à la suite d'un traitement de désinfection de l'eau. L'arrêté du 11 janvier 2007 <sup>(15)</sup> reprend les limites de qualité introduites par la directive 98/83/CE pour les bromates (10 µg/L au 25 décembre 2008 avec une valeur transitoire de 25 µg/L à respecter au 25 décembre 2003) et pour les trihalométhanes (THM) (100 µg/L pour l'ensemble

(13) Arrêté du 11 janvier 2007 relatif au programme de prélèvements et d'analyses du contrôle sanitaire pour les eaux fournies par un réseau de distribution, pris en application des articles R. 1321-10, R. 1321-15 et R. 1321-16 du code de la santé publique.

(14) La turbidité est souvent exprimée en NTU ou NFU. Le terme de NFU est apparu lorsque la méthode de détermination a changé et que la mesure n'a pas été faite avec de la lumière blanche polychromatique mais avec une lumière monochromatique à 860 nm.

Souvent, il est utilisé encore NTU alors que la mesure est effectuée en lumière monochromatique, il serait bon lorsqu'on utilise le terme NTU (Nephelometric Turbidity Unit) de préciser la longueur d'onde de mesure.

Normalement pour NFU, il n'y a pas de confusion possible : lumière à 860 nm (Nephelometric Formazine Unit).

(15) Arrêté du 11 janvier 2007 relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine mentionnées aux articles R. 1321-2, R. 1321-3, R. 1321-7 et R. 1321-38 du code de la santé publique.

## Question 2

des quatre composés suivants : chloroforme, bromoforme, dibromochlorométhane et bromodichlorométhane ; une valeur transitoire de 150 µg/L a été fixée jusqu'au 25 décembre 2008), sous-produits respectivement formés lors de la désinfection des eaux par l'ozone et le chlore (Guillemot *et al.* 2002). Il est précisé dans cette arrêté que la valeur la plus faible possible inférieure à la limite de qualité doit être visée sans pour autant compromettre la désinfection.

### ii. Eaux conditionnées

Les critères de qualité microbiologique de l'eau minérale naturelle, de l'eau de source et l'eau rendue potable par traitement seront indiqués dans l'annexe d'une arrêté actuellement en préparation relatif à la qualité des eaux conditionnées, aux traitements et mentions d'étiquetage particuliers des eaux minérales naturelles et de source conditionnées ainsi que de l'eau minérale naturelle distribuée en buvette publique. Ces critères sont présentés dans le Tableau 5.

**Tableau 5 : critères microbiologiques auxquels doivent répondre les eaux minérales naturelles et les eaux de sources à l'émergence – Annexe I de l'arrêté en préparation relatif à la qualité des eaux conditionnées, aux traitements et mentions d'étiquetage particuliers des eaux minérales naturelles et de source conditionnées ainsi que de l'eau minérale naturelle distribuée en buvette publique.**

PARAMÈTRE	LIMITE DE QUALITÉ	UNITÉ	NOTE
<i>Escherichia coli</i>	0	Nombre par 250 mL	À l'émergence et au cours de la commercialisation.
<i>Entérocoques</i>	0	Nombre par 250 mL	À l'émergence et au cours de la commercialisation.
<i>Bactéries sulfito-réductrices, y compris les spores</i>	0	Nombre par 50 mL	À l'émergence et au cours de la commercialisation.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	Nombre par 250 mL	À l'émergence et au cours de la commercialisation. Les analyses sont commencées au moins trois jours après le prélèvement au captage, le conditionnement et les échantillons conservés à température ambiante.
<i>Coliformes totaux</i>	0	Nombre par 250 mL	À l'émergence et au cours de la commercialisation.
<i>Numération de germes aérobies revivifiables mesurés à 22°C</i>	-	Nombre par mL	À l'émergence.
	100	Nombre par mL	Au cours de la commercialisation, la teneur totale ne peut résulter que de l'évolution normale de sa teneur à l'émergence, les analyses devant être commencées au moins dans les 12 heures après le conditionnement.
<i>Numération de germes aérobies revivifiables mesurés à 37°C</i>	-	Nombre par mL	À l'émergence.
	20	Nombre par mL	Au cours de la commercialisation, les analyses devant être commencées dans les douze heures suivant le conditionnement.
<i>Microorganismes pathogènes (*)</i> : - <i>cryptosporidium, giardia, legionella species et legionella pneumophila-</i>	Non détectés	Nombre par volume filtré	À l'émergence et au cours de la commercialisation. Le volume filtré doit être celui préconisé dans la méthode normalisée lorsqu'elle existe.

(\*) À rechercher en cas de suspicion de contamination.

(\*\*) Arrêté du 17 septembre 2003 relatif aux méthodes d'analyse des échantillons d'eau et à leurs caractéristiques de performance.

#### A.1.1.4 Des modalités de suivi des installations et de la qualité des eaux

Le Code de la santé publique fixe les modalités du suivi sanitaire de la qualité des eaux qui se compose :

1. de la surveillance qui relève de la responsabilité et de l'organisation du producteur – distributeur d'eau (PRPDE).
2. du contrôle sanitaire que doit organiser l'État. Le programme de contrôle sanitaire doit respecter un cadre fixé par le CSP. Il porte sur la nature et la fréquence des paramètres à rechercher, des adaptations pouvant être faites dans chaque situation réelle en fonction des caractéristiques du système de production et de distribution d'eau.

Le contrôle sanitaire fait appel à des laboratoires agréés par le ministère chargé de la santé. Le contrôle sanitaire conduit à la production de très nombreuses informations, dont les résultats des analyses, qui sont gérées à l'aide d'un outil informatique spécialisé : SISE – EAUX (Système d'Information en Santé Environnement sur les Eaux).

### A.1.2 Au niveau international

#### A.1.2.1 Pays européens

Afin d'avoir un aperçu de la réglementation dans les autres pays de l'Union européenne, les homologues européens chargés de la gestion des risques sanitaires liés aux eaux d'alimentation ont été contactés. L'obtention de réponse de la part de quatre pays permet de constater que ces derniers (République tchèque, République de Lettonie, Suède et Allemagne), en cohérence avec la directive 98/83/CE relatives aux eaux destinées à la consommation humaine, recherchent exclusivement les indicateurs de contamination fécale en routine. La recherche des virus dans les eaux peut se faire en cas d'épidémie ou de suspicion de contamination des eaux et/ou d'épidémie.

#### A.1.2.2 Canada

Dans un document édité en avril 2004, Santé Canada aboutit aux recommandations suivantes pour maîtriser au mieux le risque viral :

« Même si les entérovirus reconnus pour infecter les êtres humains peuvent causer des maladies graves et parfois mortelles, il est impossible pour le moment d'en déterminer les concentrations maximales acceptables (CMA) dans l'eau potable. Il faudrait mettre en œuvre des techniques de traitement et des mesures de protection des bassins hydrographiques ou des puits reconnues pour réduire le risque « d'éclosions »<sup>(16)</sup> d'origine hydrique et les maintenir lorsque la source d'eau est sujette à la contamination par des matières fécales ou a déjà causé des « éclosions » d'origine hydrique attribuables à la présence d'entérovirus. Lorsqu'un traitement est nécessaire, les techniques de traitement devraient réduire ou inactiver la charge virale dans une proportion d'au moins quatre log. »

#### A.1.2.3 États-Unis

L'US-EPA propose en 2000 dans son règlement pour la qualité de l'eau : eaux souterraines (National Primary Drinking Water Regulations : Ground Water Rule ; Proposed Rules) :

1. En routine pour le contrôle des eaux dont le traitement appliqué ne permet pas d'assurer 4 log d'abattement en virus, seule la recherche d'indicateurs de contamination fécale est demandée. En situation dégradée, une démarche spécifique est proposée.
2. Concernant les techniques de traitement de l'eau, cette instance recommande pour les systèmes avec des contaminations fécales récurrentes ou des déficiences non maîtrisées, soit d'éliminer les sources de contamination, soit de corriger les déficiences identifiées, soit de proposer une autre source d'approvisionnement, soit de proposer une filière de traitement permettant un abattement de 4 log en virus (US EPA 2000a). Ce niveau d'abattement est requis pour les filières traitant les eaux de surface (US EPA 2000b).

### A.2 Évolution par rapport à la précédente réglementation (appliquée depuis le 25 décembre 2003)

Le Code de la santé publique impose que le contrôle du respect des critères de qualité de l'eau distribuée soit effectué au robinet de l'utilisateur et non plus seulement en sortie d'unité de production ou sur le réseau public d'adduction.

(16) Survenue de nombreux cas d'une maladie transmissible, endémique ou non, qui sont passés à travers le filet des mesures routinières de contrôle sanitaire, et qui sont très localisés dans quelques foyers d'infection initiaux (= Outbreak).

Décret 1989-3	Point de contrôle : sortie d'unité de production ou réseau public d'adduction. Eaux superficielles : traitement obligatoire (au minimum filtration et désinfection). L'eau ne doit pas contenir d'organismes pathogènes, en particulier (...) d' <b>entérovirus</b> dans un volume ramené à 10 litres d'eau prélevée.
Code de la santé publique	Point de contrôle : robinet de l'utilisateur. Pas de limite ou référence de qualité spécifique au virus. Eaux superficielles : traitement obligatoire (au minimum filtration et désinfection). En cas de qualité altérée des eaux brutes, <b>renforcement des traitements</b> . Eaux souterraines : pas de traitement systématique. Le suivi sanitaire des eaux : surveillance et contrôle avec mise en place de démarche d'évaluation et de gestion préventive des risques.

## **B. État des lieux et perspectives concernant la réglementation relative aux virus dans les aliments**

### **B.1 Réglementation concernant les virus dans les aliments**

#### **B.1.1 Au niveau français**

L'Arrêté du 21 décembre 1979 relatif aux critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire certaines denrées animales ou d'origine animale précise que, pour être reconnues propres à la consommation, les denrées animales ou d'origine animale, énumérées dans ce texte, doivent satisfaire aux critères microbiologiques fixés au présent arrêté et vérifiés selon les dispositions décrites dans cet arrêté. En outre, elles doivent être exemptes de micro-organismes ou toxines dangereuses pour la santé publique. Néanmoins, ce texte réglementaire ne précise pas ce qu'il entend par « micro-organisme » et n'identifie pas explicitement les virus dans son champ d'application.

Cet arrêté a été abrogé au 1<sup>er</sup> janvier 2006, avec la mise en application du paquet hygiène et de ses textes d'application tels que le règlement (CE 2005) n° 2073/2005.

Il n'existe pas à l'heure actuelle de textes réglementaires concernant les denrées alimentaires fixant de critères microbiologiques réglementaires pour les virus.

#### **B.1.2 Au niveau européen**

##### *B.1.2.1 Rappel sur les différents textes européens et leur articulation*

Le règlement de la Commission du 15 novembre 2005 n°2703/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires, qui est entré en application dans tous les États-membres au 1<sup>er</sup> janvier 2006, s'inscrit dans le cadre de la réforme de la réglementation européenne dans le domaine de l'hygiène des denrées alimentaires.

Cette réforme se fonde sur le règlement CE n° 178/2002 du Parlement et du Conseil en date du 28 janvier 2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire instituant l'autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires.

Dans son article, 14, ce Règlement précise que « *Aucune denrée alimentaire n'est mise sur le marché si elle est dangereuse.* » et que « *une denrée alimentaire est dite dangereuse si elle est considérée comme : a) préjudiciable à la santé, b) impropre à la consommation humaine.* »

La législation alimentaire européenne a été profondément remaniée à la suite des récentes crises sanitaires et trouve son origine dans le Livre blanc de la Commission sur la sécurité alimentaire<sup>(17)</sup>. De nouvelles règles (responsabilité des opérateurs, traçabilité) sont entrées en vigueur le 1<sup>er</sup> janvier 2005 et la nouvelle réglementation relative à l'hygiène des aliments est entrée en application le 1<sup>er</sup> janvier 2006.

Le « Paquet hygiène » englobe l'ensemble de la filière agroalimentaire depuis la production primaire, animale et végétale jusqu'au consommateur en passant par l'industrie agroalimentaire, les métiers de bouche, le transport et la distribution. Cette nouvelle réglementation européenne, au sens large, est composée essentiellement de six règlements principaux et de deux directives, l'une qui permet l'abrogation des anciennes directives, l'autre fixant les règles de police sanitaires.

(17) [http://europa.eu.int/comm/dgs/health\\_consumer/library/pub/pubo6\\_fr.pdf](http://europa.eu.int/comm/dgs/health_consumer/library/pub/pubo6_fr.pdf)

L'esprit général des textes applicables aux professionnels consacre la logique de « nouvelle approche » apparue en 1993 : la réglementation fixe les objectifs à atteindre par les professionnels en leur laissant une certaine latitude sur les moyens. La mise en place de procédures basées sur les principes de l'HACCP est généralisée (hormis à la production primaire) et le recours aux guides de bonnes pratiques d'hygiène est fortement encouragé. Ces guides, rédigés par les professionnels et validés par l'administration, ont pour vocation d'aider les professionnels à atteindre les objectifs fixés par la réglementation.

Par ailleurs, pour les autorités compétentes, l'entrée en application du Paquet hygiène implique un travail d'adaptation du droit interne national à la fois au niveau législatif mais également au niveau réglementaire. Cette opération est mise en oeuvre actuellement par les trois administrations compétentes (DGAL, DGCCRF et DGS). En effet, les règlements abrogent 17 directives sectorielles et une directive horizontale (93/43/CEE) sur la base desquelles l'ensemble des textes français a été adopté.

### ***B.1.2.2 Critères microbiologiques définis dans le règlement (CE) n°2073/2005***

#### **i. Généralités / définitions / rôles des critères microbiologiques**

Le règlement (CE) n°2073/2005 rappelle dans son premier considérant que l'obtention d'un niveau élevé de protection de la santé humaine et de la santé animale est l'un des objectifs fondamentaux de la législation alimentaire, comme l'énonce le règlement (CE) n° 178/2002<sup>(18)</sup>. Il souligne que les risques microbiologiques liés aux denrées alimentaires constituent une source majeure de maladies d'origine alimentaire chez l'homme. Il rappelle que la sécurité des denrées alimentaires est principalement assurée par une approche préventive telle que la mise en œuvre de bonnes pratiques d'hygiène et de fabrication et l'application des principes HACCP (analyse des dangers - points critiques pour leur maîtrise). Dès lors, les critères microbiologiques peuvent servir pour la validation et la vérification des procédures fondées sur les principes HACCP et des autres mesures de contrôle de l'hygiène. Il convient donc d'établir des critères microbiologiques définissant l'acceptabilité de ces procédés, ainsi que des critères de sécurité microbiologique fixant une limite au-delà de laquelle on doit considérer qu'une denrée alimentaire est contaminée de manière inacceptable par les micro-organismes pour lesquels les critères sont établis.

Dans son article 2., le règlement définit un critère microbiologique par « *un critère définissant l'acceptabilité d'un produit, d'un lot de denrées alimentaires ou d'un procédé, sur la base de l'absence, de la présence ou du nombre de micro-organismes, et/ou de la quantité de leurs toxines/métabolites, par unité(s) de masse, volume, surface ou lot* ».

Le règlement (CE) n° 2073/2005 précise dans son considérant 2) que « *Les denrées alimentaires ne doivent pas contenir de micro-organismes ni leurs toxines ou métabolites dans des quantités qui présentent un risque inacceptable pour la santé humaine* ».

Dans ce règlement, sont ainsi définis sous le terme micro-organismes « *les bactéries, les virus, les levures, les moisissures, les algues, les protozoaires parasites, les helminthes parasites microscopiques, ainsi que leurs toxines et métabolites* », les virus entrent dans ce cadre.

Le rôle des critères microbiologiques devra être élargi compte tenu de l'introduction des concepts d'objectifs de sécurité sanitaire des denrées alimentaires (OSSA), d'objectifs de performance et de critères de performance (cf. **Question 9**).

#### **ii. Critères microbiologiques concernant le risque viral / discussions sur l'opportunité de fixation de critères microbiologiques à l'échelon européen**

Aucun critère microbiologique réglementaire n'est fixé pour les virus dans quelque matrice alimentaire que ce soit. Ceci notamment faute de méthodes d'analyse suffisamment fiables. Le règlement (CE) n° 2073/2005 précise ainsi en Considérant (27) que « *Il conviendrait en particulier de fixer des critères applicables aux virus pathogènes dans les mollusques bivalves vivants si les méthodes d'analyse sont suffisamment développées* ».

Lors de la réflexion communautaire ayant abouti à la rédaction de ce règlement, la problématique « virus » a ainsi été évoquée sous plusieurs angles sans pour autant avoir fait l'objet de la mise en place de critères microbiologiques. Notamment, la place accordée aux bactériophages comme marqueurs de contamination fécale a été discutée au cours de la rédaction de ce règlement, mais non retenue au final. Ce rejet était motivé

(18) Règlement (CE) n° 178/2002 du Parlement européen et du Conseil du 28 janvier 2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l'Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires.

par les différences de représentativité de cet indicateur de contamination fécale selon les eaux communautaires considérées, ce micro-organisme n'étant pas mis en évidence de manière corrélée aux agents pathogènes d'origine fécale dans les eaux du sud de l'Europe. Dès lors, les autorités sanitaires françaises ont demandé que la maîtrise des risques liés aux germes pathogènes d'origine fécale reste fondée sur l'indicateur *Escherichia coli* dans l'attente des conclusions des différents travaux actuellement financés au niveau communautaire pour améliorer les connaissances et identifier de meilleures solutions de maîtrise sur ce sujet. Notamment, il a été considéré qu'il était prématuré d'adopter le critère bactériophage F-RNA proposé à titre de critère d'évaluation des procédés de purification.

Sur ce point, le règlement (CE) n° 2073/2005 précise, en Considérant (12) que « *Les 30 et 31 janvier 2002, le CSMVSP a délivré un avis sur les virus de type Norwalk (ou norovirus). Dans son avis, le comité est parvenu à la conclusion que les indicateurs fécaux conventionnels n'étaient pas fiables pour démontrer la présence ou l'absence de virus de type Norwalk et que le recours à l'élimination des indicateurs bactériens fécaux pour déterminer les durées de purification des mollusques constituait une pratique dangereuse. Le comité a également recommandé d'utiliser E. coli au lieu des coliformes fécaux pour déterminer la contamination fécale dans les zones de ramassage des mollusques lorsque des indicateurs bactériens sont appliqués* ».

C'est donc l'indicateur *E. coli* qui est préconisé pour les produits décortiqués et décoquillés de crustacés et de mollusques cuits, et permet de tester la qualité des lots testés (Tableau 6).

### iii. Échantillonnage

Le règlement (CE) n° 2073/2005 précise, en Considérant (23) que « *Les exploitants du secteur alimentaire doivent décider eux-mêmes des fréquences des échantillonnages et des essais requis dans le cadre de leurs procédures HACCP et autres procédures de contrôle de l'hygiène. Toutefois, il peut s'avérer nécessaire dans certains cas de fixer des fréquences d'échantillonnage harmonisées au niveau communautaire, notamment pour garantir un même niveau de contrôle sur tout le territoire de la Communauté* ».

Le règlement (CE) n° 2073/2005 précise, en Considérant (24) que « *Les résultats des essais dépendent de la méthode d'analyse utilisée de sorte qu'une méthode de référence donnée devrait être associée à chaque critère microbiologique. Il faudrait toutefois que les exploitants du secteur alimentaire puissent utiliser d'autres méthodes d'analyse que les méthodes de référence, en particulier des méthodes plus rapides, pour autant que ces autres méthodes fournissent des résultats équivalents. Par ailleurs, un plan d'échantillonnage doit être défini pour chaque critère afin de garantir une application harmonisée. Il est néanmoins nécessaire d'autoriser l'utilisation d'autres protocoles d'échantillonnage et d'essai, y compris le recours à d'autres organismes indicateurs, à condition qu'ils fournissent des garanties équivalentes quant à la sécurité des denrées alimentaires* ».

Le règlement (CE) n° 2073/2005 précise, en Considérant (25) que « *L'évolution des résultats des essais doit être analysée car elle peut mettre en lumière des phénomènes indésirables au niveau du procédé de fabrication. L'exploitant du secteur alimentaire pourra alors prendre des mesures correctives avant de perdre la maîtrise du procédé* ».

Le règlement (CE) n° 2073/2005 recommande donc l'utilisation de plans d'échantillonnage pour le contrôle de la sécurité des aliments, et propose l'utilisation de cartes de contrôle<sup>(19)</sup> pour le contrôle de l'hygiène des procédés, la nouvelle réglementation européenne renforçant la responsabilité des exploitants mais également leur liberté dans le choix des moyens à utiliser (cf. paragraphe « Rappel sur les différents textes européens et leur articulation » ci-dessus).

Dans ce cadre, le contrôle microbiologique des denrées alimentaires est susceptible d'évoluer vers deux approches complémentaires :

- l'exploitation des historiques de résultats d'analyses microbiologiques permettra de valider les outils de maîtrise de la sécurité des aliments ;
- l'utilisation de cartes de contrôle permettra de suivre l'application correcte de ces procédures de maîtrise (Augustin 2005).

### Cf. Question 9.

(19) La carte de contrôle est l'un des outils de base utilisés pour la maîtrise statistique des procédés. C'est une représentation graphique constituée d'une suite d'images de la production. Elle permet de visualiser la variabilité du procédé en distinguant les causes aléatoires des causes assignables.

Une carte de contrôle aux mesures comprend deux graphiques : un pour suivre la tendance centrale, l'autre pour suivre la dispersion du procédé. Pour les cartes de contrôle aux attributs, un seul graphique permet de suivre la non-qualité de la production.

## B.2 Quelles perspectives réglementaires ?

Le développement des méthodes d'analyse apparaît essentiel avant de fixer des critères applicables aux virus pathogènes dans les mollusques bivalves vivants. Cette possibilité pourra alors être envisagée.

**Tableau 6 : critères microbiologiques concernant les produits décortiqués et décoquillés de crustacés et de mollusques cuits figurant dans le règlement (CE) n° 2073/2005**

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes	Plan d'échantillonnage <sup>1</sup>		Limites		Méthode d'analyse de référence <sup>2</sup>	Stade d'application du critère	Action en cas de résultats insatisfaisants
		n	c	m	M			
2.4.1 Produits décortiqués et décoquillés de crustacés et de mollusques cuits	<i>E. coli</i>	5	2	1 ufc/g	10 ufc/g	ISO TS 16649-3	Fin du procédé de fabrication	Améliorations de l'hygiène de production
	Staphylocoques à coagulase positive	5	2	100 ufc/g	1 000 ufc/g	EN/ISO 6888-1 or 2	Fin du procédé de fabrication	Améliorations de l'hygiène de production

<sup>1</sup> n = nombre d'unités constituant l'échantillon; c = nombre maximal de résultats pouvant présenter des valeurs comprises entre m et M, pour le nombre d'échantillons n réalisé.

<sup>2</sup> Il convient d'utiliser l'édition la plus récente de la norme.

## Interprétation des résultats des analyses

Les limites indiquées s'appliquent à chaque unité d'échantillon analysée.

Les résultats des analyses révèlent la qualité microbiologique du procédé contrôlé.

*E. coli* dans les produits décortiqués et décoquillés de crustacés et de mollusques cuits :

3. qualité satisfaisante lorsque toutes les valeurs observées sont  $< m$  ;
4. qualité acceptable lorsqu'un maximum de  $c/n$  valeurs se situe entre  $m$  et  $M$ , et que le reste des valeurs observées est  $< m$  ;
5. qualité insuffisante lorsqu'une ou plusieurs valeurs observées sont  $> M$  ou lorsque plus de  $c/n$  valeurs se situent entre  $m$  et  $M$ .

Staphylocoques à coagulase positive dans les produits décortiqués et décoquillés de crustacés et de mollusques cuits :

6. qualité satisfaisante lorsque toutes les valeurs observées sont  $< m$  ;
7. qualité acceptable lorsqu'un maximum de  $c/n$  valeurs se situe entre  $m$  et  $M$ , et que le reste des valeurs observées est  $< m$  ;
8. qualité insuffisante lorsqu'une ou plusieurs valeurs observées sont  $> M$  ou lorsque plus de  $c/n$  valeurs se situent entre  $m$  et  $M$ .

## Références bibliographiques

---

**Augustin, J.C. 2005.** Rôle de l'échantillonnage en matière de représentativité analytique - relation avec l'établissement de critères. Colloque « sécurité et qualité des aliments ». Paris, France.

**CE 2005.** Règlement de la Commission du 15 novembre 2005 n° 2703/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires.

**CSHPPF 2005.** Recommandations sur la méthodologie d'investigation en cas de contamination ou de suspicion de contamination microbienne des eaux destinées à la consommation humaine. Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, séance du 4 octobre 2005. pp. 13.

**Guillemot, M.L., Herault, S., Montiel, A., Robin, A. & Saout, C. 2002.** Impact du décret n° 2001-1220 sur le traitement et le suivi sanitaire des eaux destinées à la consommation humaine (cas des eaux fournies par un réseau de distribution). 15<sup>e</sup> Journées Information Eaux - JIE 2002. Poitiers.

**Santé-Canada 2004.** Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : Documentation à l'appui - Les entérovirus. Bureau de la qualité de l'eau et de la santé, Direction générale de la santé environnementale et de la sécurité des consommateurs, Santé Canada, Ottawa (Ontario). 31 p.

**US EPA 2000a.** Part II, Environmental Protection Agency 40 CFR parts 141 and 142. National Primary Drinking Water Regulations : Ground Water Rule ; Proposed Rule. *Federal Register* 65 (91), 30193-30274.

**US EPA 2000b.** Part II, Environmental Protection Agency, 40 CFR P arts 141 and 142. National Primary Drinking Water Regulations: Long Term 1 Enhanced Surface Water Treatment and Filter Backwash Rule: Proposed. *Federal Register* 65 (69), 19045-19094.

**Commission européenne. 2005.** Règlement de la Commission du 15 novembre 2005 n° 2703/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires.

**Codex Alimentarius. 2005.** Rapport de la 28<sup>ème</sup> session de la Commission du Codex alimentarius (juillet 2005) présentant en Annexe III l'avant projet de principes et de lignes directrices pour la gestion des risques microbiologiques.

[http://europa.eu.int/comm/dgs/health\\_consumer/library/pub/pubo6\\_fr.pdf](http://europa.eu.int/comm/dgs/health_consumer/library/pub/pubo6_fr.pdf)

**Question 3 : Comment interpréter la présence de génome viral dans des matrices alimentaires et en milieu hydrique en termes d'infectiosité potentielle ?**



## Question 3 : Comment interpréter la présence de génome viral dans des matrices alimentaires et en milieu hydrique en termes d'infectiosité potentielle ?

Coordinateur de la question : M. Gantzer

Membres du sous-groupe : M. Dubois, Mme Dubrou, Mme Ferré, Mme Le Guyader, M. Vilaginès

### Résumé de la Question 3

Compte tenu de la faible densité virale susceptible d'être présente dans l'eau ou les aliments, il est impératif d'utiliser, en amont de la détection, des techniques de concentration des virus lorsqu'il s'agit d'eau ou des techniques d'extraction/concentration lorsqu'il s'agit d'aliments comme d'autres matrices solides. La concentration des virus à partir d'un volume d'eau est fondée sur le principe de l'adsorption-élution souvent suivie d'une étape de concentration secondaire (précipitation des protéines, ultrafiltration ou ultracentrifugation). La concentration des virus à partir des matrices alimentaires utilise des techniques d'extraction/concentration. Selon la technique de détection choisie, il sera nécessaire d'y ajouter un traitement de détoxification (culture cellulaire) ou une étape d'élimination des inhibiteurs (PCR pour l'eau usée brute ou l'eau de mer).

Trois techniques de détection sont disponibles. La culture cellulaire est sensible, spécifique et quantitative pour les virus capables de se multiplier en culture de cellules, mais elle ne permet pas la détection des norovirus, sapovirus, virus de l'hépatite E et reste limitée à quelques souches de laboratoire pour les virus de l'hépatite A, rotavirus, astrovirus et adénovirus. L'amplification d'une partie de génome viral par RT-PCR ou PCR permet de détecter toutes les souches virales dont la séquence est connue. C'est une technique sensible, spécifique, rapide et, dans certaines conditions, quantitative. L'association de ces deux techniques – culture cellulaire/RT-PCR ou PCR - est particulièrement sensible. Toutefois, elle ne permet pas la détection des virus non cultivables.

Les techniques d'amplification génique (RT-PCR ou PCR) sont les plus adaptées aux contrôles virologiques des eaux et des aliments. Cependant, la constatation de la présence d'un génome viral ne permet pas de témoigner de son caractère infectieux, critère majeur pour les gestionnaires du risque. Par ailleurs ces techniques très sensibles sont associées à d'importants risques de faux négatifs et de faux positifs exigeant des mesures d'assurance qualité adaptées et rigoureuses. Dans l'état actuel de nos connaissances, il est difficile de relier la présence d'un génome viral à la présence du virus infectieux correspondant. On connaît mal la cinétique de dégradation des génomes, la présence d'un génome viral peut être un indicateur de contamination ancienne, notamment après un traitement désinfectant. Quoi qu'il en soit, si la présence d'un génome viral risque de surestimer le risque infectieux, son absence est à l'inverse, dans les conditions d'assurance qualité adaptées, synonyme d'absence de virus infectieux.

Il est difficile et coûteux d'envisager une recherche systématique de l'ensemble des virus entériques pathogènes pour l'homme dans l'eau et les aliments. Il est donc fait appel à des indicateurs indirects de pollution fécale. Ceux-ci doivent être représentatifs des virus entériques, non pathogènes, sans risque pour l'environnement et peu coûteux. Les coliformes, les coliphages somatiques, les bactériophages F-spécifiques ou les phages de *Bacteroides fragilis* peuvent être des paramètres intéressants pour évaluer l'efficacité d'un traitement. Cependant, il n'existe pour l'instant aucun indicateur idéal pour estimer la contamination virale dans le milieu hydrique et alimentaire, et l'environnement. Il est donc important d'interpréter les résultats avec prudence et de tenir compte d'autres facteurs qui peuvent les influencer, notamment l'origine et la nature de l'eau.

Cette réflexion sur la signification de la présence de génome viral dans l'eau et les aliments en terme d'infectiosité potentielle met en évidence la difficulté d'interprétation d'un résultat positif obtenu avec des méthodes de biologie moléculaire. Il est apparu nécessaire d'élaborer un logigramme d'interprétation de ce résultat positif qui sera un outil pratique et concret pour les gestionnaires du risque. Dans ce logigramme l'intégration de données complémentaires (telles que les critères microbiologiques et physico-chimiques, le contexte environnemental, les données épidémiologiques et éventuellement d'autres critères d'infectiosité) permet de pondérer le résultat positif de la RT-PCR ou PCR. Selon les données disponibles pour chacun de ces éléments, le logigramme présente trois cas possibles d'interprétation : 1) probabilité forte de présence d'un danger ou présence avérée d'un danger ; 2) probabilité faible de présence d'un danger ; 3) résultat non-interprétable.

## A. Décrire et évaluer les techniques disponibles pour la détection des virus dans l'eau et dans les denrées alimentaires

La détection de virus pathogènes pour l'homme dans des échantillons d'eau ou dans des aliments doit nécessairement prendre en compte la faible densité virale susceptible d'y être retrouvée. Ainsi, il est impératif d'utiliser en amont de la détection, des techniques de concentration des virus lorsqu'il s'agit d'eau et des techniques d'extraction/concentration lorsqu'il s'agit d'aliments ou d'autres matrices solides. Par ailleurs l'estimation de la pollution virale dans le concentrat nécessite l'utilisation de techniques suffisamment sensibles pour permettre de détecter un faible nombre d'unités virales. Ce sont donc uniquement ces techniques qui sont décrites et évaluées.

### A.1 Techniques de concentration des virus à partir d'eaux

Les expériences de Melnick en 1947, ont prouvé que l'eau pouvait être le vecteur de l'agent étiologique de la poliomyélite. Suite aux nombreux cas déclarés, le *Poliovirus* a beaucoup été étudié. La composition en acides aminés de la capsid virale (Kitamura *et al.* 1981) et la séquence dans son génome (Balanant *et al.* 1991) sont parfaitement connues.

Ayant perduré comme l'un des « représentants » les mieux définis, il a toujours fait office de référence dans le domaine de la concentration des virus entériques dans le milieu hydrique.

Les techniques de concentration ont fait l'objet d'améliorations constantes depuis plus de trente ans.

Les techniques de concentration des virus à partir d'eaux sont majoritairement fondées sur le principe de l'adsorption-élution. Les virus nus sont essentiellement pourvus de charges électrostatiques et de groupements hydrophobes qui s'expriment de manière variable en fonction du pH, des composants chimiques et organiques de l'eau. Ils sont adsorbés par un support de charge(s) constante(s) *via* des interactions de faible énergie (interactions électrostatiques, hydrophobes...).

Six méthodes différentes peuvent être citées ; elles se différencient essentiellement par la nature et la qualité du support d'adsorption. Les supports de fixation les plus utilisés dans le monde reposent essentiellement sur trois types de conditions.

Fixation des particules virales à :

- pH acide, sur des filtres électronégatifs
  1. Filterite : fibres de verre - résines époxy, Filtres microporeux (Farrah *et al.* 1976, Payment *et al.* 1986, Mehnert & Stewien 1993) encore utilisé aux États-Unis.
  2. Poudre de verre borosilicaté en lit fluidisé (tous les types d'eau : Sarrette *et al.* 1977, Schwartzbrod & Lucena-Gutierrez 1978, Vilaginès *et al.* 1979, Schwartzbrod *et al.* 1985) et Fibre de verre (Block *et al.* 1978).
- pH acide ou voisin de la neutralité sur des supports « électropositifs »
  3. Zeta Plus (cellulose à charge modifiée : Sobsey & Jones 1979).
  4. Virosorb 1MDS (cellulose à charge modifiée : Sobsey & Glass 1980, Bosch *et al.* 1991) toujours en cours aux États-Unis.
  5. Membrane de nylon à charge positive (Gilgen *et al.* 1995, Jothikumar *et al.* 1998).
- pH acide et/ou basique (de pH 3,5 à pH 9) et tous les types d'eau, sur un support polyvalent
  6. Laine de verre sodo-calcique ensimée ; (Vilaginès *et al.* 1988, Hugues *et al.* 1991, Vilaginès *et al.* 1993, Vilaginès *et al.* 1997) toujours en cours en France et dans différents pays du monde (Afrique du Sud, Argentine, Australie...).

Les trois premières citées impliquent une acidification préalable (pH=3,5) et un ajout obligatoire de cations tri ou bivalents ( $Al^{3+}$  ou  $Mg^{2+}$ ) dans l'échantillon d'eau à analyser. L'inconvénient de ces trois techniques (n°1, n°2, n°3) est lié à l'acidification pouvant engendrer une inactivation virale de 10 à 30 %. Au contraire, les trois dernières indiquées ne nécessitent aucun pré-conditionnement de l'échantillon, mais à condition que le pH de l'échantillon d'eau soit obligatoirement inférieur ou égal à 7,5 (Melnick *et al.* 1984) pour les n°4 et n°5, excepté pour le support polyvalent n°6. Les rendements de récupération virale sont relativement voisins pour les méthodes n°1 à n°5 et légèrement supérieurs pour la n°6.

Les virus sont ensuite élués en déstabilisant ces interactions :

- par augmentation du pH (pH basique : majoritairement à pH 9,5 non inactivant) conduisant à une modification des charges des virus ;
- par des phénomènes de compétition avec d'autres protéines (extrait de bœuf...);
- par ajout d'agents chaotropes : exemple le Trichloracétate de sodium « TCA-Na » (Vilaginès *et al.* 1988).

Ces techniques permettent de concentrer les virus à partir de volumes d'eau importants (jusqu'à 1 000 litres) mais nécessitent généralement l'utilisation d'une étape de concentration secondaire fondée soit sur la précipitation des protéines (floculation organique, Polyéthylène glycol 6 000...), soit sur l'ultrafiltration, soit sur l'ultracentrifugation.

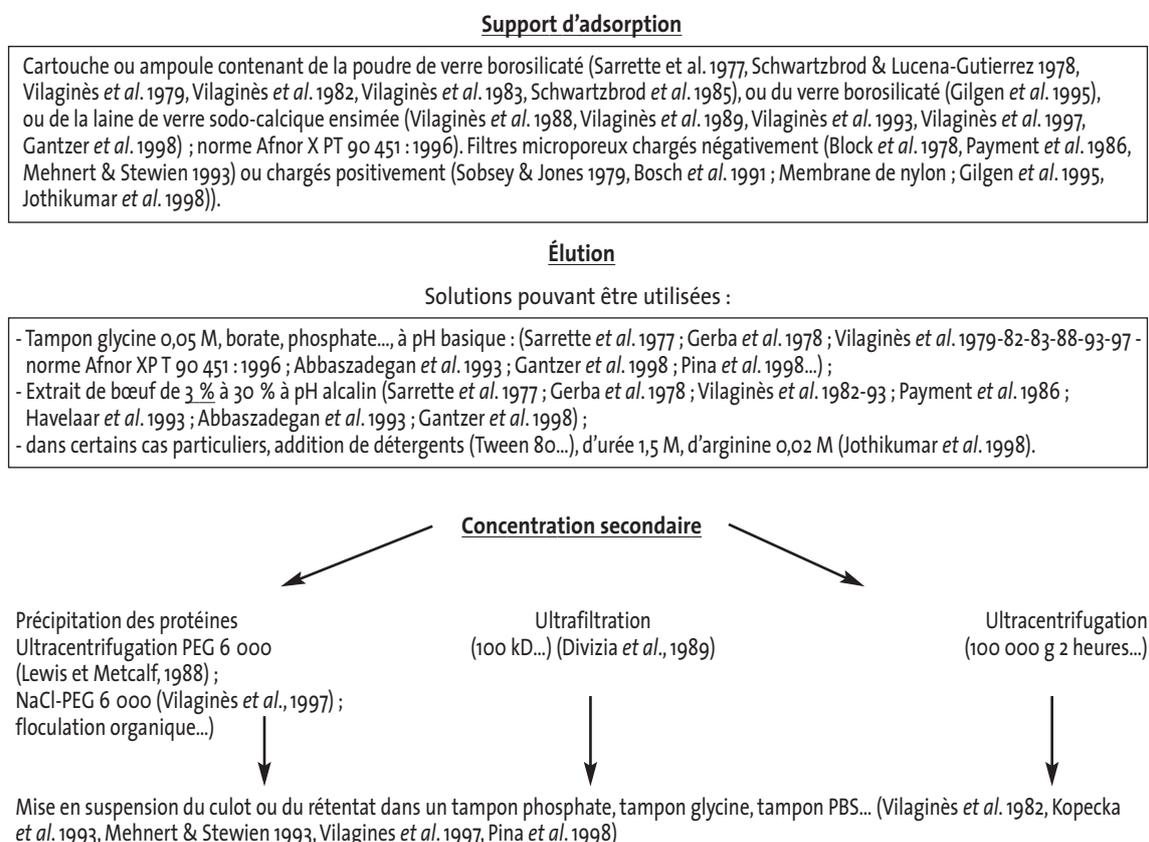
En fonction de la technique de détection choisie, un traitement de détoxification (culture cellulaire) ou une étape d'élimination des inhibiteurs (biologie moléculaire : cf. paragraphe « Risque de faux négatifs ») est nécessaire notamment dans le cas des eaux brutes, voire des eaux de mer.

Selon la Norme AFNOR XP T 90-451, un volume minimal de 100 litres doit être prélevé pour l'analyse d'eaux potabilisées. Les échantillons doivent être acheminés à 4 °C au laboratoire et être concentrés dans un délai inférieur à 24 h après le prélèvement.

La technique de concentration préconisée est une adsorption-élution sur laine de verre sodo-calcique ensimée, suivie d'une élution à pH 9,5 et d'une reconcentration à l'aide d'une solution protéique Glycine-Extrait de bœuf par la technique de floculation organique (Katzenelson *et al.* 1976). Cette norme implique une détection par culture cellulaire.

Les principales techniques de concentration des virus à partir d'eaux sont données dans la Figure 2. Les rendements de concentration définis sur certains virus modèles varient selon le type d'eaux. Dans l'eau d'alimentation, les rendements sont généralement supérieurs à 70 % pour le *Poliovirus* type 1 quel que soit le type de support d'adsorption choisi (Vilaginès *et al.* 1979, Vilaginès *et al.* 1993, Ma *et al.* 1994a). Les propriétés de surface étant différentes pour chaque espèce virale, il est difficile d'extrapoler ces rendements à l'ensemble des virus entériques.

Figure 2 : résumé des principales techniques de concentration des virus à partir d'échantillons d'eaux



**A.2 Techniques d'extraction/concentration des virus à partir de coquillages ou d'aliments**

Les techniques d'extraction/concentration sont nombreuses pour les coquillages (Tableau 7). En résumé, les virus adsorbés sur les tissus de fruits de mer sont d'abord élués selon une approche similaire à celle décrite précédemment pour l'éluition des supports (Tampon à pH alcalin en présence ou non d'extrait de bœuf). Ils sont ensuite concentrés sous un faible volume soit par ultracentrifugation, soit par précipitation (PEG 6 000 ou 8 000). Finalement, les virus peuvent être détectés soit directement par culture cellulaire soit par des techniques moléculaires après l'étape d'extraction d'ARN (Tableau 7).

**Tableau 7 : exemple de méthodes utilisées pour la détection des virus dans les coquillages**

Coquillage	Éluition	Concentration	Référence
1-Huitres a-Tissus digestifs	Tp Glycine pH 9	Ultracentrifugation	(Myrmet <i>et al.</i> 2004)
	chlorof/butanol, cat-floc	Ultracentrifugation, sucrose 30 %	(Nishida <i>et al.</i> 2003)
	Tp Glycine pH 10	Ultracentrifugation	(Formiga-Cruz <i>et al.</i> 2003)
	Tp Glycine pH 9,5	PEG 8000, 16 %	(Kingsley <i>et al.</i> 2002)
	Tp Glycine pH 7,5	Double PEG 6 000, 12 %	(Beuret <i>et al.</i> 2003)
	Tp Glycine pH 9, cat-floc	PEG 6000, 8 %	(Le Guyader <i>et al.</i> , 2000)
	PBS, cat-floc	PEG 6000, 8 %	(Atmar <i>et al.</i> 1995)
b-Coq. entier	Ads. acide, elution, Tp Glycine pH 7,6	Double PEG 8 000, 8 %	(Shieh <i>et al.</i> 2003)
	Ads. acide, elution, Tp Glycine	Double PEG 8 000, 8 %	(Mullendore <i>et al.</i> 2001)
2-Moules	Tp Glycine pH 9	PEG 16 %	(Di Pinto <i>et al.</i> , 2003)
	Ext. Bœuf pH 5,5, sonication	PEG 6 000	(Casas & Sunen 2001)
	Tp Glycine, pH 9,5	Double PEG 8 000	(Crocchi <i>et al.</i> 2000)
	Tp Glycine pH 10	Ultracentrifugation	(Muniain-Mujika <i>et al.</i> 2003)
3-Coques	Ads. acide, Tp Glycine pH 9	Double PEG 8 000	(Sunen <i>et al.</i> 2004)

(Coq : coquillages, Tp : Tampon, Ext. : Extrait, Ads : Adsorption)

Concernant les denrées végétales, bien que les racines endommagées des végétaux permettent la pénétration dans la plante des virus présents dans le sol (Oron *et al.* 1995), ce mode de contamination est peu efficace et n'a été démontré qu'avec des quantités importantes de virus. Cette voie de contamination ne semble donc pas être représentative de situations naturelles, en particulier dans un contexte réglementaire interdisant l'utilisation de boues résiduaires pour la production de fruits ou légumes. En revanche, la contamination de la surface des denrées est plus facilement obtenue lors de manipulations effectuées avec des mains sales (Bidawid *et al.* 2000) ou encore par irrigation avec des eaux souillées (Ward *et al.* 1982). Ces deux modes de contamination expliquent bon nombre des TIAC d'origine virale associées aux denrées végétales.

Par rapport à l'eau ou aux coquillages, très peu de protocoles analytiques sont décrits. Les analyses des fruits ou des légumes se basent essentiellement sur le principe d'une recherche des contaminants adsorbés à leur surface. Trois étapes sont généralement décrites pour la purification et la concentration des virus.

- La première permet de détacher les virus de la matrice en rompant les interactions électrostatiques et hydrophobes. Elle est réalisée en lavant les denrées avec une solution tampon de pH basique, enrichie en ions et/ou en protéines.

- La seconde étape est destinée à concentrer les virus par précipitation ou encore par filtration à pH acide. Le choix de la méthode de concentration dépend d'une part de la nature de la matrice (par exemple, les framboises sont extrêmement fragiles et libèrent de nombreux débris qui colmatent les membranes de filtration ; en revanche les salades, plus fermes, permettent d'utiliser cette technique), d'autre part de la solution de lavage utilisée (les solutions riches en protéines interfèrent avec la rétention des virus par les membranes filtrantes).
- Enfin, les concentrats sont éventuellement traités pour éliminer les substances susceptibles d'interférer avec les analyses subséquentes. Les virus ainsi concentrés et purifiés sont caractérisés soit par leur pouvoir infectieux avec les techniques de mise en culture de cellules, soit par leur génome avec les techniques de biologie moléculaire.

Les principaux protocoles de purification et de concentration des virus à partir de fruits et de légumes sont résumés dans le Tableau 8. Le pourcentage de récupération est très variable en fonction du virus, du protocole et de l'aliment. Il est estimé entre 36 et 74 %, à partir d'essais réalisés avec un *Poliovirus* et un *Adenovirus* adsorbés sur des légumes (Ward *et al.* 1982), entre 2 et 70 %, à partir d'essais réalisés avec un *Poliovirus* et le virus de l'hépatite A adsorbés sur des laitues (Sair *et al.* 2002), et il est estimé à 64 % pour le virus de l'hépatite A, à 18 % avec un *Poliovirus* et à 29 % pour le MS2, adsorbés sur des fruits et légumes (Dubois *et al.* 2006). Avec un protocole validé selon la norme NF V 03-110, pour le dénombrement des bactériophages F-spécifiques à partir de différentes variétés de salades (Projet Aliment-Qualité-Sécurité R01/O4), le pourcentage de récupération sur laitue est compris entre 45 et 86 % pour le phage MS2, supérieur à 19 %, pour le *Poliovirus* et supérieur à 62 % pour le virus de l'hépatite A.

### Question 3

Tableau 8 : exemples de méthodes d'extraction/concentration des virus à partir d'aliments

Matrice	Élution	Clarification	Concentration	Purification ou concentration secondaire	Référence
Légumes (5 à 10 kg)	Lavage en tampon phosphate pH 9,0 (5 à 25 l)	Filtration sur laine de verre saturée avec du sérum	Adsorption sur cartouche électro-négative Élution dans de l'extrait de bœuf 3 %, pH 9,0	Floculation organique pH 3,5, 30 min Centrifugation 3 000 x g, 10 min	(Ward <i>et al.</i> 1982)
Laitue (20 g)	Lavage en tampon glycine pH 8,8 (100 ml)	Floculation avec un agent cationique (Cat-Floc) et filtration	Ultrafiltration	-	(Cliver <i>et al.</i> 1983)
Laitue (5 cœurs)	Homogénéisation dans de l'eau (500 ml)	Centrifugation 2 000 x g, 20 min	Ultracentrifugation 100 000 x g, 1 h	-	(Hernández <i>et al.</i> 1997)
Laitue ou fraise (2 à 3 cm <sup>2</sup> )	Lavage en tampon phosphate pH 7,6 (50 ml)	-	Adsorption sur filtre électropositif Élution dans du tampon NaCl - extrait de bœuf 1 %, pH 9,0	Capture d'antigènes viraux sur billes paramagnétiques, recouvertes d'anticorps monoclonaux	(Bidawid <i>et al.</i> 2000)
Laitue (10 g) ou fraises (100 g)	Lavage en tampon glycine-extrait de bœuf 3 %, pH 9,5 (100 ml)	-	Floculation organique pH 3,5, 30 min Centrifugation 4 000 x g, 15 min	-	(Gulati. <i>et al.</i> 2001)
Laitue (50 g)	Homogénéisé dans un tampon glycine-NaCl pH 9,0 (280 ml)	Filtration sur gaze Centrifugation 3 000 x g, 10 min	Précipitation 6 % PEG-NaCl (une nuit à 4°C) Centrifugation 6 000 x g 20 min Remise en suspension dans 25 ml de Tris-Tween20	Centrifugation 14 000 x g, 15 min Précipitation 12 % PEG-NaCl (4 h à 4°C) Centrifugation 7 500 x g, 15 min Centrifugation 7 500 x g, 15 min	(Leggitt <i>et al.</i> 2000) (Sair <i>et al.</i> 2002)
Fruits ou légumes (100 g)	Lavage en tampon Tris-glycine-extrait de bœuf 3 %, pH 9,5 (300 ml)	Filtration (larges mailles) Centrifugation 10 000 x g, 15 min	Précipitation 10 % PEG-NaCl (une nuit à 4°C) Centrifugation 10 000 x g, 2 h	Extraction au chloroforme-butanol	(Dubois <i>et al.</i> 2002)
Laitue (8 g)	Lavage en tampon glycine pH 8,5 (5 ml)	Centrifugation 13 500 x g, 20 min	Ultrafiltration	-	(Le Guyader <i>et al.</i> 2004)
Framboises (10 g)	Lavage en tampon glycine-NaCl pH 9,5 (4 ml)	Floculation avec un agent cationique (Cat-Floc) Extraction au chloroforme-butanol	Précipitation 8 % PEG-NaCl (1h à 4°C) Centrifugation 10 000 x g, 30 min	-	(Le Guyader <i>et al.</i> 2004)
Salades (25 g)	Lavage en tampon phosphate pH 7,4 (250 ml)	Filtration (larges mailles)	Adsorption sur filtres électro-négatifs Élution dans un tampon glycine-extrait de bœuf 3 %, pH 9,5	Filtration sur membrane (0,22 µm) saturée avec du sérum	(Dubois <i>et al.</i> 2006)

### A.3 Description des techniques de détection des virus adaptées à l'eau et aux aliments

Seules les techniques capables de détecter un faible nombre d'unités infectieuses sont applicables à la problématique virus, eaux et aliments. Ceci n'est possible que si une amplification de la cible est réalisée. Cette amplification peut être réalisée soit sur l'ensemble de la particule virale infectieuse en utilisant des cultures de cellules *in vitro* (culture cellulaire) soit sur seulement un des constituants viraux comme le génome en utilisant des réactions enzymatiques *in vitro* (PCR ou RT-PCR). Sauf cas particulier, la microscopie électronique, les techniques immunologiques et les techniques d'hybridation moléculaire ne sont pas applicables directement aux échantillons de l'environnement pour détecter les virus car leur seuil de détection est trop élevé. Par contre, ces 3 techniques peuvent être utilisées après une amplification sur culture cellulaire, et l'hybridation moléculaire peut être couplée à une amplification du génome. **Enfin il est important de considérer que seule la détection des virus sur culture cellulaire permet de témoigner du pouvoir infectieux du virus isolé (mis à part l'inoculation à l'animal et à l'homme) : c'est une méthode qui fait référence pour les virus pouvant être multipliés en culture de cellule.**

#### A.3.1 Culture cellulaire

Le principe de cette technique de mise en évidence repose sur le fait que certains virus entériques sont capables de se multiplier sur des cultures de cellules *in vitro* et que cette multiplication peut être visualisée :

- soit directement par apparition de lésions caractéristiques au niveau du tapis cellulaire : Effet Cytopathique (ECP). Cet ECP n'est produit que par certains virus entériques (*Poliovirus*, *Coxsackievirus*, *Echovirus*, *Adenovirus*...);
- soit indirectement pour les virus se multipliant sans provoquer d'ECP, en révélant cette multiplication cellulaire par des techniques immunologiques *in situ*, ou par biologie moléculaire (certaines souches de *Rotavirus*, virus de l'hépatite A...);

Cette technique de détection des virus infectieux permet en outre leur quantification (Schwartzbrod & Bosch 1991) ;

- soit en utilisant une méthode de type quantique qui permet d'évaluer le Nombre le Plus Probable d'Unités Cytopathiques (NPPUC) (Hugues, Thèse de Doctorat es Sciences 1981) ;
- soit en utilisant une méthode de type énumératif fondée sur la numération des plages de lyse provoquées par les virus en culture cellulaire sous couverture gélosée. Les résultats sont exprimés alors en Unités Formant Plages (UFP) (Dulbecco et Vogtd, 1954).

De nombreuses lignées cellulaires existent pour la mise en évidence des virus entériques.

Les Tableau 9 et Tableau 10 présentent quelques unes de ces lignées sur lesquelles différents virus rencontrés dans l'environnement sont susceptibles de se multiplier. Il est important de noter que ces cellules ne présentent pas toutes la même sensibilité et il est donc nécessaire de faire un choix parmi tous les systèmes cellulaires proposés en fonction des virus recherchés. Néanmoins, comme il est impossible de préjuger des sérotypes présents dans un échantillon avant l'analyse, il est difficile de déterminer la meilleure lignée cellulaire à utiliser. Par ailleurs il est difficile de comparer des densités virales déterminées avec des lignées cellulaires différentes. Ainsi, dans une étude comparative, Agbalika *et al.* (1984) observent qu'à partir d'une même eau usée, 25 %, 14 % et 2 % des échantillons positifs sont obtenus respectivement avec des cellules MA-104, BGM et Vero. L'analyse détaillée des résultats montre que dans cette étude, les *Poliovirus* sont plus fréquemment retrouvés sur MA-104 (12,3 %) que sur BGM (1,7 %). Les *Reovirus* (3,5 %) et les *Echovirus* (1,7 %) ne sont mis en évidence que sur MA-104. À noter que, dans cette expérience, seules les cellules BGM permettent d'isoler des *Coxsackievirus* du groupe B (5,9 %). Une autre étude montre que les cellules L20B sont plus sensibles au *Poliovirus* (45% d'échantillons positifs) que les cellules BGM (25 %), PLC/PRF/5 (20 %) ou PVK (10 %) (Grabow *et al.* 1999). Comparant les lignées BGM et Hep-2, Muscillo *et al.* (1997) constatent que les cellules BGM sont plus sensibles que les Hep-2 à l'infection par les *Enterovirus* (33 % vs 8 % en eau de mer et 30 % vs 23 % en eau d'estuaire) et des *Reovirus* (80 % vs 53 % en eau de mer et 54 % vs 30 % en eau d'estuaire). Un autre exemple concerne les lignées CaCo-2 et PLC/PRF/5. Pour Marx *et al.* (1998), la souche PLC/PRF/5 est plus adaptée que la lignée CaCo-2 pour la recherche d'*Astrovirus* à partir d'échantillons d'eau de l'environnement. Plus récemment, Taylor *et al.* (2001) rapportent au contraire que la lignée CaCo-2 présente une sensibilité plus importante que la lignée PLC/PRF/5 puisque, pour certains échantillons d'eau de surface, seules les cellules CaCo-2 ont permis l'isolement des *Astrovirus*. Enfin il faut noter que certains *Echovirus* (notamment l'*Echovirus* 11) et *Reovirus* peuvent être détectés de façon aléatoire sur des cellules BGM qui offrent une sensibilité majeure aux *Coxsackievirus* B.

D'une manière générale, la recherche des virus entériques infectieux par culture cellulaire dépend de la sensibilité de la lignée cellulaire utilisée vis-à-vis du ou des sérotypes présents. La probabilité d'isoler un virus à partir d'un prélèvement augmente avec le nombre de systèmes cellulaires inoculés. Aussi, il est recommandé pour les *Enterovirus* par exemple, d'effectuer les isollements sur au moins deux systèmes cellulaires différents. Par ailleurs,

### Question 3

il est nécessaire de réaliser systématiquement une, voire deux subcultures ce qui permet d'une part d'augmenter le pourcentage d'isolement (Schwartzbrod & Bosch 1991) et d'autre part de s'assurer que les ECP ne sont pas dus à la présence de produits toxiques dans l'échantillon de départ. Enfin, la présence virale détectée par la mise en évidence d'un ECP doit obligatoirement être confirmée ultérieurement par une identification précise du virus (Schwartzbrod & Bosch 1991).

**Tableau 9 : sensibilité (+) de différents systèmes cellulaires pour l'isolement (ECP) des virus entériques**

		VIRUS						
		Poliovirus	Coxsackie A	Coxsackie B	Échovirus	Réovirus	Adénovirus (1 à 39)	Adénovirus (40 à 41)
CELLULES	PVK	+	±	+	+	+	-	-
	Véro	+	±	+	+	+	±	-
	BGM	+	±	+	±	+	±	-
	HeLa	+	±	±	±	+	+	-
	KB	+	±	±	±	+	+	-
	Hep 2	+	±	±	±	+	+	-
	RD	+	±	-	+	±	+	-
	MRC 5	+	±	-	+	±	±	-
	L2o B	+				+		
	PLC/PRF/5							+

(d'après Schwartzbrod & Bosch (1991))

Tableau 10 : quelques lignées cellulaires permettant la culture de virus entériques et pour certains, l'isolement dans l'environnement (*Enterovirus*, *Reovirus*) citées dans la littérature

Cellules	Virus isolés	Échantillons	Références
BGM	<i>Reovirus</i>	Eaux de mer	(Muscillo <i>et al.</i> 2001)
FRhK	<i>Hépatite A</i>	Eaux usées, eaux de surface et eaux de mer	(Reynolds <i>et al.</i> 2001)
BGM	<i>Enterovirus</i>		
BGM	<i>Poliovirus</i> <i>Coxsackievirus</i> <i>Echovirus</i>	Eaux usées	(Hoyt & Margolin 2000)
BGM Hep-2	<i>Enterovirus</i>	Eaux de mer	(Muscillo <i>et al.</i> 1997)
MA-104 CaCo-2	<i>Rotavirus</i>	Selles, eaux potables	(Abad <i>et al.</i> 1998)
CaCo-2	<i>Astrovirus</i> , <i>Enterovirus</i>	Eaux de surface	(Chapron <i>et al.</i> 2000)
BGM	<i>Adenovirus 40 et 41</i> , <i>Enterovirus</i>		
Vero Hela	<i>Enterovirus</i> , <i>Echovirus</i>	Boues	(Caillou <i>et al.</i> 1998)
PLC/PRF/5	<i>Adenovirus 40 et 41</i> , <i>HAV</i>	Eaux usées, eaux de mer, eaux du robinet	(Enriquez <i>et al.</i> 1995)
BGM	<i>Enterovirus</i>		
L2oB RD Hep-2	<i>Poliovirus</i>	Échantillons cliniques	(Wood & Hull 1999)
PLC/PRF/5 BGM L2oB PVK	<i>Reovirus</i> <i>Poliovirus</i> , <i>Enterovirus</i>	Eaux usées	(Grabow <i>et al.</i> 1999)
BGM	<i>Enterovirus</i>	Eaux de surface	(Vilaginès <i>et al.</i> 1979, Vilaginès <i>et al.</i> 1982, Vilaginès <i>et al.</i> 1989, Vilaginès <i>et al.</i> 1993)
BGM	<i>Enterovirus</i>	Eaux usées	(Vilaginès <i>et al.</i> 1997)

Cependant, si certains virus entériques se multiplient sur cultures cellulaires en provoquant un ECP, d'autres se multiplient sans provoquer d'ECP. C'est le cas notamment de certaines souches de *Rotavirus* et de virus de l'hépatite A. La détection de ces virus nécessite donc des étapes supplémentaires faisant appel à l'immunologie (immunofluorescence indirecte sur les cellules infectées) ou à la biologie moléculaire (PCR sur le surnageant de culture cellulaire). Il faut aussi considérer que certains *Enterovirus* qui normalement provoquent un ECP en cultures cellulaires perdent cette capacité après passage dans le milieu hydrique et se multiplient en cultures cellulaires sans provoquer d'ECP (Grabow *et al.* 1993, Shieh *et al.* 1997). La mise en évidence de ces virus nécessite d'utiliser les techniques immunologiques et moléculaires décrites pour la détection des virus ne provoquant pas d'ECP.

L'analyse virologique par culture cellulaire implique aussi l'élimination des bactéries et des fungi (champignons) qui interfèrent avec la croissance cellulaire. Dans ce cadre le chloroforme, les antibiotiques/antifongiques et la filtration sur 0,22 µm peuvent être utilisés en fonction du type d'échantillon à analyser. Dans le même sens, la présence de produits toxiques pour les cellules peut entraîner une lyse cellulaire. Il est par exemple important de valider les lots d'extrait de bœuf utilisé lors de l'étape de concentration des eaux, certains étant toxiques pour les cellules. Ainsi une étape de détoxification peut s'avérer nécessaire. La différenciation des ECP des effets toxiques ou des contaminations nécessite un personnel qualifié. Toutes ces étapes allongent encore la durée de l'analyse qui nécessite déjà une incubation d'au moins 4-6 jours pour observer l'ECP dans le meilleur des cas (plusieurs semaines en cas de passage multiple).

## Question 3

Enfin il est important de signaler que les *Norovirus*, les *Sapovirus*, le virus de l'hépatite E, et certaines souches de *Rotavirus*, de virus de l'hépatite A et d'*Astrovirus* ne sont pas cultivables sur les lignées actuellement disponibles. Ils ne sont donc pas détectables et *a fortiori* quantifiables par culture cellulaire.

**En conclusion, la culture cellulaire constitue la technique de référence car c'est la seule technique qui permet de témoigner du caractère infectieux des virus isolés. Elle est sensible, spécifique et quantitative, pour les *Enterovirus* et *Reovirus* mais ne permet pas la détection de *Norovirus*, de *Sapovirus*, de virus de l'hépatite E ; et reste limitée à certaines souches (de laboratoire) pour le virus de l'hépatite A, les *Rotavirus*, les *Astrovirus* et les *Adénovirus*. A l'heure actuelle il n'existe aucun consensus sur les lignées cellulaires à utiliser et il existe un manque au niveau de la standardisation de cette méthode. C'est en outre une méthode longue qui nécessite un personnel qualifié et des laboratoires spécialisés.**

### A.3.2 RT-PCR ou PCR

Une autre technique pour mettre en évidence du matériel viral dans le milieu hydrique consiste à détecter le génome viral (ADN ou ARN) après amplification. Cette technique, depuis son application aux échantillons de l'environnement, a permis une avancée considérable pour comprendre le rôle de l'environnement dans la transmission des principaux virus entériques d'intérêt sanitaire (Metcalf *et al.* 1995). Avant tout, il est nécessaire de procéder à l'extraction de l'ARN ou de l'ADN viral en dénaturant les capsides virales. Ces étapes ne seront pas décrites dans le cadre de ce rapport où nous nous focalisons sur l'étape de détection.

Après extraction, s'il s'agit d'ARN, il est nécessaire de le transcrire en ADN complémentaire (ADNc) par Rétro-Transcription (RT). L'ADNc ou l'ADN génomique peut ensuite être amplifié par « Polymerase Chain Reaction » (PCR). Dans ce cadre, il est possible de distinguer les techniques qualitatives des techniques quantitatives.

- Pour les protocoles qualitatifs les produits amplifiés sont détectés :
  - par observation sous UV après électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide en présence de bromure d'éthidium. Les fragments sont séparés en fonction de leur poids moléculaire. La révélation des fragments amplifiés après une simple électrophorèse reste la technique la moins sensible ;
  - par hybridation moléculaire. Différents cas de figures peuvent alors être envisagés. Il est d'abord courant de fixer l'ADN amplifié sur des membranes de nylon ou de nitrocellulose (dot-blot ou slot blot) et de révéler leur présence par des sondes marquées. Il est ensuite envisageable de déposer les produits amplifiés dans des puits de micro-plaque dont le fond est recouvert de sondes complémentaires du fragment à détecter (DNA Enzyme Immuno Assay ou DEIA). Il est finalement devenu possible, lorsque les fragments amplifiés sont eux même marqués, de réaliser l'hybridation sur des puces à ADN pouvant contenir jusqu'à 100 000 sondes différentes. Le Reverse Line Blotting est couramment utilisé au niveau européen pour typer les *Norovirus* ;
  - par couplage d'une électrophorèse et d'une hybridation moléculaire (Southern blot). Les fragments amplifiés sont séparés en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse, puis transférés sur une membrane de nylon ou de nitrocellulose pour finalement être révélés par des sondes spécifiques marquées ;
  - La PCR en temps réel est une technique où l'étape de révélation du produit amplifié se fait directement au cours de l'amplification. Par conséquent, il n'est plus nécessaire de révéler les produits amplifiés par une étape post PCR (hybridation ou électrophorèse). Le principe de cette technique est fondé sur la mesure de la fluorescence émise au cours de la PCR qui est proportionnelle au nombre de copies d'ADN néosynthétisés. Cette fluorescence peut être le résultat d'interactions non spécifiques obtenues par addition d'un intercalant de l'ADN (Bromure d'éthidium, Syber green...). Ainsi, plus le nombre de molécules d'ADN amplifiées augmente, plus il y aura d'agents intercalants qui se fixeront et par voie de conséquence plus la fluorescence sera élevée. La fluorescence peut aussi être générée par l'utilisation de sondes spécifiques complémentaires de l'ADN cible. Il s'agit de sondes marquées chimiquement par un fluorochrome (Sonde Taq Man, Sonde d'hybridation, Sonde d'hybridation molecular Beacon, Sonde d'hybridation Scorpion...).
- Une quantification peut être réalisée par PCR en temps réel à l'aide d'une gamme étalon. La linéarité entre le cycle seuil et la quantité d'acides nucléiques au départ est finalement mise à profit pour déduire la quantité de génome viral dans l'échantillon.

Le choix de la séquence cible et des amorces de rétro-transcription et de PCR est une étape importante en terme de spécificité et de sensibilité aussi bien pour les protocoles qualitatifs que quantitatifs. Ainsi, ce choix est différent selon que l'on cherche à identifier une souche donnée (typage) ou à diagnostiquer la présence d'une contamination virale globale. Dans le premier cas il est développé des amorces et/ou des sondes s'hybridant sur des séquences spécifiques propres à la souche recherchée. Dans le second cas, la détection est fondée sur

la recherche de séquences conservées présentes chez toutes les souches à identifier. Par exemple dans le cas du virus de l'hépatite A, Robertson *et al.* (1992) à partir de 152 souches, utilisent une séquence située à l'union des régions du gène VP1 (protéine de la capsid) et P2A (codant une protéase) pour établir une classification génotypique où sont individualisés 7 génotypes distincts. L'utilisation de cette séquence permet de discriminer le génotype retrouvé. À l'inverse pour le diagnostic de l'ensemble des souches, il est préféré des séquences plus conservées telles que celles retrouvées dans les régions 5'ou 3' non codantes ou encore des régions à l'intersection des gènes VP1 et VP3 codant des protéines capsidales (Arnal *et al.* 1998).

Il en est de même pour les *Enterovirus* : le typage par RT-PCR des différentes souches existantes, implique l'utilisation de la région variable VP1 (Oberste *et al.* 1999), alors que le diagnostic d'une contamination par un *Enterovirus* se fait à l'aide de la séquence 5'NC qui est très conservée (Rotbart 1990, Zoll *et al.* 1992, Puig *et al.* 1994, Gilgen *et al.* 1997, Casas & Sunen 2001).

Pour les *Norovirus* la détection de l'ensemble des souches appartenant à ce genre viral se complique du fait de l'importante variabilité génétique retrouvée au sein des séquences nucléotidiques. À ce jour les séquences conservées identifiées sont peu nombreuses et surtout relativement courtes. Cela fait qu'il n'existe pas de jeux d'amorces et/ou de sondes consensus comme chez les *Enterovirus* permettant la détection de l'ensemble du genre viral. Actuellement deux régions sont préférentiellement utilisées pour leur détection : la région codant pour l'ARN polymérase (bonne sensibilité et large spécificité des amorces) et la région située en 3' de l'ORF2 codant pour la protéine de capsid (typage possible mais sensibilité moindre). Néanmoins ces régions présentent une certaine variabilité nécessitant l'utilisation de plusieurs couples d'amorces pour permettre la détection du plus grand nombre possible de souches virales (Vinje *et al.*, 2003).

Même s'il n'y a aucun protocole normalisé, il existe à l'heure actuelle des **techniques de RT-PCR qualitatives** pour isoler tous les virus entériques dans des matrices hydriques ou des matrices alimentaires. Ainsi, les différents virus ont été détectés dans des échantillons d'eau divers et variés (Tableau 11).

**Tableau 11 : détection de virus dans des échantillons d'eau divers et variés**

Virus	Référence bibliographique
<i>Enterovirus</i>	(Gilgen <i>et al.</i> 1995, Vilagines <i>et al.</i> 1997, Gantzer <i>et al.</i> 1998, Schvoerer <i>et al.</i> 2000, Reynolds <i>et al.</i> 2001, Schvoerer <i>et al.</i> 2001, Vivier <i>et al.</i> 2001, Katayama <i>et al.</i> 2002, Lee & Kim 2002)
<i>Réovirus</i>	(Muscillo <i>et al.</i> 2001, Spinner & Di Giovanni 2001, Leary <i>et al.</i> 2002)
<i>Norovirus</i>	(Le Guyader <i>et al.</i> 1996, Schwab <i>et al.</i> 1996, Gilgen <i>et al.</i> 1997, Häfliger <i>et al.</i> 2000, Brown <i>et al.</i> 2001, Greening <i>et al.</i> 2001)
<i>Sapovirus</i>	(Lappalainen <i>et al.</i> 2001)
<i>virus de l'hépatite A</i>	(Divizia <i>et al.</i> 1998, Jothikumar <i>et al.</i> 1998, Abbaszadegan <i>et al.</i> 1999, Jothikumar <i>et al.</i> 2000, Pina <i>et al.</i> 2001, Morace <i>et al.</i> 2002)
<i>Adénovirus</i>	(Genthe <i>et al.</i> 1995, Chapron <i>et al.</i> 2000, Cho <i>et al.</i> 2000, Jiang <i>et al.</i> 2001, Lee & Kim 2002, Loge <i>et al.</i> 2002)
<i>Rotavirus</i>	(Abbaszadegan <i>et al.</i> 1999, Gratacap-Cavallier <i>et al.</i> 2000, Kittigul <i>et al.</i> 2000, Soule <i>et al.</i> 2000, Gofti-Laroche <i>et al.</i> 2001)
<i>Astrovirus</i>	(Pinto <i>et al.</i> 1996, Chapron <i>et al.</i> 2000, Gofti-Laroche <i>et al.</i> 2001)
<i>Virus de l'hépatite E</i>	(Corwin <i>et al.</i> 1996, Jothikumar <i>et al.</i> 2000, Grimm & Shay 2002)

## Question 3

Plusieurs auteurs ont développé des **protocoles RT-PCR quantitatifs** ciblant les virus entériques. Citons notamment les travaux de Monpoeho *et al.* (2000) qui, à l'aide d'un protocole adapté à la quantification des *Enterovirus*, recherchent leur présence dans des échantillons de boues de station d'épuration et trouvent des quantités très variables : de 400 à  $3,85 \cdot 10^5$  copies/10g. D'autres auteurs tels que Donaldson *et al.* (2002) en utilisant également ces techniques estiment la quantité d'*Enterovirus* de plusieurs échantillons d'eau de surface à hauteur de 9,3 particules/mL.

Concernant les *Norovirus*, l'utilisation de la MPN-RT-PCR a permis d'estimer la présence d'environ 200 unités RT-PCR par huître impliquée dans une épidémie (Le Guyader *et al.* 2003). En utilisant la technologie Taq-Man, des concentrations variant de  $1,4 \cdot 10^2$  à  $2,9 \cdot 10^3$  copies de génome par huître ont été détectées dans des huîtres au Japon (Nishida *et al.* 2003). Il est important de souligner que la quantité de génome n'est pas comparable d'un laboratoire à l'autre du fait de l'absence d'étalons internationaux. La RT-PCR en temps réel a également été utilisée pour détecter les *Norovirus* dans l'eau de distribution avec une bonne sensibilité mais sans quantification précise (Haramoto *et al.* 2004) ou en eau de baignade (Katayama *et al.* 2002).

**En conclusion, les techniques moléculaires de RT-PCR et de PCR permettent la détection de toutes les souches virales dont la séquence nucléotidique est connue. C'est une technique rapide, spécifique et potentiellement quantitative. Mais la détection de génome ne permet pas de témoigner du caractère infectieux du virus isolé. Les protocoles ne sont pas standardisés et des développements sont encore nécessaires pour détecter l'ensemble des virus entériques par PCR en temps réel (choix des séquences consensus, validation des protocoles...).**

### A.3.3 Association culture cellulaire/RT-PCR ou PCR

La combinaison de la culture cellulaire avec la PCR (ou RT-PCR) a été proposée sous le nom de ICC-PCR (Integrated cell culture-PCR). Cette technique a été utilisée pour la recherche d'*Enterovirus*, d'*Adenovirus*, d'*Astrovirus* et de virus de l'hépatite A, à partir d'échantillons de l'environnement dont l'eau de surface et l'eau potable (Chapron *et al.* 2000, Grabow *et al.* 2001, Reynolds *et al.* 2001, Lee & Kim 2002, Vivier *et al.* 2002). Tous les résultats mettent en exergue une augmentation de la sensibilité de détection des virus pathogènes par rapport à la seule technique de culture cellulaire. En fait, l'ICC-PCR est une technique particulièrement intéressante pour des virus entériques dont la répllication au sein de lignées cellulaires ne provoque pas d'ECP (Sobsey *et al.* 1998, Grabow *et al.* 2001, Vivier *et al.* 2002).

Par exemple, Grabow *et al.* (2001) montrent que 23 % des 413 échantillons d'eau ayant subi un traitement de potabilisation et 73 % des 224 échantillons d'eau brute (avant traitement de potabilisation) se sont avérés positifs avec la technique d'ICC-PCR alors que des ECP n'ont été observés que dans 6 % des cas concernant les eaux brutes et jamais lorsqu'il s'agissait des eaux traitées. Yates *et al.* (1999) travaillant sur des eaux souterraines observent que 5 échantillons sur 310 présentent un ECP sur cellules BGM (1,6 %) alors que 11/310 sont positifs en PCR *Enterovirus* (3,4 %) à partir du surnageant de ces mêmes cultures cellulaires. De la même manière, Vivier *et al.* (2002) analysant des échantillons d'eau provenant de deux usines de potabilisation ont obtenu des résultats positifs en RT-PCR *Enterovirus* (majoritairement des *Coxsackievirus* B) à partir de 23 des 172 cultures cellulaires qui n'avaient pas présenté d'ECP. Enfin, Grabow *et al.* (1999) qui ont analysé des échantillons de l'environnement (rivière, eaux usées) ont obtenu des résultats positifs en RT-PCR *Enterovirus* à partir de 263 cultures cellulaires qui n'avaient pas présenté d'ECP.

Par ailleurs, cette technique permet un gain de temps important (Reynolds *et al.* 1996, Reynolds *et al.* 2001). En effet, grâce à une grande sensibilité de la technique de biologie moléculaire, l'ICC-PCR permet de confirmer la présence d'*Enterovirus* en 24 heures contre 5 jours ou plus par culture cellulaire simple. De plus, par rapport à une PCR classique, l'ICC-PCR permet d'augmenter le volume analysé et de diluer les inhibiteurs de RT-PCR éventuellement présents. Enfin, l'énorme avantage de l'ICC-PCR par rapport à la PCR est lié à l'interprétation. Il devient en effet possible d'affirmer le caractère infectieux des virus isolés par ICC-PCR.

**En conclusion, le couplage de techniques de biologie moléculaire avec la culture cellulaire est un outil d'analyse très intéressant pour la mise en évidence des virus entériques cultivables. Sensible et rapide, il est particulièrement adapté à la recherche des virus à partir d'échantillons d'eau et d'aliments. Toutefois, malgré ces avantages, cette technique exclut la recherche des virus non cultivables (facteur limitant de la technique de culture cellulaire) tels que les *Rotavirus*, les *Norovirus*, les *Sapovirus*, les virus des hépatites A et E...**

#### A.4 Évaluation des techniques

Les seules techniques adaptées à l'estimation de la pollution virale d'un échantillon environnemental sont basées soit sur la détection des virus infectieux sur culture cellulaire soit sur la détection du génome viral par RT-PCR ou PCR. Chacune de ces techniques doit ensuite être évaluée en fonction de sa capacité à être appliquée en terme de contrôle virologique des eaux et des aliments. Idéalement la technique devrait être sensible, quantitative, rapide, applicable en routine mais aussi permettre la détection de tous les sérotypes viraux en témoignant de leur caractère infectieux. En fait, elle doit être capable de détecter tous les virus posant un problème de santé publique.

La sensibilité de la culture cellulaire est en théorie d'une unité infectieuse alors que celle de la PCR est en théorie d'une copie de la partie du génome sélectionnée. En comparant la sensibilité des deux techniques, bien que la cible soit totalement différente, il est couramment rapporté une sensibilité supérieure de 10 à 1000 fois en faveur de la (RT-)PCR. Cette différence ne peut alors s'expliquer que par la présence d'agrégats dans la suspension ou la présence de particules virales non infectieuses mais possédant toujours la partie du génome amplifié, voire sous certaines conditions particulières à la présence de génome libre. En fait un virus infectieux détecté par culture cellulaire possède obligatoirement un génome complet détectable par (RT-)PCR. La réciproque n'est pas vraie puisque la détection par (RT-) PCR de quelques centaines de bases n'est pas forcément détectable par culture cellulaire si le génome est incomplet ou si la capsid autour du génome est lésée d'une manière ou d'une autre.

Ainsi, il est possible de considérer que dans les conditions idéales d'amplification et à volume analysé identique, la PCR est au moins aussi sensible que la culture cellulaire pour la détection des virus infectieux, mais il faut impérativement garder en mémoire que cette technique permet aussi la détection de particules virales plus ou moins dégradées. Cependant l'ARN viral non encapsidé est une molécule fragile, facilement dégradée en milieu extérieur (Tsai *et al.* 1995, Atmar & Estes 2001, Bosch *et al.* 2003).

La quantification est possible aussi bien par culture cellulaire que par (RT-)PCR. La rapidité de mise en œuvre est clairement en faveur des techniques moléculaires. La détection des génomes viraux peut s'effectuer en quelques heures alors que dans le meilleur des cas 3 à 6 jours sont nécessaires pour une détection sur culture cellulaire (plusieurs semaines en cas de passages multiples). Le délai peut se réduire à 48 heures en cas d'utilisation de l'ICC-PCR.

L'application en routine est possible pour les techniques moléculaires mais extrêmement difficile pour la culture cellulaire. L'analyse virologique la plus complète possible sous-entendrait l'utilisation d'au moins 6 lignées cellulaires différentes couplées à des techniques immunologiques ou moléculaires.

La détection de toutes les souches virales est envisageable par les techniques moléculaires, alors que la majorité des souches de *Rotavirus*, les *Norovirus* et les *Sapovirus* par exemple n'est pas détectable sur un système cellulaire. En conséquence, il est possible de déduire le sérotype viral à partir des résultats obtenus avec les techniques de biologie moléculaire même pour les souches non cultivables.

Enfin, seule la culture cellulaire permet de témoigner du caractère infectieux des virus isolés.

**En conclusion**, il apparaît clair que la culture cellulaire, longue, lourde à mettre en œuvre et incapable d'isoler les virus non cultivables (*Norovirus*, *Rotavirus*, *VHA*...), ne peut être suffisante pour une analyse virologique de routine ou en cas d'alerte (sauf dans le cas d'une alerte concernant les *Enterovirus*) en première intention. Elle devrait néanmoins constituer la technique de référence pour évaluer une autre approche, applicable en routine, par exemple moléculaire. Les techniques de PCR ou RT-PCR semblent présenter tous les critères de la méthode idéale sauf en ce qui concerne l'information sur l'infectiosité du virus isolé, ce qui est problématique bien sûr pour les gestionnaires du risque. Par ailleurs, les protocoles quantitatifs ne sont pas encore disponibles pour tous les virus (*Norovirus*...) et il n'existe pas encore de techniques standardisées. Le développement des protocoles quantitatifs pour tous les virus (*Norovirus*...) et la standardisation des méthodes sera un argument majeur en faveur de l'utilisation des techniques moléculaires dans les années à venir.

## B. Techniques moléculaires appliquées à la détection des virus dans l'eau et les aliments : signification et assurance qualité

Les techniques d'amplification génique sont les seules envisageables pour donner une information en ce qui concerne le contrôle virologique d'une eau ou d'un aliment. Un certain nombre d'exemples concernant la détection de virus par RT-PCR dans des aliments impliqués dans des épidémies a démontré le potentiel indéniable de ces méthodes. Mais il n'en demeure pas moins que ces techniques sont associées à d'importants risques de faux négatifs et de faux positifs qui demandent des mesures d'assurance qualité particulière. Par ailleurs en cas d'obtention d'un résultat positif se pose toujours la question de la signification de ce signal en terme de risque infectieux.

### B.1 Assurance qualité

#### B.1.1 Risque de faux négatifs

Les matrices environnementales (eaux, aliments...) sont susceptibles de renfermer un grand nombre de substances capables d'interférer soit au niveau de l'étape d'amplification (PCR) soit au niveau de l'étape de rétrotranscription (RT).

Ces molécules inhibitrices sont de natures très diverses : polysaccharides (glycogène...), matières organiques (acides fulviques, acides humiques, acides tanniques...), ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ...), protéines, métaux lourds, SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), urée, Triton X100, hemine, bilirubine, sodium glycolate et sodium taurocholate, etc. (Abbaszadegan *et al.* 1993, Straub *et al.* 1995, Kreader 1996, Cromeans *et al.* 1997, Wilson 1997). Afin de limiter leur action, il a été proposé soit d'agir directement en éliminant ces composés, soit indirectement en masquant leur effet.

Dans le premier cas (élimination directe des inhibiteurs), toute une panoplie de procédés a été développée. Il est tout à fait possible de les combiner afin d'affiner le traitement (Ijzerman *et al.* 1997). Cependant, il est clair que si l'ajout de plusieurs étapes permet d'augmenter le degré de pureté de l'échantillon, ce processus s'accompagne irrémédiablement d'une perte de matériel génétique et se traduit aussi par une augmentation de la variabilité de l'ensemble de la chaîne analytique.

Parmi les techniques fréquemment utilisées pour améliorer les conditions de PCR, certaines sont très spécifiques. Ainsi, l'immunocapture des virus est une technique de purification basée sur la sélection spécifique de certains virus. Elle consiste à mettre l'échantillon en contact avec un support solide sur lequel des anticorps spécifiques du virus recherché sont fixés. Après capture des virus par les anticorps, des lavages successifs permettent d'éliminer les éventuels inhibiteurs. Cette technique, qui a été proposée pour isoler le virus de l'hépatite A (Graft *et al.* 1993, Prevot *et al.* 1993, Deng *et al.* 1994, Monceyron & Grinde 1994, Shan *et al.* 1997, Jothikumar *et al.* 1998, Bidawid *et al.* 2000) présente l'avantage de retenir les capsides virales et donc de permettre la mise en évidence uniquement de génomes encapsidés et pas de génomes de capsides fortement dégradées. Cependant, elle est plus délicate à mettre en œuvre pour les *Enterovirus* ou les *Norovirus* par exemple dont les sérotypes sont nombreux et pour lesquels il n'existe pas d'antigène commun.

Des techniques de purification non spécifiques existent également. Ainsi la filtration sur membrane électropositive a été proposée (Queiroz *et al.* 2001). Des traitements chimiques à base de cetyltriméthylammonium bromide (CTAB) ou de ProCipitate™ ont aussi permis d'éliminer du glycogène et des polysaccharides contenus dans des concentrats d'huîtres (Jaykus *et al.* 1996). L'élimination sélective des inhibiteurs de type protéique peut être obtenue soit par une ou deux extractions organiques (phénol : chloroforme : alcool isoamylique / 25:24:1) suivies d'une précipitation à l'éthanol ou à l'isopropanol (Atmar *et al.* 1995, Le Guyader *et al.* 1996) soit par une précipitation à l'acide trichloracétique 5 % à chaud (Feng & Xu 1993) ou au PEG4000 (Jaykus *et al.* 1996). Enfin les sels, les protéines résiduelles de faible poids moléculaire ou les acides humiques peuvent être éliminés en partie par chromatographie d'exclusion sur Séphadex G-50, G-100 ou G-200 (De Leon *et al.* 1992, Lewis *et al.* 2000) ou sur résine échangeuse d'ions telle que le Chelex-100 (Straub *et al.* 1994, Hale *et al.* 1996) ou une combinaison des deux : Sephadex G-100 et Chelex-100 (Abbaszadegan *et al.* 1993) ou Sephadex G-50 et Chelex-100 (Straub *et al.* 1995).

Parallèlement aux traitements directs des échantillons, la purification des acides nucléiques viraux après extraction est également décrite dans la littérature. Dans ce cas, les inhibiteurs sont généralement éliminés de manière non sélective en utilisant par exemple une colonne de Sephadex G-50 saturée avec du Tris-EDTA (pH=8) qui permet de purifier un extrait d'ADN (Tsai & Olson 1992). Une autre technique d'élimination non sélective des inhibiteurs consiste à fixer les ARN totaux ou les ARNm sur un support. Cette fixation peut s'effectuer par hybridation moléculaire. Les ARN viraux comme les ARNm possèdent à leur extrémité 3' non codante une

séquence polyadénylée (« queue de poly A »). Il est donc possible d'immobiliser les acides nucléiques par hybridation sur des billes magnétiques sur lesquelles sont fixés des oligonucléotides formés de 15 à 25 résidus thymidine. Les billes sont ensuite fixées sur un support magnétique pour permettre d'éliminer les inhibiteurs par des lavages successifs (Lindberg & Andersson 1999, Kingsley & Richards 2001, Goswami *et al.* 2002). Cette purification peut être appliquée aux virus dont le génome possède une « queue de poly A » (*Enterovirus*, *Norovirus*, virus de l'hépatite A...). Le même type de protocole peut être réalisé en substituant les oligonucléotides formés de 15 à 25 résidus thymidine par une sonde spécifique d'un type de virus donné, par exemple les *Enterovirus* (Beaulieux *et al.* 1996, Regan & Margolin 1997) ou les *Norovirus* (Loisy *et al.* 2000). La fixation des ARN peut aussi s'effectuer par adsorption non spécifique sur des supports tels que la silice (Boom *et al.* 1990, Shieh *et al.* 1995, Ijzerman *et al.* 1997, Legeay *et al.* 2000) ou la poudre de verre (Häfliger *et al.* 1997, Green *et al.* 1998) en présence d'agent chaotrope tel que le thiocyanate de guanidium. De la même manière que précédemment, les acides nucléiques adsorbés sont purifiés d'éventuels inhibiteurs par différents lavages. Enfin, plusieurs traitements successifs peuvent également être appliqués à un même échantillon comme par exemple une précipitation au PEG suivie d'une extraction à l'aide de différents solvants organiques, d'une ultrafiltration et d'une adsorption sur silice (Ijzerman *et al.* 1997).

Dans le deuxième cas (élimination indirecte des inhibiteurs), l'action des inhibiteurs peut être limitée en agissant indirectement sur ces molécules soit par dilution de l'échantillon si la concentration d'ADN ou d'ARN cible le permet soit en incluant dans la réaction enzymatique des composés chimiques masquant partiellement ou totalement leur effet. Parmi les produits utilisables, citons la protéine T4gene32 (Schwartz *et al.* 1990, Kreader 1996, Chandler *et al.* 1998), le glycerol ou le Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Jaykus *et al.* 1996) ou encore la BSA (Bovine Sérum Albumine) (Kreader 1996). Ces molécules permettent principalement de stabiliser les enzymes en empêchant leur inactivation par les molécules inhibitrices. La T4gene32 protéine offre en outre la possibilité d'améliorer la fixation de la Taq Polymérase au brin d'ADN lors de l'amplification.

Le problème majeur concernant l'ensemble des procédés décrits ci-dessus résulte dans le choix de la technique à employer. Celle-ci va dépendre essentiellement de la nature même de l'échantillon à analyser (eau minérale, végétaux, fruits de mer, etc.). Or la composition physico-chimique des matrices de l'environnement est très variable. Il en résulte qu'il est indispensable d'identifier les faux négatifs.

Plusieurs auteurs ont donc proposé d'inclure au sein des réactions enzymatiques une séquence oligonucléotidique (étalon interne) qui serait co-amplifiée avec les séquences cibles (Schwab *et al.* 1996, Huang *et al.* 2000, Schwab *et al.* 2001). Ces étalons internes peuvent servir aussi de standard pour la quantification de la cible par PCR en temps réel (Bustin 2000). La présence de ces étalons permet de prendre en compte les éventuelles variations intervenant pendant la réaction d'amplification voire même lors de l'ensemble de la chaîne d'analyse. Dans le cas où il n'y aurait pas de séquence cible et pas d'inhibiteur, l'étalon interne est amplifié, attestant du bon fonctionnement de la réaction. À l'inverse, en cas de non détection, cela signifie que la réaction s'est mal déroulée du fait de la présence d'inhibiteurs. Plusieurs types d'étalons différents peuvent être synthétisés. Cela dépend principalement du système de révélation utilisé et du jeu d'amorces employé pour leur amplification. En effet, dans le cas d'une révélation après électrophorèse, il est indispensable de discriminer la séquence cible de celle de l'étalon par une taille différente. Dans le cas de l'utilisation de systèmes de révélation spécifiques *via* des sondes, le facteur discriminant n'est pas la taille mais la séquence. En outre il est possible d'amplifier l'étalon par un jeu d'amorces soit complètement différent, ce qui revient à mettre au point une PCR multiplex, soit identique, ce qui peut faire intervenir des phénomènes de compétition entre standard et cible.

Dans tous les cas l'utilisation d'un étalon interne d'inhibition, qu'il soit de taille différente ou non, de séquence différente ou non, co-amplifiable avec les mêmes amorces ou non, nécessite impérativement de déterminer la quantité limite à utiliser afin d'éviter tout phénomène de compétition, pouvant défavoriser la détection de faibles concentrations de la séquence cible.

Comme il n'existe aucun consensus concernant ni les techniques d'extraction-purification des génomes viraux ni les méthodes d'amplification, un très grand nombre de protocoles différents est décrit dans la littérature.

**En conclusion, les molécules responsables de l'inhibition des réactions enzymatiques sont très diversifiées. Il est donc nécessaire d'adapter le protocole d'extraction d'acides nucléiques à la matrice analysée. Mais la composition physico-chimique des matrices alimentaires ou environnementales étant susceptible de varier dans le temps, il est indispensable d'incorporer un étalon interne capable de mettre en évidence les faux négatifs.**

### B.1.2 Risque de faux positifs

La recherche des génomes viraux dans les milieux environnementaux souffre de la faible densité des particules virales retrouvées dans ces échantillons. De nombreux auteurs ont donc tenté d'augmenter la sensibilité de ces techniques. L'utilisation de protocole de double amplification (Nested et Semi-Nested PCR) permet de répondre à ces attentes. Ces techniques ont couramment été employées pour la recherche des *Enterovirus* (Zoll *et al.* 1992, Puig *et al.* 1994, Gantzer *et al.* 1998), des *Norovirus* (Gilgen *et al.* 1997, Häfliger *et al.* 1997, Green *et al.* 1998, Beuret *et al.* 2000), des *Rotavirus* et du virus de l'hépatite A (Gilgen *et al.* 1997), des *Adenovirus* (Puig *et al.* 1994) et ceci dans différents milieux (eau de surface, eau de boisson, fruits de mer). Or, s'il est incontestable que ces méthodologies sont extrêmement sensibles, il est reconnu qu'elles sont aussi dangereuses du fait d'un important risque d'obtenir des faux positifs par le transfert inter-tube de produit amplifié. Ainsi Lamothe *et al.* (2003) obtiennent 2,44 % de faux positifs en analysant des eaux minérales (n=718) de différentes provenances par RT semi-nested PCR ciblant les *Norovirus*. Ces faux positifs sont dus soit à des contaminations de laboratoire (séquences identiques au contrôle positif : 1,67 %), soit à des amplifications non spécifiques (séquence amplifiée correspondant à d'autres micro-organismes : 0,77 %). Les contaminations de laboratoire sont favorisées par la manipulation de produits post-PCR riches en séquence cible. La présence d'amplifications non spécifiques dépend des conditions de PCR et de la spécificité des amorces. Or, pour la détection des *Norovirus* il est souvent fait appel à des amorces dégénérées permettant certes la détection d'un maximum de sérotypes différents mais diminuant aussi la spécificité. Dans ce cas, la confirmation des produits amplifiés par des techniques complémentaires est une condition indispensable à la validation des résultats (Atmar & Estes 2001, Bosch *et al.* 2003).

Afin de limiter les manipulations de produit amplifié, d'autres auteurs ont essayé d'augmenter la sensibilité, non plus en travaillant sur la réaction de PCR, mais plutôt sur la révélation du signal post-PCR. L'utilisation de systèmes de révélation spécifiques comme les techniques d'hybridation moléculaire (sur membrane ou en milieu liquide) peuvent augmenter la sensibilité de la technique de RT-PCR (Arnal *et al.* 1998, Schwab *et al.* 2001). Elles ont également l'avantage d'augmenter (comme la nested PCR ou la semi-nested PCR) la spécificité de détection par l'emploi de sondes de révélation, et dans certains cas de typer les fragments amplifiés.

En outre, il existe sur le marché différentes procédures de RT-PCR proposées pour limiter les manipulations trop importantes entre les différentes réactions. Il s'agit par exemple des systèmes de RT-PCR « one-step » qui consistent à réaliser la RT et la PCR en même temps et dans le même tube. L'utilisation de ces procédures apparaît peu efficace pour certains auteurs comme Cusi *et al.* (1994), Leutenegger *et al.* (1999) et Bustin (2000). Mais l'optimisation des enzymes et en particulier l'association de mélanges de RT et l'utilisation de hot start Taq polymérase permet maintenant d'obtenir une sensibilité égale (Loisy *et al.* 2005).

Le risque de faux positif apparaît moins important lors de l'application de protocole de PCR en temps réel où l'amplification et la révélation sont réalisées sans ouverture du tube. Le développement de ces techniques doit s'accompagner de contrôles adéquats adaptés à l'échantillon analysé (Niesters 2004).

**En conclusion, il est important d'avoir conscience du risque de faux positifs principalement lorsqu'il y a un traitement post-PCR (Nested PCR...) ou lors de la manipulation d'échantillons fortement contaminés. Il est donc indispensable de multiplier les témoins négatifs et de séquencer les produits amplifiés. Un échantillon positif doit présenter une séquence spécifique du virus recherché mais elle doit aussi être différente du témoin positif utilisé. La PCR en temps réel réduit le risque de faux positifs en éliminant les manipulations post-PCR. C'est donc ce type de protocole qui doit être privilégié dans l'éventualité d'une utilisation en routine.**

## B.2 Interprétation de la présence de génome dans l'environnement

L'exemple récent des eaux minérales fournit un exemple parfait pour illustrer les problèmes liés à l'interprétation d'une analyse virologique par biologie moléculaire.

« Souillure par des micro-organismes pouvant causer une infection » est l'une des définitions médicale du terme « contamination ». Autant dire que le titre « Mineral water contamination claim » dans Nature en avril 2002 (Anonyme) a eu l'effet d'un séisme dans la communauté scientifique dont les répliques ne se sont pas fait attendre dans la presse européenne (Suisse, France, Italie, Belgique, Espagne...) et mondiale (Australie...). Cette information issue d'une publication de Beuret *et al.* (2000) qui détectent des fragments de génome de *Norovirus* dans 33 % des eaux minérales embouteillées, interpelle sur la signification d'un tel signal alors qu'aucune épidémie de gastroentérites à *Norovirus* due à la consommation de ces mêmes eaux minérales n'a pu être identifiée.

Or, il faut rappeler que la RT-PCR ne détecte que des fragments de génome viral et de ce fait ne permet pas de témoigner du caractère infectieux du virus isolé. Ce point est fondamental et anime de nombreux débats. Pour certains, l'ARN génomique serait « rapidement » dégradé dans le milieu hydrique et de ce fait le génome détecté ne « pourrait » être qu'encapsidé et donc appartenir à un virus complet « potentiellement » pathogène. D'autres rappellent que le devenir de l'ARN génomique dans l'environnement hydrique est mal connu et surtout que l'existence d'une capsidie n'est pas, et de loin, un critère suffisant pour témoigner du caractère infectieux du virus. En effet, une capsidie peut avoir subi des dommages qui rendent le virus incapable de se fixer sur les cellules sensibles et donc de les infecter. Avec les unités virales infectieuses, nous disposons de repères bien définis (doses minimales infectantes, durée de survie, sensibilité à la chaleur, aux désinfectants, etc.) qui permettent l'estimation d'un risque pour la santé publique lors de la détection de ce type de particules dans le milieu hydrique. Pour les génomes viraux, à l'inverse, ces données n'existent pas ou sont excessivement fragmentaires. Aussi, avant de tirer des conclusions à la suite de la détection de génome dans une eau ou un aliment, **il semble impératif de se poser la question suivante : les connaissances concernant la dégradation des génomes viraux (ou des particules non infectieuses en général) sont-elles arrivées à un niveau suffisant pour utiliser les techniques de biologie moléculaire comme outil analytique visant à estimer le risque viral pour l'homme via l'eau et les aliments ?**

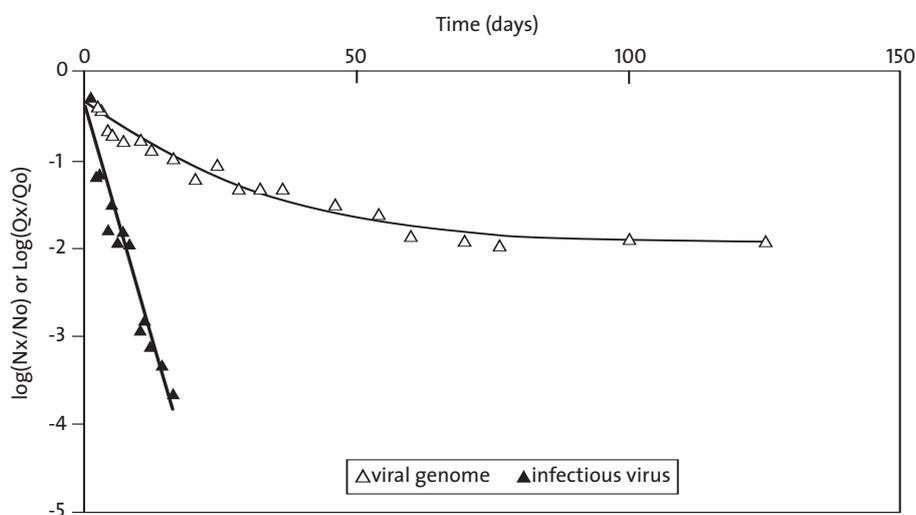
En fait, dans l'état actuel des connaissances, le niveau d'information est différent selon le résultat obtenu.

L'obtention d'un résultat négatif, dans les conditions d'assurance qualité décrites précédemment (étalon interne...), permet de témoigner de l'absence du virus infectieux correspondant dans le volume d'échantillon analysé. Le risque de contamination virale peut alors être estimé en fonction du volume analysé.

L'interprétation semble beaucoup plus complexe dans le cas d'un résultat positif même si celui-ci est obtenu selon des critères d'assurance qualité. Plusieurs raisons à cela :

- d'une manière générale, de très nombreuses études bibliographiques ont montré qu'il était possible de détecter du génome sans pour autant isoler le virus infectieux correspondant (Ma *et al.* 1994b, Maier *et al.* 1995, Straub *et al.* 1995, Sobsey *et al.* 1998, Nuanualsuwan & Cliver 2003). Par exemple, Puig *et al.* (1994) travaillant sur les mêmes échantillons d'eau trouvent que 75 % des échantillons contiennent du génome d'*Enterovirus* alors que des *Enterovirus* infectieux ne sont rencontrés que dans 31 % des échantillons ;
- la cinétique d'inactivation d'une particule virale infectieuse et la cinétique de dégradation d'un fragment de génome sont souvent différentes dans un même milieu, notamment dans l'eau minérale. Gassilloud *et al.* (2003) observent une persistance plus grande du génome viral quelle que soit la température (entre 4°C et 35°C) et quel que soit le virus (*Calicivirus félin f9*, *Poliovirus 1*). À 35°C par exemple, le *Poliovirus 1* infectieux subit une inactivation de l'ordre de 4 unités logarithmiques en 20 jours, alors que la dégradation du fragment génomique détecté par RT-PCR n'est même pas de 2 unités logarithmiques en 80 jours. Ceci implique que plus l'origine de la contamination est éloignée dans le temps plus la discordance entre génome et particule infectieuse est importante (Figure 3) ;

**Figure 3 : persistance du *Poliovirus 1* infectieux (infectious virus) détecté par culture cellulaire et d'un fragment de son génome (viral genome) détecté par RT-PCR en temps réel à 35°C dans une eau minérale**



Source : (Gassilloud *et al.* 2003)

### Question 3

- très peu de données sont disponibles sur les mécanismes d'inactivation d'une particule virale : dégradation du génome et dégradation de la capsid ;
- les paramètres impliqués dans la perte d'infectiosité et la dégradation du génome sont différents. La température reconnue depuis des années comme étant un des paramètres les plus importants pour la perte d'infectiosité a un effet très faible sur la dégradation du génome. En fait, il semble probable que ce paramètre augmente simplement la cinétique de dégradation de la capsid et que le génome n'est dégradé que dans un second temps par exemple par des ribonucléases ;
- la dose virucide, basée sur des mesures d'infectivité, n'est pas la dose qui permet d'éliminer toute trace de génome viral. Ainsi il a été largement démontré que pour une dose donnée de désinfectants (Chlore, ozone, UV...), l'abattement en virus infectieux est toujours très largement supérieur à celui obtenu pour des fragments de génome détecté par PCR (Ma *et al.* 1994b, Sobsey *et al.* 1998). En fonction des données de la littérature, il semblerait que pour garantir l'absence de génome, les conditions de certains traitements où les doses de désinfectant devraient être revues à la hausse sans pour autant garantir une diminution du risque d'infection.

En fait, à l'heure actuelle, la recherche du génome par PCR souffre principalement d'une interprétation difficile des résultats dans la mesure où elle ne permet pas de différencier les particules virales infectieuses des particules virales non infectieuses (Sobsey *et al.* 1998, Leclerc *et al.* 2000).

Afin de résoudre ce problème, Nuannualsuwan & Cliver (2002) ont proposé un protocole permettant d'éliminer de l'échantillon à analyser les virus non infectieux fournissant un signal positif par RT-PCR. Pour cela ils utilisent une combinaison de protéinase K et de RNases, qui dégradent respectivement les capsides endommagées et les ARN libres, ce qui permet de ne détecter par RT-PCR que les génomes des virus réellement infectieux. Ces résultats sont très prometteurs, mais d'autres enzymes et d'autres conditions doivent encore être étudiées avant de pouvoir valider cette technique.

Le critère d'infectiosité disponible après mise en culture des virus et la rapidité de la RT-PCR ont conduit certains auteurs à combiner les deux techniques de détection virale en réalisant une RT-PCR sur les surnageants de culture cellulaire : il s'agit de l'ICC-PCR (Integrated Cell Culture PCR) (cf. paragraphe « Association culture cellulaire/ RT-PCR ou PCR »). Même si dans ce cas le caractère infectieux du virus peut être démontré, le principal inconvénient de cette technique réside dans le fait qu'actuellement il est impossible de multiplier tous les virus entériques par culture de cellules. C'est le cas notamment des *Norovirus*.

En fonction de ces données, il semble très difficile de relier la simple présence de génome à un risque infectieux, mais il est possible de considérer la présence de génome viral comme un indicateur d'une contamination virale plus ou moins ancienne. Grabow *et al.* (2001) émettent une opinion favorable vis-à-vis de la biologie moléculaire et remettent totalement en cause l'intérêt des indicateurs bactériens (flore totale, coliformes fécaux et totaux) ou viraux (coliphages somatiques et bactériophages F-spécifiques) pour l'évaluation de la contamination virale. Les auteurs en arrivent à cette conclusion car ils ne retrouvent aucun de ces indicateurs dans de l'eau potable présentant 23 % d'échantillons positifs par RT-PCR (*Enterovirus* 17 %, *Adenovirus* 4 % et virus de l'hépatite A 3 %) (n=413). Il faut préciser qu'aucun virus infectieux n'a pu être mis en évidence dans ces mêmes échantillons, ce qui limite très largement les conclusions quant à l'évaluation du risque sanitaire.

Concernant le choix de la cible, Pina *et al.* (1998) suggèrent la recherche des *Adenovirus* par PCR plutôt que celle des *Enterovirus* en tant qu'index de la contamination virale dans la mesure où ceux-ci sont plus stables aux conditions environnementales. Ils sont en effet plus résistants au rayonnement ultraviolet et aux agents biocides (Sobsey *et al.* 1980, Irving & Smith 1981, Enriquez *et al.* 1995, Meng & Gerba 1996). Cependant, la recherche du génome de virus entériques par biologie moléculaire n'est intéressante que si elle est adaptée à la recherche des principaux virus entériques pathogènes. Cet avis est partagé par Lee & Kim (2002) qui proposent de rechercher simultanément les *Enterovirus* et les *Adenovirus* car ils présentent des distributions saisonnières différentes (Tani *et al.* 1995) et parce que la présence de l'un ne donne aucune indication sur la présence de l'autre. Ainsi, sur un total de 23 échantillons d'eau du robinet, Lee & Kim (2002) retrouvent des *Enterovirus* dans 48 % des cas et des *Adenovirus* dans 39 % des cas. Seuls 5 échantillons (22 %) s'avèrent positifs pour les deux types de virus simultanément. Par ailleurs, Cho *et al.* (2000) montrent que la recherche simultanée des *Enterovirus* et des *Adenovirus* (en multiplex) n'interfère pas sur les résultats que ce soit dans des eaux contaminées artificiellement ou dans des échantillons de l'environnement (eaux de rivière et eau du robinet).

Il faut néanmoins considérer que ce sont les *Norovirus* et le virus de l'hépatite A pour lesquels les preuves d'épidémies sont les plus nombreuses. De ce fait il faudrait au minimum inclure ces virus dans l'analyse ou démontrer que la recherche d'*Enterovirus* et d'*Adenovirus* est suffisante.

Le développement de méthodes sensibles et spécifiques a permis la détection des souches virales dans des aliments impliqués dans des épidémies. Ainsi, des souches de *Norovirus* et d'hépatite A ont été détectées par RT-PCR dans des coquillages impliqués dans des épidémies (Green *et al.* 1998, Kingsley *et al.* 2002, Le Guyader *et al.* 2003). De même la RT-PCR et le séquençage ont permis de caractériser des souches de *Norovirus* dans du jambon impliqué dans une épidémie (Daniels *et al.* 2000), des sandwiches (Girish *et al.* 2002) des framboises (Le Guyader *et al.* 2004), ou du virus de l'hépatite A dans des myrtilles (Calder *et al.* 2003) ou chez un cuisinier (Calder *et al.* 2003). Pour tous ces exemples la détection par RT-PCR était liée à la présence de virus infectieux responsables de pathologies chez les consommateurs, qui n'aurait pu être mise en évidence par aucune autre méthode.

La biologie moléculaire permet en outre une identification rapide du virus et constitue donc un outil puissant d'investigation pour la recherche des causes épidémiques. Elle permet également de déterminer l'origine exacte d'une épidémie en comparant les séquences de génome viral présent dans les selles des malades à celle de différents échantillons. Ainsi, Häfliger *et al.* (2000) constatent la présence de génome de *Norovirus* par RT-PCR simultanément dans les selles des personnes malades et dans l'eau potable.

**En conclusion, il semble extrêmement aléatoire dans l'état actuel des connaissances de vouloir relier la détection de génome viral à la présence du virus infectieux correspondant. Par contre la présence de génome viral peut être considérée comme un indicateur d'une pollution virale plus ou moins ancienne. Dans quelle mesure cet indicateur surestime le risque infectieux doit encore être précisé par des études fondamentales concernant les mécanismes de dégradation d'une particule virale (capside et génome). Ceci est d'autant plus vrai après un traitement de désinfection pour lesquelles de nombreuses données sont disponibles au sujet de la perte d'infectiosité, mais très peu sont disponibles concernant la dégradation du génome.**

**À l'inverse, l'absence de génome viral est relativement informative puisque dans les conditions d'assurance qualité adaptées, elle est synonyme d'absence de virus infectieux.**

## C. Estimation de la pollution virale *via* des indicateurs indirects

Devant les difficultés d'une recherche systématique de l'ensemble des virus entériques pathogènes pour l'homme dans l'eau et les aliments, il est fait appel à des indicateurs bactériens de pollution fécale (coliformes fécaux, *E. coli*, Entérocoques...). Concernant les virus, l'indicateur idéal devrait être (Armon & Kott 1996) :

- non pathogène ;
- toujours présent lorsque les virus pathogènes sont présents ;
- plus abondant que les virus pathogènes ;
- plus résistant aux traitements de désinfection et aux conditions environnementales que les virus pathogènes,
- facilement et rapidement quantifiable à faible coût ;
- identifiable sans ambiguïté dans tous les types d'échantillons ;
- distribué de manière aléatoire dans l'échantillon à analyser ;
- ne pas se multiplier dans l'environnement.

### C.1 Indicateurs bactériens

De nombreuses études épidémiologiques ont montré qu'une concentration élevée en indicateurs bactériens d'une eau entraîne généralement des troubles digestifs chez le consommateur (Fogarty *et al.* 1985, Zmirou *et al.* 1987, Zmirou *et al.* 1995, Van Asperen *et al.* 1998, Deshayes *et al.* 2001).

Ainsi, en 1998, Medema *et al.* ont procédé à une étude épidémiologique dans le but de déterminer s'il existe une relation entre la qualité microbiologique d'une eau et le risque d'infection intestinale. Les résultats de cette étude ont montré que le risque d'infection intestinale est corrélé avec les concentrations en coliformes thermotolérants et les concentrations en *E. coli*. Dans un travail de synthèse, Prüss (1998) a analysé 22 études concernant les eaux récréatives : dans 19 études sur 22, le risque sanitaire augmente lorsque les concentrations en bactéries indicatrices de contamination fécale augmentent. D'après les auteurs, les indicateurs les mieux corrélés avec le risque de troubles intestinaux sont les streptocoques fécaux dans l'eau de mer et les streptocoques fécaux et *E. coli* dans l'eau douce. En fait, le risque sanitaire existe pour des valeurs de concentration en indicateurs de quelques unités dans 100 mL d'eau.

## Question 3

De leur côté, Lopez-Pila & Szewzyk (2000) proposent à partir d'une étude bibliographique, un modèle mathématique d'évaluation du risque lié à la présence de *Rotavirus* et fondé sur les concentrations en *E. coli* dans les eaux récréatives. Ce modèle prend en compte les concentrations en indicateurs, la dose minimale infectante des *Rotavirus* et le volume d'eau ingéré. La faiblesse du modèle, d'après ses auteurs, réside dans le fait que les connaissances en matière d'épidémiologie sont encore insuffisantes.

Il semble important de préciser d'emblée qu'un indicateur est un hôte normal du tractus intestinal alors que les virus entériques ne sont présents que lors d'une infection. Indicateurs et virus pathogènes ont une écologie différente. Ainsi, au sens strict du terme, la concentration en indicateur, même dans une eau usée, n'est pas forcément corrélée à la concentration en virus pathogènes, dont la présence et le niveau sont soumis à des variations saisonnières, au niveau épidémique etc. Il en découle qu'une corrélation entre la concentration en indicateur et celle d'un virus pathogène est un point positif, mais l'absence de corrélation dans le temps ne remet pas en cause l'intérêt de cet indicateur. Dans le même sens, la présence d'indicateur en l'absence de virus pathogène infectieux peut aussi être observée. Par contre l'inverse est un motif de rejet de l'indicateur. Il n'est pas concevable en effet que l'indicateur soit absent alors que des virus pathogènes infectieux sont isolés. Pour démontrer ce cas de figure il semble indispensable, dans l'état actuel des connaissances, de détecter le virus sur des systèmes cellulaires in vitro seuls capables de témoigner du caractère infectieux du virus isolé. Cela a été démontré pour les indicateurs bactériens dans nombreux cas et est expliqué par une plus grande résistance des virus dans l'environnement par rapport aux indicateurs bactériens (Stetler *et al.* 1983, Keswick *et al.* 1984, Payment *et al.* 1985, Schwartzbrod *et al.* 1985, Havelaar *et al.* 1993, Lucena *et al.* 1996, Bosch 1998, Lasobras *et al.* 1999, Wait & Sobsey 2001). Pour cette raison, des indicateurs de contamination fécale d'origine virale ont été étudiés. Parmi ceux-ci figurent les bactériophages fécaux. C'est au cours des années 1950 que les bactériophages ont été proposés pour la première fois en tant qu'indicateur de contamination fécale des eaux (Kott 1966). Depuis cette époque, trois familles de bactériophages sont plus particulièrement étudiées :

- les coliphages somatiques (Kott 1966, Wentsel *et al.* 1982, Borrego *et al.* 1987, IAWPRC 1991b) ;
- les coliphages F-spécifiques (Havelaar *et al.* 1984a, IAWPRC 1991b, Woody & Cliver 1995, Calci *et al.* 1998, Nasser & Oman 1999) ;
- les bactériophages de *Bacteroides fragilis* (Jofre *et al.* 1986, Tartera & Jofre 1987, IAWPRC 1991b, Grabow *et al.* 1995, Lucena *et al.* 1996).

### C.2 Coliphages somatiques

De nombreuses études ont montré que les coliphages pouvaient être intéressants à utiliser en tant qu'indicateurs de contamination fécale. Un premier intérêt incontestable des bactériophages par rapport aux indicateurs bactériens concerne le gain de temps, puisque l'énumération des coliphages peut être réalisée en 6 heures (Wentsel *et al.* 1982) contre 24 heures pour *E. coli* et jusqu'à 48 heures pour les spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices.

Très tôt, d'autres avantages ont été rapportés. Ainsi, dès 1975, Scarpino rapporte qu'il semble exister en eau douce et en eau de mer des corrélations entre les bactéries pathogènes telles que *Salmonella* et *Shigella*, les bactéries indicatrices de contamination fécale comme *E. coli* et les coliphages. Une forte corrélation entre les concentrations en coliphages et les concentrations en coliformes (totaux ou fécaux) a également été constatée dans les eaux de rivière (Wentsel *et al.* 1982) et les eaux de mer (O'Keefe & Green 1989). Pour Kott *et al.* (1974, 1978) une corrélation est même constatée entre les coliphages, les virus et les bactéries pathogènes dans les eaux de surface (rivières et lacs) et les effluents d'eaux usées. De la même manière, Borrego *et al.* (1987) trouvent dans l'eau de mer des corrélations plus fortes entre coliphages somatiques et différents pathogènes (*Salmonella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*) qu'entre ces mêmes pathogènes et les concentrations de différentes bactéries indicatrices (streptocoques, coliformes fécaux et thermotolérants). Beaudeau & Bertin (1999) arrivent à cette même constatation à la suite de l'étude des eaux de 18 plages françaises. Pour eux, les coliphages somatiques apportent une information nouvelle tout en restant liés aux autres indicateurs de pollution fécale représentés par *E. coli*. Par ailleurs, Cornax *et al.* (1991) constatent que les coliphages somatiques et les streptocoques ont une persistance plus importante dans le milieu marin que les autres indicateurs bactériens ou phagiques. Pour ces auteurs, les coliphages et les streptocoques seraient donc de meilleurs indicateurs de la contamination fécale en eau de mer que les autres indicateurs bactériens ou phagiques. Depuis, il a été montré que les coliphages somatiques sont plus résistants aux effets du rayonnement solaire que les indicateurs bactériens ou les bactériophages F-spécifiques dans l'eau de mer (Sinton *et al.* 2002).

Déjà en 1988, Petrovicova *et al.* suggéraient qu'une augmentation du nombre de coliphages dans les eaux usées, les eaux de surface ou récréatives, pourrait être considérée comme une incitation à réaliser des recherches de virus pathogènes. Ils préconisaient d'inclure la numération des coliphages dans l'évaluation continue de l'impact de la pollution fécale sur les eaux, en particulier celles utilisées à des fins récréatives. Dutka *et al.* (1987) proposaient même une valeur seuil et estimaient que le niveau des coliphages dans l'eau douce utilisée à des fins récréatives ne devrait pas dépasser 20 ufp pour 100 mL.

Morinigo *et al.* (1992) semblent confirmer ce rôle d'indicateur viral pour les coliphages somatiques. En effet, ils constatent que non seulement les concentrations en coliphages somatiques sont corrélées à la contamination fécale que traduit le taux de coliformes, mais également qu'une augmentation de la concentration en coliphages somatiques est observée lorsque le nombre d'*Enterovirus* augmente. Cette observation s'accorde avec l'étude de Simkova & Cervenka (1981) qui montre que les coliphages et les *Enterovirus* sont les uns et les autres capables de survivre pendant de longues périodes dans l'eau de rivière. Pour ces auteurs, les coliphages pourraient donc être utilisés comme indicateurs de la présence d'*Enterovirus*.

Dans les sédiments marins, Jofre *et al.* (1989) constatent que les coliphages somatiques sont moins résistants que les *Enterovirus* ou les *Rotavirus* mis en évidence par culture cellulaire et qu'ils ne constituent donc pas de bons indicateurs.

D'autres études montrent des limites à l'utilisation des coliphages somatiques en tant qu'indicateurs. Ainsi, une critique souvent formulée à l'encontre des coliphages somatiques est leur possible capacité à se multiplier dans l'environnement. Dans un état des lieux consacré aux bactériophages, Havelaar (1993) présente les coliphages somatiques comme capables de se multiplier dans l'environnement, même dans des eaux faiblement polluées. Par ailleurs, plus sensibles aux traitements que les indicateurs bactériens, les coliphages somatiques sur-estimeraient ou sous-estimeraient selon les circonstances le risque lié à la présence de virus pathogènes humains.

Wiggins & Alexander avaient pourtant suggéré dès 1985 que les bactériophages ne pouvaient se multiplier si la densité de la souche hôte était inférieure à  $10^4$  cfu/mL, ce qui est généralement le cas dans l'environnement. En fait, on peut regretter avec Beaudeau & Bertin (1999) que le reproche fait aux coliphages somatiques de se reproduire dans le milieu naturel soit si peu documenté en terme quantitatif.

Par ailleurs il faut noter que les coliphages somatiques ne constituent pas des indicateurs spécifiquement humains de la contamination fécale (Havelaar 1993). Ceci est confirmé par Grabow *et al.* (1995) qui déterminent la proportion des différents phages chez l'homme et l'animal. Ainsi, sur 90 selles humaines, 54 (60 %) contiennent des coliphages somatiques alors que sur 155 selles d'animaux, représentant au total 14 espèces, 38 à 100 % sont positifs en coliphages somatiques.

**En conclusion, les coliphages somatiques sont étudiés depuis plusieurs décennies dans le monde entier et aucun consensus n'a été trouvé quant à leur utilisation en tant qu'indicateurs de la contamination virale des eaux. Ils présentent des avantages (durée d'analyse, survie) et des inconvénients (multiplication éventuelle) et leur comportement dans l'environnement est sujet à controverse.**

### C.3 Bactériophages F-spécifiques

Pour Havelaar (1993), les phages ARN F-spécifiques sont potentiellement de bons indicateurs viraux. Cependant, si leurs concentrations sont fortement corrélées aux concentrations en *Enterovirus* dans toutes les eaux environnementales étudiées (rivières, lacs), elles ne le sont pas dans les eaux usées (brutes ou traitées) (Havelaar *et al.* 1993). Les concentrations en phages ARN F-spécifiques dans l'environnement pourraient donc apporter une information quant aux concentrations en virus entériques. Des valeurs seuils ont même été proposées en fonction du type d'eau pour l'évaluation du risque. Ainsi en eau douce, les concentrations ne devraient pas dépasser 1 ufp/100mL. En eau de mer, du fait d'une survie moindre des bactériophages dans cet environnement, la concentration limite proposée serait de 1 ufp/100mL.

Sur le plan de la survie, Nasser & Oman (1999) comparant les phages F-spécifiques, *E. coli*, *Poliovirus 1* et virus de l'hépatite A dans différents milieux tels que eaux souterraines, PBS ou eaux usées et à différentes températures constatent une différence d'inactivation et concluent que les phages F-spécifiques sont plus adaptés qu'*E. coli* pour prédire la présence de virus dans les eaux naturelles. Dans une étude récente, Sinton *et al.* (2002) constatent expérimentalement qu'en eau douce, les bactériophages F-spécifiques sont plus résistants au rayonnement

### Question 3

solaire que les autres indicateurs testés. Les auteurs considèrent que ces phages pourraient représenter la survie des virus entériques dans les eaux de surface. Chung *et al.* (1998) arrivent à la même conclusion après avoir étudié la contamination fécale dans les eaux de conchyliculture. D'après eux, parmi les bactériophages et les indicateurs bactériens, les bactériophages F-spécifiques et les spores de *Clostridium perfringens* seraient les plus représentatifs de la présence de virus entériques dans ce milieu. De la même manière, Calci *et al.* (1998) estiment que les phages F-spécifiques pourraient constituer des indicateurs de choix pour estimer la présence potentielle de virus entériques, en particulier dans les estuaires et dans l'environnement marin touché par les rejets d'eaux usées.

Concernant la possibilité pour les bactériophages F-spécifiques de se multiplier dans l'environnement, Woody & Cliver (1995) montrent que ceci est peu probable. Ils constatent en effet que les pilis sexuels indispensables à l'infection des bactériophages F-spécifiques ne sont synthétisés qu'au-dessus de 25°C avec des températures optimales au-dessus de 30°C. Quand la température passe de 30 à 25°C, le nombre de bactéries infectées est diminué d'un facteur 10. Ce nombre est encore diminué d'un facteur 10 lorsque les bactéries infectées sont en phase stationnaire. De ce fait, il est clair que les conditions généralement rencontrées dans le milieu naturel sont incompatibles avec la multiplication de bactériophages F-spécifiques.

Malgré ces aspects positifs, d'autres études mettent en doute l'intérêt des bactériophages F-spécifiques. Ainsi, Beaudeau & Bertin (1999) considèrent que les bactériophages F-spécifiques n'apportent aucune information supplémentaire par rapport aux indicateurs bactériens classiques dans l'eau de mer.

Pour Vilaginès *et al.* (1997), les *Enterovirus* sont plus résistants aux traitements que les bactériophages F-spécifiques. De plus, les auteurs ne retrouvent aucune corrélation entre ces deux paramètres. Ils concluent que la présence de l'un ne permet en aucun cas de prévoir la présence de l'autre, ce qui s'accorde avec les conclusions de Lopez-Pila & Szewzyk (2000). Morinigo *et al.* (1992) rapportent également que les bactériophages F-spécifiques ne sont corrélés ni à la contamination fécale, ni à la contamination virale que ce soit dans l'eau de rivière ou dans l'eau de mer. Ces auteurs en concluent que les phages F-spécifiques ne peuvent prétendre jouer le rôle d'indicateur de la présence éventuelle de virus.

Comme les coliphages somatiques, les bactériophages F-spécifiques sont peu spécifiques d'une contamination humaine. Ainsi, sur 155 selles animales provenant de 14 espèces différentes, 36 à 48 % sont positifs en bactériophages F-spécifiques (Grabow *et al.* 1995). Cependant, il a été montré (Hsu *et al.* 1995) que les bactériophages F-spécifiques sont constitués de quatre génogroupes différents (I, II, III et IV). Or des travaux ont permis de constater une différence de répartition de ces génogroupes en fonction de la nature humaine (génotypes II et III) ou animale de la pollution fécale (génotypes I et IV) (Hsu *et al.* 1995, Schaper & Jofre 2000, Schaper *et al.* 2002).

Concernant les études épidémiologiques, à notre connaissance, seule l'étude de Lee *et al.* (1997) a montré qu'il existait une relation entre le nombre de bactériophages F-spécifiques, seul bactériophage recherché, et le risque de gastroentérites dans l'eau de surface. D'autres études, au contraire, n'établissent pas de lien entre le risque de gastroentérites et les concentrations en bactériophages F-spécifiques dans les eaux de surface (Van Asperen *et al.* 1998). En réalité, et comme Leclerc *et al.* (2000) on peut regretter le manque d'études épidémiologiques qui prennent en compte les différents bactériophages.

L'Union Européenne préoccupée par le sujet a financé un projet pour évaluer les bactériophages comme indicateur viral dans les eaux de baignade (Projet SMT4-CT95-1603). Ce contrat a montré l'inadéquation de ces indicateurs pour mettre en place une norme européenne commune à tous les pays de la Communauté. Après avoir testé comme indicateurs viraux les phages somatiques, les phages de *Bacteroides fragilis* et les F+ARN spécifiques, la conclusion est que, « les phages somatiques et les bactériophages de *Bacteroides fragilis* sont intéressants pour prédire la présence de pathogènes de même origine que les bactéries indicatrices mais avec des temps de survie plus longs » (Contreras-Coll *et al.* 2002).

En ce qui concerne le cas particulier de la pollution virale des coquillages, le Projet Fair-CT98-4039 a conclu à l'inadaptation des phages ARN F-spécifiques pour suivre la contamination virale des coquillages : « la présence de virus humains semble être reliée à la présence de tous les indicateurs potentiels dans les zones très contaminées, où *E. coli* est probablement apte comme indicateur. Cependant il n'y a pas de relation statistique entre *E. coli* et la présence de génome de virus.../... Il faut garder à l'esprit que la plupart des coquillages issus de zones de production A et B, et particulièrement dans le sud de l'Europe, présentaient des résultats négatifs en ARN F-spécifique alors qu'ils pouvaient sporadiquement être contaminés en génome de virus ». Néanmoins, il est possible de souligner que ces mêmes auteurs observent que la probabilité de détecter du génome viral augmente lorsque la concentration en phages de *Bacteroides fragilis* augmente (Muniain-Mujika *et al.* 2003).

Ceci est confirmé par les résultats trouvés dans le projet « Virus Safe Seafood » QLK1-CT-1999-00634. « Il n'existe pas de corrélation entre la présence génome de virus entériques et celle des bactériophages, en particulier dans les zones étudiées - classées A- sur les deux sites Français et Néerlandais » (Pommepuy *et al.* 2003).

Récemment pour clairement résoudre ce problème, la DG Sanco a financé un projet auprès du LCR (Laboratoire Communautaire de Référence Européen pour les Coquillages, CEFA, Weymouth). Les analyses réalisées en Angleterre, Espagne et Italie montrent clairement un effet saisonnier de la contamination par les phages avec une absence totale de contamination pendant les mois d'été dans les pays du sud alors que d'une manière régulière 10 % des échantillons analysés dans ces pays étaient positifs en génome de VHA (D. Lees, CEFAS, Final Report, disponible en ligne [www.crlcefaf.org](http://www.crlcefaf.org)).

En Angleterre (zone A), en France (zone C) et aux États-Unis (zone D), on observe une relation phage/génome de virus. Dans les autres cas, les résultats montrent d'une manière générale, une mauvaise adéquation phages/génome de virus (Tableau 12). La même conclusion est obtenue dans le bilan de l'étude européenne (Projet Fair-CT98-4039), qui souligne que dans le cas des zones très contaminées la présence de virus est également corrélée à celle d'*E. coli* (Formiga-Cruz *et al.* 2003).

**Tableau 12 : détection de génome de virus entériques humains par RT-PCR, d'*E. coli* et des phages ARN F-spécifiques dans différents pays**

Pays	H - Huitre M - Moule	Nb Echant.	Virus de l'hépatite A (VHA)		Norovirus (NV)		Enterovirus (EV)	
			VHA ( <i>E. coli</i> )	VHA (F+)	NV ( <i>E. coli</i> )	NV (F+)	EV ( <i>E. coli</i> )	EV (F+)
Espagne	H/M zone A	7	0 (0)	0 (0)	nr	nr	0 (0)	0 (0)
Espagne	H/M zone B	47	8(4)	8(4)	nr	nr	9(4)	9(5)
Italie	M zone A, B	36	13(5)	13(3)	nr	nr	5(1)	5(1)
Grande-Bretagne	H zone A	13	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	nr	nr
Grande-Bretagne	H, zone B	82	nr	nr	13(9)	13(13)	nr	nr
États-Unis	H zone D	63	nr	nr	nr	nr	16(16)	16(16)
France	H zone A	177	4(2)	4(1)	37(5)	37(8)	nr	nr
France	M zone C	38	5(4)	5(5)	6(5)	6(6)	nr	nr

Les chiffres indiquent le nombre d'échantillons détectés positifs pour l type de virus, entre parenthèses : le nombre d'échantillons également positif en *E. coli* et en phages ARN F-spécifiques ; nr : non recherché.

Zone A : au moins 90 % des résultats sont < 230 *E. coli*/100g et aucun >1 000 *E. coli*/100 g

Zone B : au moins 90 % des résultats sont < 4 600 *E. coli* et aucun > 46 000 *E. coli*/100 g

Zone C : au moins 90 % des résultats sont < 46 000 *E. coli*/100 g

Zone D : ni A, ni B, ni C

## Question 3

L'analyse de données collectées dans différents pays d'Europe montre clairement une différence en fonction de la localisation géographique avec globalement une mauvaise corrélation entre la détection des phages et la présence de génome de virus entériques humains surtout dans les pays du sud de l'Europe (Formiga-Cruz *et al.* 2003). En Norvège, les phages et les *Adenovirus* ont surtout été détectés en hiver avec une présence relativement régulière des *Norovirus* dans les coquillages tout au long de l'année, démontrant soit un rejet par la population soit une résistance plus grande du génome de ces virus (Myrmel *et al.* 2004).

L'utilisation des phages ARN F-spécifiques comme indicateur d'efficacité de traitement a été très étudiée. La communauté scientifique a, par exemple, souvent comparé l'élimination des virus entériques à celle du bactériophage MS2, il s'avère que MS2 peut être un bon indicateur d'efficacité de rétention des virus testés notamment après coagulation, floculation, séparation, filtration (Havelaar *et al.* 1984b, Rao *et al.* 1988, Nasser *et al.* 1995).

Concernant la rétention sur charbon actif en grain, l'abattement dépend fortement du type de virus et même de la souche utilisée (Havelaar *et al.* 1984b, Rao *et al.* 1988, IAWPRC 1991a, Nasser *et al.* 1995). Comme le bactériophage MS2 est moins retenu par le charbon que les *Poliovirus*, *Echovirus* et *Coxsackievirus*, il donne donc une bonne sécurité comme indicateur de rétention des *Enterovirus* (Powell *et al.* 2000).

Le bactériophage MS2 a été proposé comme indicateur de résistance aux oxydant chlorés (Hajenian & Butler 1980, Harakeh & Butler 1984, Havelaar & Nieuwstad 1985, Havelaar 1987, Tyrrell *et al.* 1995). Le MS2 est plus résistant que le *Poliovirus* au chlore combiné<sup>(20)</sup> (Havelaar & Nieuwstad 1985, Sobsey *et al.* 1988).

Concernant l'étape de désinfection par les ultra-violets (UV), MS2 peut être utilisé comme indicateur d'efficacité de traitement virucide. Il est considéré comme plus résistant que les virus pathogènes pour l'homme (Vaughn *et al.* 1990, Nieuwstad *et al.* 1991). Il faut, pour 2 log d'abattement, 400 J/m<sup>2</sup>. À cette dose, on obtient un meilleur abattement pour *Cryptosporidium*, ce qui a renforcé l'utilisation de ce phage MS2 comme indicateur de bonne désinfection (Adams 1959, Havelaar *et al.* 1990, Wilson *et al.* 1992, Chen *et al.* 1993, Chesler & Jacangelo 1993, Mackey 2000). Des études ont cependant attiré l'attention sur les biais possibles dans les études d'inactivation faites à partir de culture de MS2 (Jolis 2002). En effet, le temps de stockage de culture avant les essais et ainsi que la température de stockage peuvent modifier de façon significative les résultats obtenus. Ces phénomènes peuvent expliquer des résultats publiés divergents (Qualls & Johnson 1983).

Pour les traitements de rétention et les traitements biocides, MS2 est un bon indicateur d'efficacité de traitement. Cependant, le niveau d'abattement des MS2 ajoutés à l'eau à traiter est plus élevé de 2 à 3 log que le niveau d'abattement des MS2 présents naturellement dans l'eau brute.

**En conclusion, et comme pour les coliphages somatiques, le bilan concernant les bactériophages F-spécifiques est mitigé et il faut bien admettre qu'à l'heure actuelle, les travaux de recherche n'ont pas permis de déterminer s'ils pouvaient réellement être considérés comme des indicateurs fiables de contamination virale dans les différents types d'eaux ou les coquillages. Néanmoins la quantification des phages ARN F-spécifiques semble constituer un paramètre intéressant en tant qu'indicateur d'efficacité de traitement.**

**Enfin il faut souligner que la communauté scientifique européenne, en se fondant sur les résultats obtenus dans des échantillons, n'a pas retenu les bactériophages F-spécifiques comme indicateur de présence de virus entériques humains dans les coquillages ni comme indicateur de purification des coquillages (cf. règlement (CE) n°2073/2005 relatif aux critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires).**

### C.4 Phages de *Bacteroides fragilis*

La survie de ces phages dans l'environnement semble importante. Ainsi, dans les sédiments marins, les phages de *Bacteroides fragilis* ont une résistance similaire à celle des *Enterovirus* et des *Rotavirus* mis en évidence par culture cellulaire (Jofre *et al.* 1989). Dans les eaux souterraines, les phages de *Bacteroides fragilis*, et les *Clostridium* s'avèrent être de meilleurs indicateurs de pollution fécale que les indicateurs bactériens tels que les coliformes totaux, les coliformes thermotolérants ou les streptocoques fécaux (Lucena *et al.* 1996).

Concernant la multiplication des phages de *Bacteroides fragilis*, elle nécessite pour les besoins de la souche hôte d'être en condition anaérobie stricte. De telles conditions ne sont jamais retrouvées dans le milieu hydrique naturel et de ce fait, la multiplication des phages de *Bacteroides fragilis* ne paraît pas possible dans l'environnement.

(20) L'utilisation du chlore combiné comme désinfectant n'est pas autorisée en France.

Par ailleurs, la souche de *Bacteroides fragilis* HSP40 est reconnue pour ne mettre en évidence que les bactériophages d'origine humaine (Grabow *et al.* 1995), ce qui présente l'énorme avantage de déterminer l'origine humaine d'une contamination fécale.

Mais malgré ces avantages, les phages de *Bacteroides fragilis* souffrent d'un certain nombre d'inconvénients. D'une part, en eau de mer Cornax *et al.* 1991) constatent que les phages de *Bacteroides fragilis* persistent moins longtemps que les coliphages ou les streptocoques fécaux, ce qui limite leur utilisation au titre d'indicateur de contamination fécale dans ce milieu. D'autre part, leur mise en évidence est plus contraignante que celle des autres bactériophages car elle nécessite des conditions anaérobies (Schwartzbrod & Gantzer 1996). Enfin, une critique majeure qui est souvent faite concerne leur faible concentration dans les eaux usées épurées et dans le milieu hydrique naturel, ce qui restreint leur utilisation en tant qu'indicateur de contamination virale (Chung *et al.* 1998, Skrabber *et al.* 2002).

**Pour conclure sur l'utilisation des bactériophages en tant qu'indicateurs de contamination virale dans le milieu hydrique et pour illustrer la difficulté de statuer sur le sujet, il nous a semblé intéressant de rapporter les conclusions de deux travaux de synthèse parus à 15 ans d'intervalle, respectivement en 1981 et en 1996. Dans la première publication (Kott 1981) on peut lire dans la conclusion : "Les résultats montrent très fortement que les coliphages peuvent être utilisés en tant qu'indicateur de contamination virale, ce qui est déjà le cas dans quelques pays". Quinze ans plus tard, en 1996, Armon et Kott proposent un état des lieux qui résume « 50 ans de recherche sur les bactériophages ». La constatation est qu'aucun des bactériophages ne correspond à l'indicateur idéal tel qu'il a été défini. Pour les auteurs, les difficultés rencontrées sont multiples, comme par exemple les différences géographiques ou le manque de normes. La solution qu'ils proposent est de tenir compte davantage de ces facteurs et ainsi de définir pour chaque type d'eau le ou les indicateurs qui seraient les plus judicieux.**

**Néanmoins, la recherche des phages ARN F-spécifiques semble constituer un outil intéressant pour évaluer l'efficacité d'un traitement.**

## D. Conclusion

Dans le cadre d'une estimation de la pollution virale d'une eau ou d'un aliment, les indicateurs bactériens restent un outil important dans le sens où leur présence souligne une pollution fécale. Il est clair que la probabilité de retrouver des virus pathogènes dans une matrice donnée est plus élevée en présence d'indicateurs bactériens qu'en leur absence. Néanmoins, l'absence de ces indicateurs ne garantit pas toujours l'absence de virus pathogènes. Ainsi, si une information plus précise sur la pollution virale est souhaitée, chacune des possibilités discutées dans ce rapport présente des avantages et des inconvénients.

En fait, l'absence de virus pathogènes (limitée aux principaux genres viraux comme les *Norovirus*, les *Hepatovirus* et les *Enterovirus* ou plus élargie en incluant les *Rotavirus*, les *Adenovirus* et les *Astrovirus*) pourrait théoriquement être garantie par l'absence de génome viral détecté par RT-PCR qualitative ou en temps réel. Néanmoins, un travail important reste encore à faire en terme de standardisation concernant les techniques de concentration et les techniques d'amplification (choix des amorces...).

Depuis mars 2004, le Comité européen de normalisation (CEN/TC275 Food Analysis-Horizontal Methods – WG 6 Microbial Contamination) a mis en place un groupe de travail (TAG4 Detection of viruses in Food) dont l'objectif est de proposer des normes de détection des virus pathogènes de l'homme dans les aliments (*Norovirus* et VHA). Ce groupe est constitué de représentants scientifiques de dix pays européens, ayant une expérience de la recherche et de l'appui technique dans le domaine.

Les travaux se focalisent sur la définition de protocoles de détection des virus les plus importants sur le plan épidémiologique : les *Norovirus* et le virus de l'hépatite A. En revanche, le groupe prend en compte l'ensemble des denrées alimentaires susceptibles d'être contaminées soit par des manipulations soit par l'intermédiaire de l'environnement hydrique. Les matrices sont néanmoins regroupées dans cinq catégories, en fonction des spécificités analytiques qui les caractérisent. Ainsi, il distingue : les salades (la laitue), des fruits fragiles (les framboises), des mollusques bivalves (les huîtres) qui impliquent des principes différents de concentration et de purification des virus contaminants. Les surfaces plus larges des denrées susceptibles d'être contaminées sont également associées à un protocole particulier. Enfin, l'eau embouteillée est incluse dans le cadre des travaux du groupe.

### Question 3

La RT-PCR en temps réel est retenue comme la méthode la plus appropriée pour la détection des virus dans les concentrats obtenus à partir de ces différentes matrices alimentaires, des surfaces et de l'eau embouteillée.

Cette technique présente les avantages suivants :

- elle peut être facilement standardisée et de plus en plus de laboratoires ont accès à cette technologie ;
- la réaction est sensible et rendue spécifique grâce à l'utilisation d'amorces et d'une sonde d'hybridation ;
- la technique peut être facilement adaptée à la recherche d'autres virus entériques ;
- les résultats de la réaction peuvent permettre, dans certaines conditions, d'estimer le nombre de copies de génome viral recherché ;
- les problèmes inhérents aux contaminations de laboratoire sont réduits.

Afin de maîtriser chacune des étapes de l'analyse des matrices alimentaires, le groupe envisage de définir des contrôles. Le premier sera de type viral (virus animaux modèles des *Norovirus* et du virus de l'hépatite A) et sera utilisé pour évaluer le rendement de récupération des étapes d'éluion, de concentration, d'extraction des ARN et de détection. Le second sera de type acide nucléique afin de témoigner de l'efficacité de la réaction d'amplification. La possibilité de disposer d'un contrôle positif est également étudiée afin d'envisager la quantification des séquences virales cibles (ARN des *Norovirus* et du virus de l'hépatite A).

La définition des protocoles fait l'objet d'une recherche d'un consensus scientifique entre les différents membres du comité. Un groupe miroir (Vo8B-Microbiologie des aliments – Groupe de travail « Détection des virus ») est également mis en place par l'AFNOR afin de communiquer l'avancement des travaux du comité européen aux équipes françaises du secteur public ou privé, concernées par la virologie des aliments. Le groupe miroir a également comme objectif de faire remonter des avis ou des informations permettant de construire une norme précise et répondant aux besoins d'outils d'investigation des toxi-infections alimentaires.

Néanmoins, l'utilisation des techniques moléculaires pose aussi le problème de l'interprétation d'un résultat positif pour le gestionnaire du risque. Ce problème peut être en partie résolu pour certaines souches d'*Enterovirus* cultivables en confirmant la présence de virus infectieux par ICC-PCR. Pour les autres virus, des études fondamentales semblent encore nécessaires pour mieux comprendre la relation entre présence de génome et risque infectieux.

La détection de bactériophages présente l'énorme avantage de témoigner de la présence de virus infectieux vraisemblablement d'origine fécale. Du fait de leur concentration importante dans les eaux usées, les coliphages somatiques et les phages ARN F-spécifiques doivent être privilégiés. Leur présence donne une information globale sur la pollution fécale mais il s'agit d'un indicateur plus spécifique du comportement des virus par rapport aux indicateurs bactériens. Cette approche devrait être privilégiée pour une surveillance de matrices alimentaires potentiellement contaminées qui subissent un traitement de désinfection. C'est en effet dans ces conditions que l'interprétation de la présence de génome viral est la plus délicate.

## Contamination virale des aliments et de l'eau : logigramme d'interprétation d'un résultat positif par les techniques de biologie moléculaire

La réflexion sur la signification de la présence de génome viral dans l'eau et les aliments en terme d'infectiosité potentielle met en évidence la difficulté d'interprétation d'un résultat positif obtenu avec des méthodes de biologie moléculaire. Il est donc apparu nécessaire d'élaborer un logigramme d'interprétation de ce résultat positif, qui sera un outil pratique et concret pour les gestionnaires du risque.

Ce logigramme fournit donc des recommandations pour l'interprétation d'un résultat de RT-PCR ou de PCR positif lors d'une recherche de génomes (ARN ou ADN) de virus entériques pathogènes de l'homme, dans des matrices alimentaires ou dans l'eau de consommation (représentation synoptique en Figure 4).

Afin d'évaluer l'aptitude de la méthode à fournir un résultat fiable et représentatif, il est nécessaire de préciser les caractéristiques de la méthode de détection et de fournir des informations permettant d'exclure l'hypothèse d'un faux positif (liste des informations demandées en Tableau 13). Ces éléments peuvent également contribuer à apprécier l'exposition des consommateurs, en analysant des prélèvements du même lot, voire d'autres lots ou des prélèvements issus de producteurs différents pouvant être sous l'influence de facteurs environnementaux communs.

### A. Éléments complémentaires à renseigner (items)

Des compléments d'analyse et les enquêtes, permettant l'appréciation du risque infectieux, doivent être **conduits simultanément** sans attendre d'obtenir un résultat par l'une ou l'autre des approches. La conclusion d'une présence d'un danger infectieux est possible à chaque étape et de façon indépendante :

- i. Vérifier le respect (ou non) aux critères réglementaires (microbiologiques et physico-chimiques) pouvant indiquer une contamination microbienne récente.
- ii. Rechercher des facteurs environnementaux ou technologiques ou encore d'hygiène pouvant indiquer l'origine de la contamination virale de l'aliment ou de l'eau, sa date et éventuellement la durée d'exposition des denrées (ou de l'eau) aux virus (L'ensemble des points critiques précisés en Tableau 14 doit être pris en compte pour pouvoir statuer sur ce point).
- iii. La prise en compte des données épidémiologiques disponibles (par exemple : foyers épidémiques dans les populations exposées aux aliments ou à l'eau, déclarations d'infection récente chez les préparateurs...) peut également permettre de caractériser le danger (Tableau 15).
- iv. Afin d'apprécier la probabilité de présence de virus infectieux et donc d'un danger, rechercher la présence, dans les lots positifs par RT-PCR (ou PCR pour les virus à ADN), de virus entériques infectieux (principalement les entérovirus, éventuellement les réovirus, rotavirus, adénovirus, astrovirus, virus de l'hépatite A ; voire les norovirus, sapovirus et virus de l'hépatite E si des modèles cellulaires deviennent disponibles). Une caractérisation indirecte du maintien du pouvoir infectieux des virus est possible, en démontrant la présence de bactériophages infectieux (ARN F-spécifiques et/ou somatiques). Si une analyse de type HACCP montre la maîtrise des points critiques et l'arrêt de la source de contamination, alors y opposer des modèles de survie des virus dans la matrice alimentaire (ou l'eau) afin d'apprécier la persistance de virus infectieux ou l'effet de traitements hygiénisants (exemples : désinfection, cuisson...).

### B. Interprétation des résultats complémentaires obtenus

**Cas 1 :** Si au moins l'un de ces items fournit des arguments en faveur d'une contamination microbienne récente ou démontre le caractère infectieux du virus incriminé, alors il peut être conclu à une probabilité forte de présence d'un danger ou à la présence avérée d'un danger.

**Cas 2 :** Si l'ensemble de ces items fournit des arguments en faveur de l'absence d'une contamination récente et du pouvoir infectieux du virus incriminé, il est possible de conclure à une probabilité apparemment faible de présence d'un danger.

### Question 3

**Cas 3 :** Si une interrogation subsiste sur les items i. (critères sanitaires microbiologiques ou physico-chimiques), ii. (contexte environnemental, technologique ou d'hygiène du prélèvement) ou iv. (critères d'infectiosité directs ou indirects) et qu'aucun des items ne fournit d'arguments en faveur d'une contamination récente, alors le résultat positif de RT-PCR ou de PCR n'est pas interprétable quant à la présence d'un danger. Néanmoins, dans ce cas, la surveillance des denrées (ou de l'eau) et des procédés de production doit être accrue pendant la durée qui sera nécessaire pour démontrer la maîtrise durable des éventuelles sources de contamination microbienne.

**NB :** cas particulier : lorsque les items i., ii. et iv. concluent à la probabilité faible de présence d'un danger, en l'absence de données épidémiologiques interprétables (item iii.), il est néanmoins possible de conclure à une probabilité apparemment faible de présence d'un danger (cas 2).

En effet, des données épidémiologiques peuvent, dans certaines situations, témoigner de la probabilité forte (« + ») de la présence d'un danger (par exemple, survenue de cas groupés d'une maladie, associés à l'exposition à un vecteur de transmission faisant l'objet d'un résultat positif par les techniques de biologie moléculaire). Dans d'autres situations, elles peuvent témoigner d'une probabilité faible (« - ») de présence d'un danger (par exemple, absence de mise en évidence de cas associés au vecteur). Toutefois, les données épidémiologiques ne permettent pas toujours de conclure : faible puissance pour mettre en évidence des associations, etc. En outre, les données épidémiologiques sont fréquemment indisponibles du fait de la difficulté de recueil liée au caractère rétrospectif des investigations, à l'absence de confirmation des infections, etc.

### C. Représentation synoptique et liste des informations demandées

Figure 4 : logigramme d'interprétation d'un résultat positif par les techniques de biologie moléculaire

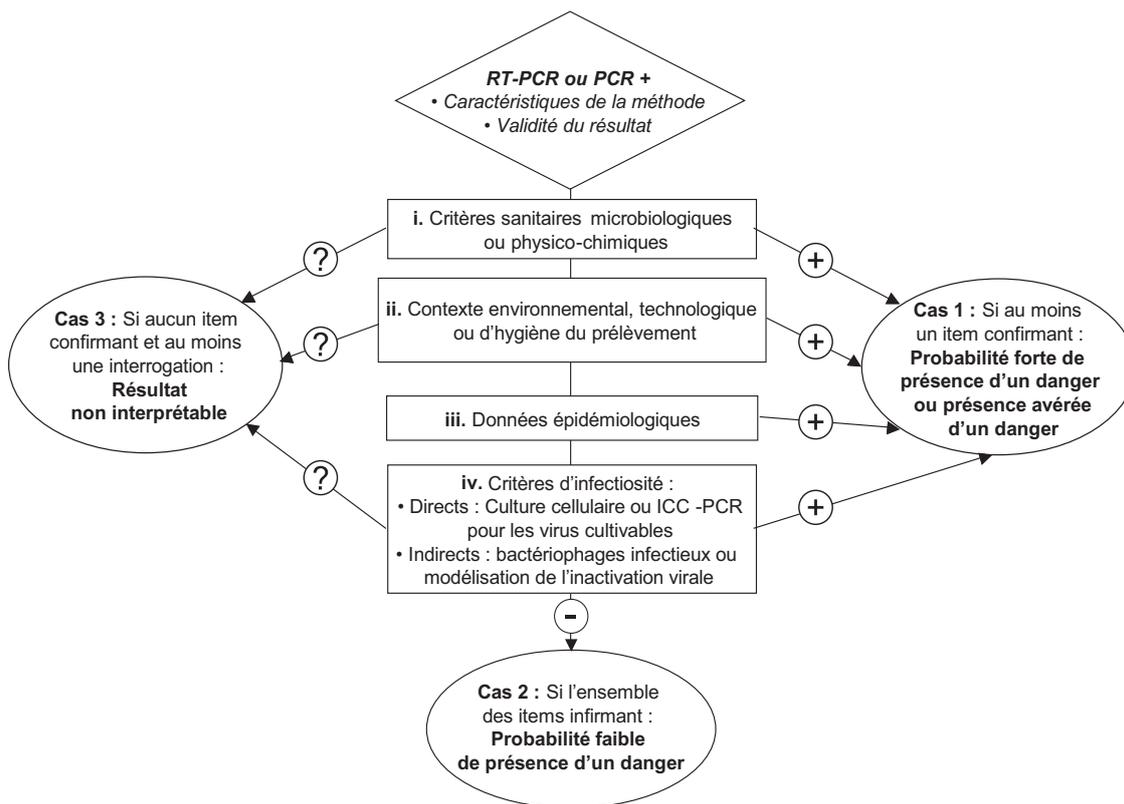


Tableau 13 : caractéristiques de la méthode – liste des données à renseigner

• Références bibliographiques, voire normatives de la méthode
• Principe de la méthode de concentration et de purification des virus
• Principe de la méthode d'extraction des acides nucléiques
• Proportion d'échantillons analysés et éventuellement rendement de récupération des génomes viraux
• Principe de la méthode de détection
• Séquences des amorces et de la sonde
• Températures d'hybridation (éventuellement concentration en MgCl <sub>2</sub> )
• Méthode de confirmation (hybridation ou séquençage)
• Nature et résultats des contrôles positifs et négatifs
• Contexte analytique : identification des prélèvements (numéro de lot, date et lieu du prélèvement), nombre de prélèvements effectués (nombre de répétitions), nombre de résultats positifs et négatifs
• Résultats du séquençage

Tableau 14 : contexte environnemental, technologique ou d'hygiène du prélèvement

Ensemble des points critiques à prendre en compte pour évaluer le contexte du prélèvement	Coquillages crus	Autres aliments	Eau de boisson
Classement de la zone de production et de stockage	X		
Qualité des ressources en eau de boisson, agricole ou industrielle	X	X	X
Vulnérabilité de la ressource vis-à-vis d'une contamination fécale (proximité d'un émissaire d'eau usée ou d'une station d'épuration des eaux usées, épandage de boues résiduelles non traitées ou de lisiers insuffisamment fermentés...)	X	X	X
Facteurs climatiques (fortes précipitations, inondations)	X	X	X
Facteurs anthropomorphiques (population accrue sur un bassin versant, sur une zone côtière, actions de malveillance...)	X	X	X
Non respect des bonnes pratiques hygiéniques, accident dans le processus de production, de transformation ou de distribution	X	X	X
Nature du traitement de production, du lavage, de la désinfection voire du processus industriel	X	X	X
Température du prélèvement, concentration en chlore...	X	X	X
Résultats de surveillance par l'exploitant	X	X	X

X : Données à renseigner

## Question 3

Tableau 15 : données épidémiologiques

■ **Malades associés à la consommation d'aliments ou d'eau :**

- Nombre de personnes exposées, de malades
- Date d'apparition des premiers signes cliniques
- Durée d'incubation
- Signes cliniques (hépatites, gastroentérites ou autres)
- Durée des signes cliniques
- Prélèvements cliniques analysés (éventuellement résultats de ces analyses)

■ **Malades dans le personnel de la chaîne de production, de transformation ou de distribution :**

- Nombre de personnes malades
- Date d'apparition des premiers signes cliniques
- Signes cliniques (hépatites, gastroentérites ou autres)
- Durée des signes cliniques
- Dates de l'arrêt et éventuellement de la reprise de travail
- Prélèvements cliniques analysés (éventuellement résultats de ces analyses)

## Références bibliographiques

- Abad, F.X., Pintó, R.M. & Bosch, A. 1998.** Flow cytometry detection of infectious Rotaviruses in environmental and clinical samples. *Applied Environmental Microbiology* 64 (7), 2392-2396.
- Abbaszadegan, M., Huber, M.S., Gerba, C.P. & Pepper, I.L. 1993.** Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. *Applied and environmental microbiology* 59 (5), 1318-1324.
- Abbaszadegan, M., Stewart, P. & LeChevallier, M. 1999.** A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. *Applied and environmental microbiology* 65 (2), 444-449.
- Adams, M.H. 1959.** Bacteriophages. *Interscience publishers: New york.*
- Agbalika, F., Hartemann, P. & Foliguet, J.M. 1984.** Trypsin-treated MA-104 : a sensitive cell line for isolating enteric viruses from environmental samples. *Applied Environmental Microbiology* 47, 378-380.
- Armon, R. & Kott, Y. 1996.** Bacteriophages as indicators of pollution. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 26 (4), 299-335.
- Arnal, C., Ferre-Aubineau, V., Besse, B. & Billaudel, S.S. 1998.** Simplified RT-PCR procedure with detection by microplate hybridization for routine screening of hepatitis A virus. *Can.J. Microbiol.*
- Atmar, R.L., Neill, F.H., Romalde, J.L., Le Guyader, F., Woodley, C.M., Metcalf, T.G. & Estes, M.K. 1995.** Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Applied Environmental Microbiology* 61, 3014-3018.
- Atmar, R.L. & Estes, M.K. 2001.** Diagnosis of nonculturable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. In *Clin. Microbiol. Rev.* Vol. 14, pp. 15-37.
- Balanant, J., Guillot, S., Candrea, A., Delpyroux, F. & Crainic, R. 1991.** The natural genomic variability of Poliovirus analyzed by a restriction fragment length polymorphism assay. *Virology* 184, 645-654.
- Beaudeau, P. & Bertin, L. 1999.** Etude in situ sur la pertinence des nouveaux indicateurs pour le classement de la qualité des eaux de baignade. 58 p.
- Beaulieux, F., See, D.M., Leparac-Goffar, t.I., Aymard, M. & Lina, B. 1996.** Use of magnetic beads versus guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform RNA extraction followed by polymerase chain reaction for rapid, sensitive detection of Enterovirus RNA. *Res Virology* 148, 11-15.
- Beuret, C., Kohler, D. & Lüthi, T. 2000.** Norwalk-like Virus Sequences Detected by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction in Mineral Waters Imported into or Bottled in Switzerland. *J Food Protect* 63 (11), 1576-1582.
- Bidawid, S., Farber, J.M. & Sattar, S.A. 2000.** Rapid concentration and detection of hepatitis A virus from lettuce and strawberries. *J. Virol. Methods* 88, 175-185.
- Block, J.C., Joret, J.C., Morlot, M. & Foliguet, J.M. 1978.** Recherche des Enterovirus dans les eaux superficielles par adsorption-élution sur microfibre de verre. *Tech. Sci. Munic. L'Eau* 73, 181.
- Boom, R., Sol, J.A., Salimans, M.M., Jansen, L., Wertheim-Van Dillen, P.M. & Van Der Norrdaa, J. 1990.** Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28, 459-503.
- Borrego, J.J., Morinigo, M.A., De Vicente, A., Cornax, R. & Romero, P. 1987.** Coliphages as an indicator of faecal pollution in water. Its relationship with indicator and pathogenic microorganisms. *Water Res* 21, 1473-1480.
- Bosch, A., Gajardo, R., Abad, X., Diez, J.M. & Jofre, J. 1991.** Concentration of hepatitis A virus in environmental samples. *Wat. Sci. Tech.* 24, 229-234.
- Bosch, A. 1998.** Human enteric viruses in the water environment: a minireview, *International Microbiology. The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology* 1 (3), 191-196.

### Question 3

- Bosch, A., Sanchez, G., Pinto, R.M., Abad, F.X., Pommepuy, M. & Le Guyader, F.S. 2003.** Methods for virus detection in molluscs. In *Validation and standardization. In "Molluscan Shellfish Safety"*. A. Villalba, B.R., J.L. Romalde, R. Beiras (Eds) (ed). Santiago de Compostela, Consellería de Pesca e Assuntos Marítimos da Xunta de Galicia & Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 333-340.
- Brown, C.M., Cann, J.W., Simons, G., Fankhauser, R.L., Thomas, W., Parashar, U.D. & Lewis, M.J. 2001.** Outbreak of Norwalk virus in a Caribbean island resort: application of molecular diagnostics to ascertain the vehicle of infection. *Epidemiol Infect*, 425-432.
- Bustin, S.A. 2000.** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Molecula Endocrinology* 25, 169-173.
- Caillou, S., Castagnaro, N. & Naval, M. 1998.** [Sewage sludges: application of a technique for recovering Enterovirus]. *Rev Argent Microbiol* 30 (2), 96-99.
- Calci, K.R., Burkhardt, W., Watkins, W.D. & Rippey, S.R. 1998.** Occurrence of male-specific bacteriophage in feral and domestic animal wastes, human feces, and human-associated wastewaters. *Applied Environmental Microbiology* 64, 5027-5029.
- Calder, L., Simmons, G., Thornley, C., Taylor, P., Pritchard, K., Greening, G. & Bishop, J. 2003.** An outbreak of hepatitis A associated with consumption of raw blueberries. *Epidemiol Infect* 131 (1), 745-751.
- Casas, N. & Sunen, E. 2001.** Detection of enterovirus and hepatitis A virus RNA in mussels (*Mytilus* spp.) by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Appl Microbiol* 90 (1), 89-95.
- Chandler, D.P., Wagnon, C.A. & Bolton Jr, H. 1998.** Reverse transcriptase (RT) inhibition of PCR at low concentrations of template and its implications for quantitative RT-PCR. *Applied Environmental Microbiology* 64, 669-677.
- Chapron, C.D., Ballester, N.A., Fontaine, J.H., Frades, C.N. & Margolin, A.B. 2000.** Detection of Astroviruses, Enteroviruses, and Adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Applied Environmental Microbiology* 66 (6), 2520-2525.
- Chen, C., Nur, R., Stahl, J.F., Horvath, R.W. & Kuo, J.F. 1993.** UV inactivation of bacteria and viruses in tertiary effluent. Water Environment Federation Speciality Conference. New Jersey. 23-25 mai.
- Chesler, P.G. & Jacangelo, J.G. 1993.** Comparison of MS2 bacteriophages inactivation by UV radiation and combined chlorine disinfection. Proceedings of the 66th annual water environment federation technical exposition and conference. Anaheim, California; 3 et 7 octobre.
- Cho, H.B., Lee, S.H., Cho, J.C. & Kim, S.J. 2000.** Detection of Adenoviruses and Enteroviruses in tap water and river water by reverse transcription multiplex PCR. *Can J Microbiol* 46 (5), 417-424.
- Chung, H., Jaykus, L.A., Lovelace, G. & Sobsey, M.D. 1998.** Bacteriophages and bacteria as indicators of enteric viruses in oysters and their harvest waters. *Wat. Sci. Tech.* 38, 37-44.
- Clover, D.O., Ellender, R.D. & Sobsey, M.D. 1983.** Methods to detect viruses in foods : testing and interpretation of results. *J. Food. Prot* 46, 345-357.
- Contreras-Coll, N., Lucena, F., Mooijman, K., Havelaar, A., Pierz, V., Boque, M., Gawler, A., Holler, C., Lambiri, M., Mirolo, G., Moreno, B., Niemi, M., Sommer, R., Valentin, B., Wiedenmann, A., Young, V. & Jofre, J. 2002.** Occurrence and levels of indicator bacteriophages in bathing waters throughout EuropeS. *Water Res* 36 (20), 4963-4974.
- Cornax, R., Morinigo, M.A., Balebona, M.C., Castro, D. & Borrego, J.J. 1991.** Significance of several bacteriophage groups as indicators of sewage pollution in marine water. *Water Res* 25, 673-678.
- Corwin, A.L., Khiem, H.B., Clayson, E.T., Pham, K.S., Vo, T.T., Vu, T.Y., Cao, T.T., Vaughn, D. & Merven, J.R. 1996.** A waterborne outbreak of hepatitis E virus transmission in southwestern Vietnam. *Am J Trop Med Hyg* 54 (6), 559-562.
- Croci, L., De Medici, D., Scalfaro, C., Fiore, A., Divizia, M., Donia, D., Cosentino, A.M., Moretti, P. & Costanti, G. 2000.** Determination of Enteroviruses, hepatitis A virus, bacteriophages and Escherichia coli in adriatic sea mussels. *J. Appl. Microbiol* 88, 293-298, 1521-1526.

- Cromeans, T.L., Nainan, O.V. & Margolis, S.H. 1997. Detection of hepatitis A virus in oyster meat. *Appl Env Microbiol* 63, 2460-2463.
- Cusi, M.G., Valassina, M. & Valensin, P.E. 1994. Comparison of M-MLV reverse transcriptase and Tth polymerase activity in RT-PCR of samples with low virus burden. *Biotech* 17 (6), 1034-1036.
- Daniels, N.A., Bergmire-Sweat, D.A., Schwab, K.J., Hendricks, K.A., Reddy, S., Rowe, S.M., Fankhauser, R.L., Monroe, S.S., Atmar, R.L., Glass, R.I. & Mead, P. 2000. A foodborne outbreak of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses: first molecular traceback to deli sandwiches contaminated during preparation. *J Infect Dis* 181 (4), 1467-1470.
- De Leon, R., Matsui, S.M., Baric, R.S., Herrmann, J.E., Blacklow, N.R., Greenberg, H.B. & Sobsey, M.D. 1992. Detection of Norwalk virus in stool specimens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nonradioactive oligoprobes. *J Clin Microbiol* 30, 3151-3157.
- Deng, M.I., Day, S.P. & Cliver, O. 1994. Detection of hepatitis A virus in environmental samples by antigen-capture PCR. *Applied Environmental Microbiology* 60, 1927-1933.
- Deshayes, F., Schmitt, M., Ledrans, M., Gourier-Frery, C. & De Valk, H. 2001. Pollution du réseau d'eau potable a Strasbourg et survenue concomitante de gastro-enterites - BEH 02/2001.
- Divizia, M., Ruscio, V., Degener, A.M. & Pana, A. 1998. Hepatitis A virus detection in wastewater by PCR and hybridization. *Microbiological research* 21, 161-167.
- Donaldson, K.A., Griffin, D.W. & Paul, J.H. 2002. Detection, quantitation and identification of Enteroviruses from surface waters and sponge tissue from the Florida Keys using real-time RT-PCR. *Water Res* 36, 2505-2514.
- Dubois, E., Agier, C., Traoré, O., Hennechart, C., Merle, G., Crucièrè, C. & Laveran, H. 2002. Modified concentration method for the detection of enteric viruses on fruits and vegetables by reverse transcriptase-polymerase chain reaction or cell culture. *J. Food Prot* 65, 1962-1969.
- Dubois, E., Hennechart, C., Deboosere, N., Merle, G., Legeay, O., Burger, C., Le Calve, M., Lombard, B., Ferre, V. & Traore, O. 2006. Intra-laboratory validation of a concentration method adapted for the enumeration of infectious F-specific RNA coliphage, enterovirus, and hepatitis A virus from inoculated leaves of salad vegetables. *Int J Food Microbiol* 108 (2), 164-171.
- Dutka, B.J., El-Shaarawi, A.H., Martins, M.T. & Sanchez, P.S. 1987. North and south American studies on the potential of coliphage as a water quality indicator. *Water Res* 21, 1127-1135.
- Enriquez, C.E., Husrt, C.J. & Gerba, C.P. 1995. Survival of the enteric Adenoviruses 40 and 41 in tap, sea, and wastewater. *Water Res* 29, 2548-2553.
- Farrah, S.R., Gerba, C.P., Wallis, C. & Melnick, J.L. 1976. Concentration of viruses from large volumes of tapwater using pleated membrane filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 31, 221-226.
- Feng, Y. & Xu, X. 1993. A new method of RNA preparation for detection of hepatitis A virus in environmental samples by polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 43, 77-84.
- Fogarty, J., Thornton, L., Hayes, C., Laffoy, M., O'Flanagan, D., Devlin, J. & Corcoran, R. 1985. Illness in a community associated with an episode of water contamination with sewage. *Epidemiol Infect* 114, 289-295.
- Formiga-Cruz, M., Allard, A.K., Conden-Hansson, A.C., Henshilwood, K., Hernroth, B.E., Jofre, J., Lees, D.N., Lucena, F., Papapetropoulou, M. & Rangdale, R.E. 2003. Evaluation of potential indicators of viral contamination in shellfish and their applicability to diverse geographical areas. *Appl. Env. Microb* 69 (3), 1556-1563.
- Gantzer, C., Maul, A., Audic, J.M. & Schwartzbrod, L. 1998. Detection of infectious Enteroviruses, Enterovirus genomes, somatic coliphages, and Bacteroides fragilis phages in treated wastewater. *Applied Environmental Microbiology* 64, 4307-4312.
- Gassilloud, B., Schwartzbrod, L. & Gantzer, C. 2003. Presence of viral genomes in mineral water: a sufficient condition to assume infectious risk? *Appl Environ Microbiol* 69 (7), 3965-3969.
- Genthe, B., Gericke, M., Bateman, B., Mjoli, N. & Kfir, R. 1995. Detection of enteric Adenovirus in South African waters using gene probes. *Water Sci Technol* 31, 345-350.

### Question 3

- Gilgen, M., Wegmuller, B., Burkhalter, P., Buhler, H.P., Muller, V., Luthy, J. & Candrian, V. 1995.** Reverse transcription PCR to detect Enteroviruses in surface water. *Applied Environmental Microbiology* 61, 1226-1231.
- Gilgen, M., Germann, D., Luthy, J. & Hubner, P. 1997.** Three step isolation method for sensitive detection of Enterovirus Rotavirus, hepatitis A virus and small round structured viruses in water samples. *Int J Food Microbiol* 37, 189-199.
- Girish, R., Broor, S., Dar, L. & Ghosh, D. 2002.** Foodborne outbreak caused by a Norwalk-like virus in India. *J Med Virol* 67 (4), 603-607.
- Gofti-Laroche, L., Gratacap-Cavallier, B., Genoulaz, O., Joret, J.C., Hartemann, P., Seigneurin, J.M. & Zmirou, D. 2001.** A new analytical tool to assess health risks associated with the virological quality of drinking water (EMIRA study). *Water Sci Technol* 43 (12), 39-48.
- Goswami, B.B., Kulka, M., Ngo, D., Istafanos, P. & Cebula, T.A. 2002.** A polymerase chain reaction-based method for the detection of hepatitis A virus in produce and shellfish. *J Food Protect* 65 (2), 393-402.
- Grabow, W.O., Botma, K.L., De Villiers, J.C., Clay, C.G. & Erasmus, B. 1999.** Assessment of cell culture and polymerase chain reaction procedures for the detection of Poliovirus in wastewater. *Bull World Health Organ* 77 (12), 973-980.
- Grabow, W.O.K., Puttergill, D.L. & Bosch, A. 1992.** Propagation of Adenovirus types 40 and 41 in the PLC/PRF/5 primary liver carcinoma cell line. *J Virol Methods* 37 (2), 201-207.
- Grabow, W.O.K., Puttergill, D.L. & Bosch, A. 1993.** Plaque assay for Adenovirus type 41 using the PLC/PRF/5 liver cell line. *Water Sci Technol* 27, 321-327.
- Grabow, W.O.K., Neubrech, T.E., Holtzhausen, C.S. & Jofre, J. 1995.** Bacteroides fragilis and E. coli bacteriophages: excretion by humans and animals. *Water Res* 31, 223-230.
- Grabow, W.O.K., Taylor, M.B. & J.C., d.V. 2001.** New methods for the detection of viruses: call for review of drinking water quality guidelines. *Water Sci Technol* 43 (12), 1-8.
- Graff, J., Ticehurst, J. & Flehmig, B. 1993.** Detection of hepatitis A virus in sewage sludge by antigen capture PCR. *Applied Environmental Microbiology* 59, 3165-3170.
- Gratacap-Cavallier, B., Genoulaz, O., Brengel-Pesce, K., Soule, H., Innocenti-Francillard, P., Bost, M., Gofti, L., Zmirou, D. & Seigneurin, J.M. 2000.** Detection of human and animal Rotavirus sequences in drinking water. *Applied Environmental Microbiology* 66 (6), 2690-2692.
- Green, J., Henshilwood, K., Gallimore, C.I., Brown, D.W.G. & Lees, D.N. 1998.** A nested transcriptase PCR Assay for detection of small round-structured viruses in environmentally contaminated molluscan shellfish. *Applied Environmental Microbiology* 64, 858-863.
- Greening, G.E., Mirams, M. & Berke, T. 2001.** Molecular epidemiology of 'Norwalk-like viruses' associated with gastroenteritis outbreaks in New Zealand. *J Med Virol* 64 (1), 58-66.
- Grimm, A.C. & Shay, G.F. 2002.** Development of a molecular method to identify hepatitis E virus in water. *J Virol Methods* 101 (1-2), 175-188.
- Gulati, R., B., Allwood, P.B., Hedberg, C.W. & Goyal, S.M. 2001.** Efficacy of commonly used disinfectants for the inactivation of calicivirus on strawberry, lettuce, and a food-contact surface. *J. Food. Prot* 64, 1430-1434.
- Häfliger, D., Gilgen, M., Luthy, J. & Hubner, P. 1997.** Seminested RT-PCR systems for small round structured viruses and detection of enteric viruses in seafood. *Int J Food Microbiol* 37, 27-36.
- Häfliger, D., Hubner, P. & Luthy, J. 2000.** Outbreak of viral gastroenteritis due to sewage-contaminated drinking water. *Int J Food Microbiol* 54, 123-126.
- Hajenian, H.G. & Butler, M. 1980.** Inactivation of viruses in municipal effluent by chlorine. *J. Hyg. Camb.*, 8463-8469.
- Hale, A.D., Green, J. & Brown, D.W.G. 1996.** Comparison of four RNA extraction methods for the detection of small round structured viruses in faecal specimens. *J Virol Methods* 57, 195-201.
- Harakeh, M. & Butler, M. 1984.** Inactivation of human rotavirus SA11 and other enteric viruses in effluent by disinfectants. *J. Hyg. Camb.* 93, 157-163.

- Haramoto, E., Hiroyuki, K. & Shinichiro, O. 2004.** Detection of Noroviruses in tap water in Japan by means of a new method for concentrating enteric viruses in large volumes of freshwater. *Appl. Env. Microb* 70 (4), 2154-2160.
- Havelaar, A.H., Hogeboom, W.M. & Pot, R. 1984a.** F Specific RNA bacteriophages in sewage : methodology and occurrence. *Wat. Sci. Technol.* 17, 645-655.
- Havelaar, A.H., Hogeboom, W.M. & Pot, R. 1984b.** F Specific RNA bacteriophages in sewage : methodology and occurrence. *Wat. Sci. Technol.* 17 (4-5), 645-655.
- Havelaar, A.H. & Nieuwstad, T.J. 1985.** Bacteriophages and fecal bacteria as indicators of chlorination efficiency of biologically treated wastewater. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 571084-571088.
- Havelaar, A.H. 1987.** Bacteriophages as model organisms in water treatment. *Microbiol. Sci.* 4, 362-364.
- Havelaar, A.H., Meulemans, C.C.E., Pot-Hogeboom, W.M. & Koster, J. 1990.** Biological Calibration of Monochromatic Ultraviolet Sources Using F-Specific Bacteriophage MS2. *Water Res.* 24, 1387-1393.
- Havelaar, A.H. 1993.** A bacteriophage standard for bathing waters. Final report. European contract B4-3040/92/012609.
- Havelaar, A.H., Van Olphen, M. & Drost, Y.C. 1993.** F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Applied Environmental Microbiology* 59, 2956-2962.
- Hernández, F., Monge, R., Jiménez, C. & Taylor, L. 1997.** Rotavirus and hepatitis A virus in market lettuce (*Latuca sativa*) in Costa Rica. *Int. J. Food Microbiol* 37, 221-223.
- Hoyt, J.L. & Margolin, A.B. 2000.** Fortified sera and their use in environmental virology. *Applied Environmental Microbiology* 66 (5), 2259-2262.
- Hsu, F.C., Shieh, Y.S., van Duin, J., Beekwilder, M.J. & Sobsey, M.D. 1995.** Genotyping male-specific RNA coliphages by hybridization with oligonucleotide probes. *Applied Environmental Microbiology* 61, 3960-3966.
- Huang, P.W., Laborde, D., Land, V.R., Matson, D.O., Smith, A.W. & Jiang, X. 2000.** Concentration and detection of Caliciviruses in water samples by reverse transcription-PCR. *Applied Environmental Microbiology* 66 (10), 4383-4388.
- Hugues, B., André, M. & Champsaur, M. 1991.** Glass wool versus glass powder adsorption method, Biomedical Letters préprint L1128 gracieusement communiqué en Avril 1991.
- IAWPRC 1991a.** Study Group on Health Related Water Microbiology. *Water Res.* 25 (5), 529.
- IAWPRC , S.G.o.H.R.W.M. 1991b.** Bacteriophages as model of viruses in water quality control. *Water Res* 25, 529-545.
- Ijzerman, n.M.M., Dahling, D.R. & Fout, G.S. 1997.** A method to remove environmental inhibitors prior to the detection of waterborne enteric viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 63 (1-2), 145-153.
- Irving, L.G. & Smith, F.A. 1981.** One year survey of Enteroviruses, Adenoviruses and Reoviruses isolated from effluent at an activated sludge purification plant. *Applied Environmental Microbiology* 41, 51-59.
- Jaykus, L.A., De Leon, R. & Sobsey, M. 1996.** A virion concentration method for detection of human enteric viruses in oysters by PCR and oligoprobe hybridization. *Applied Environmental Microbiology* 62, 2074-2080.
- Jiang, S., Noble, R. & Chu, W. 2001.** Human Adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California. *Applied Environmental Microbiology* 67 (1), 179-184.
- Jofre, J., Bosch, A., Lucena, F., Gironès, R. & Tartera, C. 1986.** Evaluation of *Bacteroides fragilis* bacteriophages as indicators of the virological quality of water. *Water Sci Technol* 18, 167-173.
- Jofre, J., Blasi, M., Bosch, A. & Lucena, F. 1989.** occurrence of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* and other viruses in polluted marine sediments. *Water Sci Technol* 21, 15-19.
- Jolis, D. 2002.** The effect of storage and lag time on MS2 Bacteriophage susceptibility to UV radiation. *Water Environ. Res.* 74 (6), 516-520.

### Question 3

- Jothikumar, N., Cliver, D.O. & Tadesse, W.M. 1998. Immunomagnetic capture PCR for rapid concentration and detection of hepatitis A virus from environmental samples. *Applied Environmental Microbiology* 64, 504-508.
- Jothikumar, N., Paulmurugan, R., Padmanabhan, P., Sundari, R.B., Kamatchiammal, S. & Rao, K.S. 2000. Duplex RT-PCR for simultaneous detection of hepatitis A and hepatitis E virus isolated from drinking water samples, *J Environ Monitoring: JEM*, 2 (6), 587-590.
- Katayama, H., Shimasaki, A. & Ohgaki, S. 2002. Development of a virus concentration method and its application to detection of Enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. *Applied Environmental Microbiology* 68 (3), 1033-1039.
- Katzenelson, E., Fattal, B. & Hostovesky, T. 1976. Organic flocculation: an efficient second step concentration method for the detection of viruses in tap water. *Appl. Environ. Microbiol* 32, 638-639.
- Keswick, B.H., Gerba, C.P., Dupont, H.L. & Rose, J.B. 1984. Detection of Enteric viruses in treated drinking water. *Applied Environmental Microbiology* 47, 1290-1294.
- Kingsley, D.H. & Richards, G.P. 2001. Rapid and efficient extraction method for reverse transcription-PCR detection of hepatitis A and Norwalk-like viruses in shellfish. *Applied Environmental Microbiology* 67 (9), 4152-4157.
- Kingsley, D.H., Meade, G.K. & Richards, G.P. 2002. Detection of both Hepatitis A Virus and Norwalk-Like Virus in Imported Clams Associated with Food-Borne Illness. *Applied Environmental Microbiology* 68 (8), 3914-3918.
- Kitamura, N., Semler, B.L., Rothberg, P.G., Larsen, G.R., Adler, J., Dorner, A., Emini, E., Hanecak, R., Lee, J., Van Der Werf, S., Anderson, C. & Wimmer, E. 1981. Primary structure, gene organization and polypeptide expression of Poliovirus RNA. *Nature* 291, 547-553.
- Kittigul, L., Raengsakulrach, B., Siritantikorn, S., Kanyok, R., Utrarachkij, F., Diraphat, P., Thirawuth, V., Siripanichgon, K. & Pungchitton, S. 2000. Detection of Poliovirus, hepatitis A virus and Rotavirus from sewage and water samples. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 31 (1), 41-46.
- Kopecka, H.S., Dubrou, J., Prevot, J., Marechal. & Lopez-Pila, J.M. 1993. Detection of naturally occurring Enteroviruses in waters by reverse transcription, polymerase chain reaction, and hybridization. *Appl Environ Microb* 59, 1213-1219.
- Kott, Y. 1966. Estimation of low numbers of Escherichia coli bacteriophage by use of the most probably number method. *Applied Environmental Microbiology* 14, 141-144.
- Kott, Y., Roze, N., Sperber, S. & Betzer, N. 1974. Bacteriophages as viral pollution indicators. *Water Res* 8, 165-171.
- Kott, Y., Ben-Ari, H. & Vinokur, L. 1978. Coliphages survival as viral indicator in various wastewater quality effluents. *Prog. Water Technol* 10, 337-346.
- Kott, Y. 1981. Viruses and bacteriophages. *Sci. Total. Environ* 18, 13-23.
- Kreader, C.A. 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied Environmental Microbiology* 62, 1102-1106.
- Lamothe, G.T., Putallaz, T., Joosten, H. & Marugg, J.D. 2003. Reverse transcription-PCR analysis of bottled and natural mineral waters for the presence of noroviruses. *Appl Environ Microbiol* 69 (11), 6541-6549.
- Lappalainen, M., Chen, R.W., Maunula, L., von Bonsdorff, f.C.H., Plyusnin, A. & Vaheri, A. 2001. Molecular epidemiology of viral pathogens and tracing of transmission routes: hepatitis-, calici- and hantaviruses. *J Clin Virol* 21 (3), 177-185.
- Lasobras, J., Dellunde, J., Joffre, J. & Lucena, F. 1999. Occurrence and levels of phages proposed as surrogate indicators of enteric viruses in different types of sludges. *J Appl Microbiol* 86, 723-729.
- Le Guyader, F.S., Schultz, A.C., Haugarreau, L., Croci, L., Maunula, L., Duizer, E., Lodder-Verschoor, F., Von Bonsdorff, C.H., Suffredini, E., Van der Poel, W.M., Reymundo, R. & Koopmans, M. 2004. Round-robin comparison of methods for the detection of human enteric viruses in lettuce. *J. Food Prot* 67, 2315-2319.
- Le Guyader, F., Neil, F.H., Estes, M.K., Monroe, S.S., Ando, T. & Atmar, R.L. 1996. Detection and analysis of small round-structured virus strain in oysters implicated in an outbreak of acute gastro-entérites. *Applied Environmental Microbiology* 62 (11), 4268-4272.

- Le Guyader, F., Neill, F.H., Dubois, E., Bon, F., Loisy, F., Kohli, E., Pommepuy, M. & Atmar, R. 2003.** A semiquantitative approach to estimate Norwalk-like virus contamination of oysters implicated in an outbreak, *Intern. J. Food Microb* 87, 107-112.
- Leary, T.P., Erker, J.C., Chalmers, M.L., Wetzel, J.D., Desai, S.M., Mushahwar, I.K. & Dermody, T.S. 2002.** Detection of Reovirus by reverse transcription-polymerase chain reaction using primers corresponding to conserved regions of the viral L1 genome segment. *J Virol Methods* 104 (2), 161-165.
- Leclerc, H., Edberg, S., Pierzo, V. & Delattre, J.M. 2000.** Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwater. *J Appl Microbiol* 88, 5-21.
- Lee, J.V., Dawson, S.R., Ward, S., Surman, S.B. & Neal, K.R. 1997.** Bacteriophages are a better indicator of illness rates than bacteria amongst users of a white water course fed by a lowland river. *Water Sci Technol* 35, 165-170.
- Lee, S.H. & Kim, S.J. 2002.** Detection of infectious Enteroviruses and Adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. *Water Res* 36, 248-256.
- Legeay, O., Caudrelier, Y., Cordevant, C., Rigottier-Gois, L. & Lange, M. 2000.** Simplified procedure for detection of enteric pathogenic viruses in shellfish by RT-PCR. *J Virol Methods* 90 (1), 1-14.
- Leggitt, P. R. & Jaykus, L.A. 2000.** Detection methods for human enteric viruses in representative foods. *J. Food. Prot* 63, 1738-1744.
- Leutenegger, C.M., Mislin, C.N., Sigrist, B., Ehrenguber, M.U., Hofmann-Lehmann, R. & Lutz, H. 1999.** Quantitative real-time PCR for the measurement of feline cytokine mRNA. *Vet. Immunol. Immunopathol* 30 (71), 291-305.
- Lewis, G.D., Molloy, S.L., Greening, G.E. & Dawson, J. 2000.** Influence of environmental factors on virus detection by RT-PCR and cell culture. *J Appl Microbiol* 88 (4), 633-640.
- Lindberg, A.M. & Andersson, A. 1999.** Purification of full-length Enterovirus cDNA by solid phase hybridization capture facilitates amplification of complete genomes. *J Virol Methods* 77 (2), 131-137.
- Loge, F.J., Thompson, D.E. & Call, D.R. 2002.** PCR detection of specific pathogens in water: a risk-based analysis. *Environ Sci Technol* 36 (12), 2754-2759.
- Loisy, F., Le Cann, P. & Pommepuy, M. 2000.** An improved method for the detection of Norwalk-like caliciviruses in environmental samples. *Let. Appl. Microbiol* 31, 411-415.
- Loisy, F., Atmar, R.L., Guillon, P., Le Cann, P., Pommepuy, M. & Le Guyader, F.S. 2005.** Real-time RT-PCR for Norovirus screening in shellfish. *J. Virol. Methods* 123, 1-7.
- Lopez-Pila, J.M. & Szewzyk, R. 2000.** Estimating the infection risk in recreational waters from the faecal indicator concentration and from the ratio between pathogens and indicators. *Water Res* 34, 4195-4200.
- Lucena, F., Araujo, R. & Jofre, J. 1996.** Usefulness of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* as index microorganisms of remote faecal pollution. *Water Res* 30, 2812-2816.
- Ma, J.F., Naranjo, J. & Gerba, C.P. 1994a.** Evaluation of Mk filters for recovery of Enteroviruses from tap water. *App. Environ. Microbiol* 60, 1974-1977.
- Ma, J.F., Straub, T.M., Pepper, I.L. & Gerba, C.P. 1994b.** Cell culture and PCR determination of Poliovirus, inactivation by disinfectants. *App. Environ. Microbiol* 60, 4203-4206.
- Mackey, E.D. 2000.** UV Disinfection Systems for the Inactivation of Cryptosporidium Evaluating Practical Implementation Issues. AWWA Ann. Conf. Denver.
- Maier, A., Tougianidou, D., W. & Botzenhart, K. 1995.** Detection of poliovirus by cell culture and by PCR after UV disinfection. *Wat. Sci. Tech.* 31 (5-6), 141-145.
- Marx, F.E., Taylor, M.B. & Grabow, W.O.K. 1998.** The application of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction-oligonucleotide probe assay for the detection of human Astroviruses in environmental water. *Water Res* 32, 2147-2153.
- Mehnert, D.U. & Stewien, K.E. 1993.** Detection and distribution of rotavirus in raw sewage and creeks in Sao Paulo, Brazil. *Appl. Environ. Microbiol* 59, 140-143.

### Question 3

Melnick, J.L., Safferman, R., Rao, C., Goyal, S., Berg, G., Dahling, R., Wraght, B.A., Akin, E., Stetler, R., Sorber, C., B., M., Sobsey, M.D., Moore, R., Lewis, A. & F, M. 1984. Round robin investigation of methods for the recovery of Poliovirus from drinking water. *Appl. Environ. Microbiol* 47, 144-150.

Meng, S.Q. & Gerba, C.P. 1996. Comparative inactivation of enteric Adenoviruses, Poliovirus and coliphages by ultraviolet irradiation. *Water Res* 30, 2665-2668.

Metcalfe, T.G., Melnick, J.L. & Estes, M.K. 1995. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology--a trip of over 50 years. *Annu Rev Microbiol* 49, 461-487.

Monceyron, C. & Grinde, B. 1994. Detection of hepatitis A virus in clinical and environmental samples by immunomagnetic separation and PCR. *J Virol Methods* 46, 157-166.

Monpoeho, S., Deh e, A., Mignotte, B., Schwartzbrod, L., Marechal, V., Nicolas, J.C., Billaudel, S. & Ferr e, V. 2000. Quantification of Enterovirus RNA in sludge samples using single tube real-time RT-PCR. *BioTechniques* 29, 88-93.

Morace, G., Aulicino, F.A., Angelozzi, C., Costanzo, L., Donadio, F. & Rapicetta, M. 2002. Microbial quality of wastewater: detection of hepatitis A virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Appl Microbiol* 92 (5), 828-836.

Morinigo, M.A., Wheeler, D., Berry, C., Jones, C., Munoz, M.A., Cornax, R. & Borrego, J.J. 1992. Evaluation of different bacteriophages groups as faecal indicators in contaminated natural waters in southern England. *Water Res* 26, 263-271.

Mullendore, J.L., Sobsey, M.D. & Shieh, Y.C. 2001. Improved method for the recovery of hepatitis A virus from oysters. *J Virol Methods* 94 (1-2), 25-35.

Muniain-Mujika, I., Calvo, M., Lucena, F. & Girones, R. 2003. Comparative analysis of viral pathogens and potential indicators in shellfish. *Intern. J. Food Microbiol* 83, 75-85.

Muscillo, M., Carducci, A., La Rosa, G., Cantiani, L. & Marianelli, C. 1997. Enteric virus detection in Adriatic seawater by cell culture, polymerase chain reaction and polyacrylamide gel electrophoresis. *Water Res* 31 (8), 1980-1984.

Muscillo, M., La Rosa, G., Marianelli, C., Zaniratti, S., Capobianchi, M.R., Cantiani, L. & Carducci, A. 2001. A new RT-PCR method for the identification of Reoviruses in seawater samples. *Water Res* 35 (2), 548-556.

Myrmel, M., Berg, E.M., Rimstad, E. & Grinde, B. 2004. Detection of enteric viruses in shellfish from the Norwegian coast. *Appl. Env. Microb* 70 (5), 2678-2684.

Nasser, A., Weinberg, D., Dinoor, N., Fattal, B. & Adin 1995. Removal of hepatitis A virus (HAV), poliovirus and MS-2 coliphage by coagulation and high rate filtration. *Water Sci Technol* 31 (5-6), 63-68.

Nasser, A.M. & Oman, S.D. 1999. Quantitative assessment of inactivation of pathogenic and indicator viruses in natural water sources. *Water Res* 33, 1748-1752.

Niesters, H.G. 2004. Molecular and diagnostic clinical virology in real time. *Clin Microbiol Infect* 10 (1), 5-11.

Nieuwstad, T.J., Havelaar, A.H. & Van Olphen, M. 1991. Hydraulic and Microbial Characterization of Reactors for Ultraviolet Disinfection of Secondary Wastewater Effluent. *Wat. Res.* 25, 775-783.

Nishida, T., Kimura, H., Saitoh, M., Shinohara, M., Kato, M., Fukuda, S., Munemura, T., Mikami, T., Kawamoto, A., Akiyama, M., Kato, Y., Nishi, K., Kozawa, K. & Nishio, O. 2003. Detection, quantitation and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters. *Appl. Environ. Microbiol* 69 (10), 5782-5786.

Nuanualsuwan, S. & Cliver, D.O. 2002. Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. *J Virol Methods* 104 (2), 217-225.

Nuanualsuwan, S. & Cliver, D.O. 2003. Infectivity of RNA from inactivated Poliovirus. *App. Environ. Microb* 69 (3), 1629-1632.

Oberste, M.S., Maher, K., Kilpatrick, D.R., Flemister, M.R., Brown, B.A. & Pallansch, M.A. 1999. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol* 37 (5), 1288-1293.

O'Keefe, B. & Green, J. 1989. Coliphages as indicators of faecal pollution at three recreational beaches on the Firth of Forth. *Water Res* 23, 1027-1030.

- Oron, G., Goemans, M., Manor, Y. & Feyen, J. 1995.** Poliovirus distribution in the soil-plant system under reuse of secondary wastewater. *Wat. Res.* 29, 1069-1078.
- Payment, P., Trudel, M. & Plante, R. 1985.** Elimination of viruses and indicator bacteria at each step of treatment during preparation of drinking water at seven water treatment plants. *Applied Environmental Microbiology* 49, 1418-1428.
- Payment, P., Fortin, S. & Trudel, M. 1986.** Elimination of human Enteric viruses during conventional wastewater treatment by activated sludge. *Can J Microbiol* 32, 922-925.
- Petrovicova, A., Simkova, A. & Cervenka, J. 1988.** Enteroviruses and coliphage in different water ecosystems. *Z. gesamte Hyg* 34, 522-523.
- 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 Microb* 64, 3376-3382.
- Pina, S., Buti, M., Jardí, R., Clemente-Casares, P., Jofre, J. & Girones, R. 2001.** Genetic analysis of hepatitis A virus strains recovered from the environment and from patients with acute hepatitis. *The Journal of General Virology* 82 (12), 2955-2963.
- Pinto, R.M., Abad, F.X., Gayardo, R. & Bosh, A. 1996.** Detection of infectious Astroviruses in water. *Applied Environmental Microbiology* 62, 3073-3077.
- Pommepuy, M., Le Guyader, F., Cohen, J., Bosch, A., van Pelt-Heerschap, H., van der Poel, W., Svensson, L., Atmar, R., Estes, M. & Brest, G. 2003.** Virus Safe Seafood Final report, (contrat N° QLK1-CT-1999-00634). 51 p.
- Powell, T., Brion, G.M., Jagtoyen, M. & Derbyshire, F. 2000.** Investigating the effect of carbon shape on virus adsorption. *Environ. Sci. Technol.* 34, 2779-2783.
- Prevot, J., Dubrou, S. & Marechal, J. 1993.** Detection of human hepatitis A virus in environmental water by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Water Sci Technol* 27, 227-234.
- Prüss, A. 1998.** Review of epidemiological studies on health effects from exposure to recreational water. *Int J Epidemiol* 27, 1-9.
- Puig, M., Jofre, J., Lucena, F., Allard, A., Wadell, G. & Girones, R. 1994.** Detection of Adenoviruses and Enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Applied Environmental Microbiology* 60, 2963-2970.
- Qualls, R.G. & Johnson, J.D. 1983.** Bioassay and Dose Measurement in UV Disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 872-877.
- Queiroz, A.P., Santos, F.M., Sassaroli, A., Hársi, C.M., Monezi, T.A. & Mehnert, D.U. 2001.** Electropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples. *Applied Environmental Microbiology* 67 (10), 4614-4618.
- Rao, V.C., Symons, J.M., Ling, A., Wang, P., Metcalf, T.G., Hoff, J.C. & Melnick, J.L. 1988.** Removal of Hepatitis A Virus and Rotavirus by drinking water treatment. *JAWWA*, 59-67.
- Regan, P.M. & Margolin, A.B. 1997.** Development of a nucleic acid capture probe with reverse transcriptase-polymerase chain reaction to detect Poliovirus in groundwater. *J Virol Methods* 64, 65-72.
- Reynolds, K.A., Gerba, C.P. & Pepper, I.L. 1996.** Detection of infectious Enteroviruses by an integrated cell culture-PCR procedure. *Applied Environmental Microbiology* 62, 1424-1427.
- Reynolds, K.A., Gerba, C.P., Abbaszadegan, M. & Pepper, L.L. 2001.** ICC/PCR detection of Enteroviruses and hepatitis A virus in environmental samples. *Can J Microbiol* 47 (2), 153-157.
- Robertson, B.H., Jansen, R.W., Khanna, B., Totsuka, A., Nainan, O.V., Siegl, G., Widell, A., Margolis, H.S., Isomura, S., Ito, K. & et al. 1992.** Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol* 73 (Pt 6), 1365-1377.
- Rotbart, H.A. 1990.** Enzymatic RNA amplification of the Enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.* 28 (3), 438-442.
- Sair, A., D'Souza, D.H., Moe, C.L. & Jaykus, L. 2002.** Improved detection of human enteric viruses in foods by RT-PCR. *J Virol Methods* 100, 57-69.

### Question 3

**Sarrette, B.A., Danglot, C.D. & Vilaginès, R. 1977.** A new and simple method for recuperation of Enteroviruses from water. *Water Res.* 11, 355-358.

**Schaper, M. & Jofre, J. 2000.** Comparison of methods for detecting genotypes of F-specific RNA bacteriophages and fingerprinting the origin of faecal pollution in water samples. *J Virol Methods* 89, 1-10.

**Schaper, M., Jofre, J., Uys, M. & Grabow, W.O.K. 2002.** Distribution of genotypes of F-specific RNA bacteriophages in human and non-human sources of faecal pollution in South Africa and Spain. *J Appl Microbiol* 92, 657-667.

**Schvoerer, E., Bonnet, F., Dubois, V., Cazaux, G., Serceau, R., Fleury, H.J. & Lafon, M.E. 2000.** PCR detection of human enteric viruses in bathing areas, waste waters and human stools in Southwestern France. *Res Microbiol* 151 (8), 693-701.

**Schvoerer, E., Ventura, M., Dubos, O., Cazaux, G., Serceau, R., Gournier, N., Dubois, V., Caminade, P., Fleury, H.J.A. & Lafon, M.E. 2001.** Qualitative and quantitative molecular detection of Enteroviruses in water from bathing areas and from a sewage treatment plant. *Res Microbiol* 152, 179-186.

**Schwab, K.J., De Leon, R. & Sobsey, M.D. 1996.** Immunoaffinity concentration and purification of waterborne enteric viruses for detection by reverse transcriptase PCR. *Applied Environmental Microbiology* 62, 2086-2094.

**Schwab, K.J., Neill, F.H., Le Guyader, F., Estes, M.K. & Atmar, R.L. 2001.** Development of a reverse transcription-PCR-DNA enzyme immunoassay for detection of "norwalk-like" viruses and hepatitis A virus in stool and shellfish. *Appl. Environ. Microbiol* 67 (2), 742-749.

**Schwartz, K., Hansen-Gagge, T. & Bertram, C. 1990.** Improved yields of long PCR products using gene 32 protein. *Nucleic Acids Res* 18, 1079.

**Schwartzbrod, L. & Lucena-Gutierrez, F. 1978.** Concentration des Enterovirus dans les eaux par adsorption sur poudre de verre: proposition d'un appareillage simplifié. *Microbia* 4, 55-58.

**Schwartzbrod, L., Vilaginès, P., Schwartzbrod, J., Sarrette, B., Vilaginès, R. & Collomb, J. 1985.** Evaluation of the viral population in two wastewater treatment plants, study by different sampling techniques. *Water Res* 11, 1353-1356.

**Schwartzbrod, L. & Bosch, A. 1991.** Principes généraux de mise en évidence des virus *du milieu hydrique*. In *Virologie des milieux hydriques*. Lavoisier, S.L.e.T.e.D. (ed). Paris.

**Schwartzbrod, L. & Gantzer, C. 1996.** virus - eau - produits végétaux et coquillages, Actualités en microbiologie des aliments. *Coll. Soc. Microbiol./Alim* 10, 113-117.

**Shan, S., Desslberger, U. & Mckee, T.A. 1997.** The development of an antigen capture polymerase chain reaction assay to detect and type human Enteroviruses. *J Virol Methods* 65, 139-144.

**Shieh, Y.C., Baric, R.S., Woods, J.W. & Calci, K.R. 2003.** Molecular surveillance of enterovirus and norwalk-like virus in oysters relocated to a municipal-sewage-impacted gulf estuary. *Appl Environ Microbiol* 69 (12), 7130-7136.

**Shieh, Y.S., Wait, D., Tai, L. & Sobsey, M.D. 1995.** Methods to remove inhibitors in sewage and other fecal wastes for Enterovirus detection by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 54 (1), 51-66.

**Shieh, Y.S., Baric, R.S. & Sobsey, M.D. 1997.** Detection of low levels of enteric viruses in metropolitan and airplane sewage. *Applied Environmental Microbiology* 63, 4401-4407.

**Simkova, A. & Cervenka, J. 1981.** Coliphages as ecological indicators of Enteroviruses in various water systems. *Bull. WHO* 59, 611-618.

**Sinton, L.W., Hall, C.H., Lynch, P.A. & Davies-Colley, R.J. 2002.** Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters. *Applied Environmental Microbiology* 68 (3), 1122-1131.

**Skraber, S., Gantzer, C., Maul, A. & Schwartzbrod, L. 2002.** Fate of bacteriophages and bacterial indicators in river water. *Water Res* 36, 3621-3629.

**Sobsey, M.D. & Jones, B.L. 1979.** Concentration of Poliovirus from tap water using positively charged microporous filters. *Appl. Environ. Microbiol* 26, 529-534.

**Sobsey, M.D., Dean, C.H., Knuckles, M.E. & Wagner, R.A. 1980.** Interactions and survival of enteric viruses in soil materials. *Applied Environmental Microbiology* 40, 92-101.

**Sobsey, M.D. & Glass, J.S. 1980.** Poliovirus concentration from tap water with electropositive adsorbent filters. *Appl. Environ. Microbiol* 40, 201-210.

**Sobsey, M.D., Fuji, T. & Shields, P.A. 1988.** Inactivation of hepatitis A virus and model viruses in water by free chlorine and monochloramine. *Water Sci. Technol.* 20, 385-391.

**Sobsey, M.D., Battigelli, D.A., Shin, G.A. & Newland, S. 1998.** RT-PCR amplification detects inactivated viruses in water and wastewater. *Water Sci Technol* 38, 91-94.

**Soule, H., Genoulaz, O., Gratacap-Cavallier, B., Chevallier, P., Liu, J.X. & Seigneurin, J.M. 2000.** Ultrafiltration and reverse transcription-polymerase chain reaction: an efficient process for Poliovirus, Rotavirus and hepatitis. *A virus detection in water* 34 (3), 1063-1067.

**Spinner, M.L. & Di Giovanni, G.D. 2001.** Detection and identification of mammalian Reoviruses in surface water by combined cell culture and reverse transcription-PCR. *Applied Environmental Microbiology* 67 (7), 3016-3020.

**Stetler, R.E., Ward, R.L. & Waltrip, S.C. 1983.** Enteric virus and indicator bacteria levels in water treatment system modified to reduce trihalomethane production. *Applied Environmental Microbiology* 47, 319-324.

**Straub, T.M., Pepper, I.L. & Gerba, C.P. 1994.** Detection of naturally occurring Enteroviruses and hepatitis A virus in undigested and anaerobically digested sludge using PCR. *Can J Microbiol* 40, 884-888.

**Straub, T.M., Pepper, I.L. & Gerba, C.P. 1995.** Removal of PCR inhibiting substances in sewage sludge amended soil. *Water Sci Technol* 31, 311-315.

**Sunen, E., Casas, N., Moreno, B. & Zigorraga, C. 2004.** Comparison of two methods for the detection of hepatitis A virus in clam samples (*Tapes* spp.) by reverse transcription-nested PCR. *Int J Food Microbiol* 91 (2), 147-154.

**Tani, N., Dohi, Y., Kurumatani, N. & Yonemasu, K. 1995.** Seasonal distribution of Adenoviruses, Enteroviruses and Reoviruses in urban river water. *Microbiol Immunol* 39, 577-580.

**Tartera, C. & Jofre, J. 1987.** Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage-polluted waters. *Applied Environmental Microbiology* 53, 1632-1637.

**Taylor, M.B., Grabow, W.O.K. & Cubitt, W.D. 1997.** Propagation of human Astrovirus in the PLC/PRF/5 hepatoma cell line. *J Virol Methods* 67 (1), 13-18.

**Taylor, M.B., Cox, N., Vrey, M.A. & Grabow, W.O.K. 2001.** The occurrence of hepatitis A and Astroviruses in selected river and dam waters in South Africa. *Water Res* 35 (11), 2653-2660.

**Tsai, Y.L. & Olson, B.H. 1992.** Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl Environ Microb* 58, 2292-2295.

**Tsai, Y.-L., Tran, B. & Palmer, C.J. 1995.** Analysis of viral RNA persistence in seawater by reverse transcriptase-PCR. *Appl. Environ. Microbiol* 61, 363-366.

**Tyrrell, S.A., Rippey, S.R. & Watkins, W.D. 1995.** Inactivation of bacterial and viral indicators in secondary sewage effluents, using chlorine and ozone. *Wat. Res.*, 292483-292490.

**Van Asperen, I.A., Medema, G., Borgdorff, M.W., Sprenger, M.J. & Havelaar, H.A. 1998.** Risk of gastroenteritis among triathletes in relation to faecal pollution of fresh waters. *Int. J. Epidemiol* 27 (2), 309-315.

**Vaughn, J.M., Chen, Y.S., Novotny, J.F. & Strout, D. 1990.** Effects of ozone treatment on the infectivity of hepatitis A virus. *Can J. Microbiol.* 36 (557-560).

**Vilagines, P., Sarrette, B., Le Guyader, M., Cun, C. & Vilagines, R. 1997.** Relationship between cultivable viruses, F-specific RNA phages and the principal fecal bacterial indicators in raw waters, treated wastewaters and surface water. *Eur J Water Qual* 28, 201-222.

**Vilaginès, P., Sarrette, E.B., Danglo, t.C. & Vilaginès, R. 1979.** Détection d'Enterovirus par concentration sur poudre de verre en lit fluidisé à partir d'échantillons de 500 litres d'eaux superficielles. *Bull. Acad. Nat. Méd* 163, 668-673.

**Vilaginès, P., Sarrette, B., Danglot, C. & Vilaginès, R. 1982.** A new large scale technic for quantitative recovery of Enteroviruses by adsorption on suspended glass powder. In *Application to surface and drinking waters of the Paris area*. Vol. 14. Tech, W.S. (ed). PARIS, pp. 281-290.

### Question 3

- Vilaginès, P., Sarrette, B., Husson, G. & Vilaginès, R. 1983.** Concentration of waterborne viruses on glass powder fluidized bed adapted to the analysis of waste waters. *Conf. Ecology and Environ.* May 23.
- Vilaginès, P., Sarrette, B. & Vilaginès, R. 1988.** Détection en continu du Poliovirus dans des eaux de distribution publique. In *C.R. Acad. Sci. Vol. 307. Paris*, pp. 171-176.
- Vilaginès, P., Sarrette, B., Husson, G. & Vilaginès, R. 1989.** Concentration à pH neutre des virus hydriques dans des eaux de surface : étude quantitative et qualitative. *J. Fr. Hydrolo* 20, 193-202.
- Vilaginès, P., Sarrette, B., Husson, G. & Vilaginès, R. 1993.** Glass wool for virus concentration at ambient water pH level. *Wat. Sci. Tech.* 3-4, 299-306.
- Vilaginès, P.h., Suarez, A., Sarrette, B. & Vilaginès, R. 1997.** Optimisation of the PEG reconcentration Procedure for virus detection by cell culture or genomic amplification. *Wat. Sci. Tech.* 35, 455-459.
- Vinje, J., Vennema, H., Maunula, L., Von Bonsdorff, C.-H., Hoehne, M., Schreier, E., Richards, A., Green, J., Brown, D., Beard, S.S., Monroe, S.S., De Bruin, E., Svensson, L. & Koopmans, M.P.G. 2003.** International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses. *Journal of Clinical Microbiology* 41 (4), 1423-1433.
- Vivier, J.C., Clay, C.G. & Grabow, W.O.K. 2001.** Detection and rapid differentiation of human Enteroviruses in water sources by restriction enzyme analysis. *Water Sci Technol* 43, 209-212.
- Vivier, J.C., Ehlers, M.M. & Grabow, W.O.K. 2002.** Detection of Enteroviruses in treated drinking water. *Water Res*, in press.
- Wait, D.A. & Sobsey, M.D. 2001.** Comparative survival of enteric viruses and bacteria in Atlantic Ocean seawater. *Water Sci Technol* 43 (12), 139-142.
- Ward, B.K., Chenoweth, C.M. & Irving, L.G. 1982.** Recovery of viruses from vegetable surfaces. *Appl. Environ. Microbiol* 44, 1389-1394.
- Wentzel, R.S., O'Neill, P.E. & Kitchens, J.F. 1982.** Evaluation of coliphage detection as a rapid indicator of water quality. *Applied Environmental Microbiology* 43, 430-434.
- Wilson, B.R., Roessler, P.F., Van Dellen, E., Abbaaszadegan, M. & Gerba, C.P. 1992.** Coliphage MS2 as a UV Water Disinfection Efficacy Test Surrogate for Bacterial and Viral Pathogens. Water Tehcnology Conference. Toronto, Ontario, Canada.
- Wilson, I.G. 1997.** Minireview: Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied Environmental Microbiology* 63, 3741-3751.
- Wood, D.J. & Hull, B. 1999.** L20B cells simplify culture of Polioviruses from clinical samples. *J Med Virol* 58 (2), 188-192.
- Woody, M.A. & Cliver, D.O. 1995.** Effects of temperature and host cell growth phase on replication of F-specific RNA coliphage Q $\beta$ . *Applied Environmental Microbiology* 61, 1520-1526.
- Yates, M.V., Citek, R.W., Kamper, M.F. & Salazar, A.M. 1999.** Detecting Enteroviruses in water : comparing infectivity, molecular and combination methods. p.
- Zmirou, D., Ferley, J.P., Collin, J.F., Charrel, M. & Berlin, J. 1987.** A follow-up study of gastro-intestinal diseases related to bacteriologically substandard drinking water. *Am J Public Health* 77, 582-584.
- Zmirou, D., Rey, S., Courtois, X., Ferley, J.P., Blatie, r.J.F., Chevalier, P., Boudot, J., Potelon, J.L. & Mounir, R. 1995.** Residual microbiological risk after simple chlorine treatment of drinking ground water in small community systems. *Eur J Public Health* 5, 75-81.
- Zoll, G.J., Melchers, W.J.G., Kopecka, H., Jambroes, G., Van Der Poel, H.J.A. & Galama, J.M.D. 1992.** General primer-mediated polymerase chain reaction for detection of Enteroviruses : application for diagnostic routine and persistent infections. *J. Clin. Microbiol* 30, 160-165.

**Question 4 : Quels sont les risques sanitaires liés aux possibles sources et réservoirs environnementaux de ces virus ?**



## Question 4 : Quels sont les risques sanitaires liés aux possibles sources et réservoirs environnementaux de ces virus ?

## Question 4

*Coordinateur de la question : M. Bertagnoli*

*Membres du sous-groupe : Mme Déportes, Mme Dubrou, Mme Le Guyader, M. Carré, M. Dubois, M. Vilaginès*

### Résumé de la Question 4

À partir du schéma conceptuel de contamination des aliments *via* les réservoirs environnementaux présenté au début de cette question, il apparaît nécessaire de pondérer les différents éléments notés tout en prenant en compte les circonstances particulières d'exposition aux dangers et les risques associés.

Ainsi, ont été identifiées des sources primaires d'émission de virus (réservoirs vrais ou émanation de ceux-ci). Elles sont constituées des eaux usées traitées et leurs produits dérivés (boues, eaux épurées) et, au regard du potentiel zoonotique, des animaux et de leurs déjections.

Concernant les sources animales, il semble évident que certaines espèces (porcs, ruminants, rongeurs, lagomorphes) peuvent être à l'origine de contaminations humaines par le virus de l'hépatite E et les rotavirus. Ces virus semblent être de plus en plus fréquemment transmis de façon interspécifique, et étant donné le portage fréquent chez les espèces animales et leur résistance dans les déchets animaux ou le milieu extérieur, il convient d'être particulièrement vigilant à leur sujet. Les norovirus, quant à eux, ne sont pour le moment pas considérés comme des agents zoonotiques avérés mais ils présentent un potentiel de transmission qu'il convient d'étudier encore.

Peu de données renseignent sur le niveau de contamination des eaux usées par les virus. La quantité et la diversité des virus présents dans les eaux arrivant en tête de station d'épuration des eaux usées (STEP) dépendent en grande partie de l'état sanitaire de la population raccordée au réseau d'assainissement. L'abattement en virus dans la STEP, rarement total, sera fonction des processus de traitements. Toutefois, en cas de surcharge hydraulique liée notamment à des conditions météorologiques défavorables, des déversements d'eaux usées non traitées dans le milieu naturel peuvent survenir. Le risque d'une contamination durable de l'environnement et des aliments dépendant de ce milieu est alors accru.

Les procédés de traitement (traitements thermophiles, compostage, chaulage) des boues de station d'épuration, s'ils sont respectés, permettent un abattement important des virus entériques. Considérant également les mesures réglementaires stipulant les conditions d'utilisation, les boues de station d'épuration même non hygiénisées ne semblent pas être une source notable de danger viral. Dans ces conditions, les épandages ne sont pas considérés comme un facteur important de contamination de la ressource en eau.

Par ailleurs, les déchets (décharges et compostages) suivent en général un processus de collecte et de traitement efficace, qui limite énormément leur rôle potentiel dans la contamination virale des ressources.

Les compartiments environnementaux où les virus émis peuvent être retenus et persister, constituant ainsi une source secondaire virale potentielle, sont les sols, les eaux souterraines, les eaux de surface et les sédiments. Le sol semble, en général, constituer une barrière efficace au transfert des virus vers les nappes voire les denrées ; de plus, l'abattement mesuré dans la zone saturée (nappe) n'est pas négligeable. En revanche pour les eaux superficielles, la remise en suspension des sédiments contribue à une recontamination des masses d'eaux marines et environnementales. Le risque lié aux eaux de surface contaminées paraît également plus important en fonction de divers facteurs (principalement climatique et anthropique) pouvant être à l'origine de leurs contaminations.

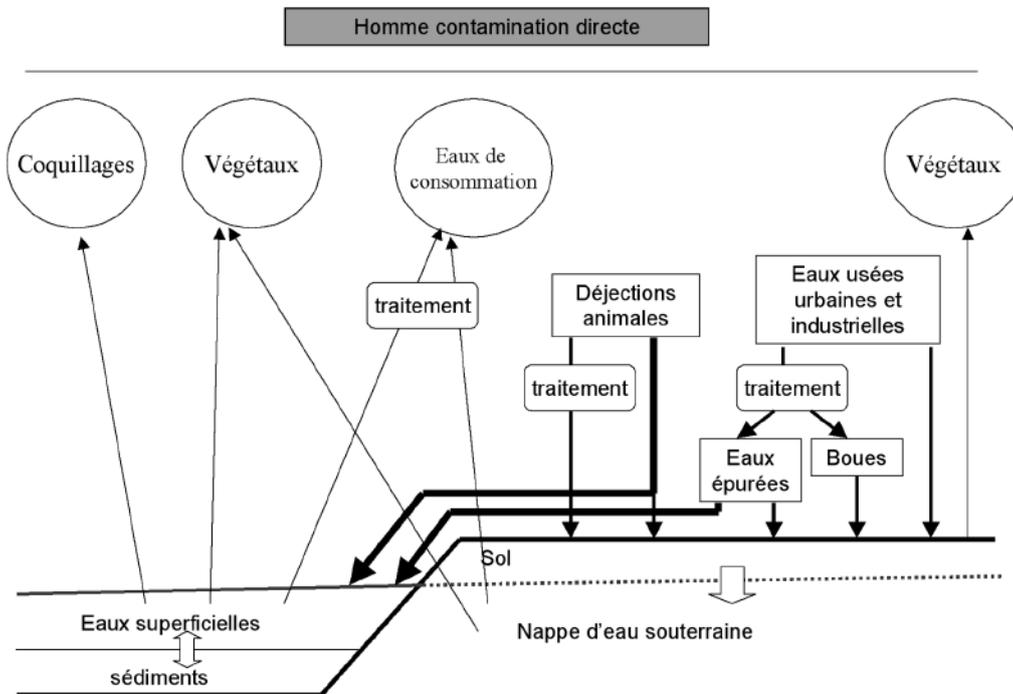
Par effet de cascade, les ressources alimentaires comme les coquillages ou les végétaux, directement en contact avec les eaux de surface ou les eaux usées contaminées, sont des intermédiaires de contamination humaine importants (en quantité et en durée).

## Question 4

### A. Introduction

La question posée s'intéresse au rôle épidémiologique des différents vecteurs, hors transmission directe, des principaux virus contaminant l'homme *via* les aliments ou l'eau de boisson. Le terme général de vecteur inclut ici les réservoirs et les sources de virus. Si on s'en tient à la définition classique d'un réservoir, « *Reservoir of infection : any person, animal, arthropod, plant, soil, or substance, or a combination of these, in which an infectious agent normally lives for survival, and where it reproduces itself in such a manner that it can be transmitted to a susceptible host.* » (John 2001, Heyman & David 2004), dans notre cas, ne peuvent être considérés comme tels que les espèces animales (homme y compris) hôtes des virus incriminés. Ainsi, ces réservoirs constitueront-ils, plus ou moins directement, une source continue de virus pour des supports inanimés. Ces derniers sont susceptibles de jouer le rôle de sources secondaires de contamination de longue durée (persistance et concentration possible des virus) pour les ressources alimentaires, elles-mêmes vectrices des agents infectieux dans les populations cibles. Ce cycle est reconstitué dans la Figure 5, où sont reliés les différents réservoirs et sources environnementaux (le rôle direct de l'homme y est seulement évoqué) impliqués dans la transmission des principaux virus entériques.

Figure 5 : schéma conceptuel d'exposition aux virus *via* les aliments



### B. Identification des sources virales et réservoirs environnementaux, des niveaux d'émission de virus dans l'environnement et de l'impact des traitements sur ces différentes sources et réservoirs

#### B.1. Réservoirs animaux et déjections

Les travaux sur le risque de transmission de virus à l'homme par des denrées alimentaires et/ou des eaux de consommation sont généralement dirigés sur les virus décrits dans le Tableau 16.

Tableau 16 : potentiel zootonique des virus entériques transmissibles à l'homme

Calicivirus Norovirus Sapovirus	Virus l'Hépatite A	Virus l'Hépatite E	Entérovirus	Rotavirus	Adénovirus (st 40, 41)	Astrovirus
Potentiellement zoonotiques	Rarement zoonotiques (primates)	Zoonotiques	Non zoonotiques (Potentiel pour Coxsackievirus B5, porcins)	Zoonotiques	Non zoonotiques	Non zoonotiques
Importance épidémiologique de la transmission animale possible non évaluée	Pas d'importance épidémiologique de la transmission animale	Rôle épidémiologique de la transmission animale non négligeable	/	Rôle épidémiologique de la transmission animale non négligeable	/	/

Néanmoins dans cette revue des connaissances scientifiques, nous ne prendrons en compte que les virus pour lesquels une transmission d'origine animale joue un rôle épidémiologique significatif : les norovirus, le virus de l'hépatite E et les rotavirus.

### B.1.1 Réservoirs animaux

Les virus, parasites intracellulaires, ont une spécificité d'hôte liée à une reconnaissance nécessaire de la cellule hôte par la particule virale. Il existe ainsi des virus spécifiques de l'homme, des animaux, des plantes ou des bactéries. Cependant la notion de barrière d'espèce est de plus en plus remise en cause. Dans des conditions encore mal définies, un virus animal pourrait infecter l'homme et créer des problèmes de santé publique importants, comme l'a montré l'émergence de la souche grippale aviaire H5N1 à Hong-Kong ou le VIH. Par ailleurs, certains virus sont susceptibles d'infecter d'emblée plusieurs espèces. Tous ces virus s'intègrent plus généralement dans l'ensemble constitué par les agents dits zoonotiques <sup>(21)</sup>.

Concernant les virus entériques persistant dans l'environnement, les animaux rejettent dans leurs fèces des rotavirus, des astrovirus, des calicivirus et des virus de l'hépatite E. Certains virus présentent des similarités plus ou moins fortes avec les virus humains, ce qui est susceptible de faciliter le passage d'espèce à espèce. La contamination d'un coquillage ou d'un fruit à la fois par des virus humains et animaux pourrait par exemple favoriser ce phénomène. Nous nous intéresserons aux possibles transmissions à l'homme du virus de l'hépatite E, des *Norovirus* et des *Rotavirus* (cf. Question 1).

À l'heure actuelle, et à notre connaissance, peu de données sont disponibles sur le portage animal, sur la spécificité des souches animales par rapport aux souches humaines et de ce fait sur la spécificité des amorces pour les détecter. Il existe également peu d'information sur la persistance de ces virus dans les produits animaux ou dans l'environnement.

#### B.1.1.1 Norovirus

Ce n'est qu'assez récemment que le spectre d'hôtes des NoV a été réévalué. On a ainsi identifié des NoV chez la souris, les bovins et les porcs. Au Japon des gènes de NoVs ont été décelés dans le caecum de porc (Sugieda *et al.* 1998). La caractérisation moléculaire de Calicivirus bovins a montré une similitude plus forte avec les Norovirus humains qu'avec d'autres souches animales (Dastjerdi *et al.* 1999, Liu *et al.* 1999). Dans une étude réalisée aux Pays-Bas, 44 % des échantillons fécaux prélevés chez des veaux dans 33 fermes étaient porteurs de NoV (van Der Poel *et al.* 2000), tandis qu'aux États-Unis, selon les études, jusqu'à 80 % des veaux ont été trouvés porteurs de NoV (Smiley *et al.* 2003, Wise *et al.* 2004). Cependant, une étude phylogénique portant sur trois régions génomiques de souches bovines collectées entre 1976 et 2000 en Angleterre montre que les virus bovins forment un génogroupe proche mais distinct des virus humains, démontrant ainsi que le passage de ces souches à l'homme est peu vraisemblable (Oliver *et al.* 2003). Ceci est confirmé par l'absence d'antigénicité croisée du génogroupe III (bovin) avec les deux génogroupes humains et le peu d'identité en acides aminés (Han *et al.*

(21) Définition de l'OMS d'une zoonose : « maladies ou infections qui se transmettent naturellement d'un animal vertébré à l'homme et vice-versa ».

## Question 4

2005). Néanmoins, une étude épidémiologique menée aux Pays-Bas, montrant la présence d'anticorps anti-NoV bovins dans 20 à 28 % des sérums humains testés, tend à indiquer que des infections interspécifiques seraient possibles (Widdowson *et al.* 2005).

**Enfin, la transmission de norovirus animaux à l'homme n'est toujours pas formellement démontrée, les indications épidémiologiques n'écartant toutefois pas cette possibilité.**

### B.1.1.2 Virus de l'hépatite E

Des études épidémiologiques menées dans des pays industrialisés ont révélé, de façon surprenante, de fortes séroprévalences contre le virus de l'hépatite E. Ces résultats ont ainsi conduit à l'hypothèse d'un réservoir animal pour le VHE et d'une transmission zoonotique (Meng 2000). Cette hypothèse a été confortée par la mise en évidence d'une part de virus animaux de type VHE, et de la transmission interspécifique de VHE, et d'autre part par diverses études épidémiologiques.

La première souche animale de VHE a été découverte chez un porc aux États-Unis en 1997 (Meng *et al.* 1997). Des enquêtes séroépidémiologiques ont révélé que pratiquement 100 % des porcs commercialisés aux États-Unis étaient infectés (Meng *et al.* 1997, Huang *et al.* 2002). L'infection est le plus souvent asymptomatique, mais le virus peut être excrété dans les fèces pendant 5 à 7 semaines. Des séquences proches des souches humaines ont été caractérisées dans différents élevages porcins des Pays-Bas (van der Poel *et al.* 2001). Jusqu'ici seules des souches de génotypes 3 et 4 ont été retrouvées, parfois non différenciables de souches humaines, suggérant que les virus porcins pourraient infecter l'homme (Schlauder *et al.* 1998). D'ailleurs, des infections expérimentales de primates avec du VHE porcine ont été réalisées (Meng *et al.* 1998). En Espagne, du VHE a également été détecté dans des eaux usées contaminées par des rejets d'abattoirs en absence, *a priori*, de cas dans la population humaine (Pina *et al.* 1998a). Plusieurs enquêtes séro-épidémiologiques ont de plus montré que les personnes au contact des porcs à l'occasion de leurs activités professionnelles (éleveurs, vétérinaires) avaient un risque d'infection par le VHE supérieur au reste de la population (Meng *et al.* 1999, Drobeniuc *et al.* 2001, Meng *et al.* 2002). Enfin, des cas sporadiques d'hépatite E humaines liés directement à la consommation d'abats de porc insuffisamment cuits ont été récemment décrits (Yazaki *et al.* 2003).

La faune sauvage constitue aussi un réservoir potentiel de VHE. Ainsi, des cas d'infections consécutives à la consommation de viande de cerf ou de foie et de viande de sangliers peu cuits ont été découverts au Japon (Tei *et al.* 2003, Takahashi *et al.* 2004, Masuda *et al.* 2005). Toujours au Japon, une enquête épidémiologique réalisée sur des populations de rats a mis en évidence une forte séroprévalence (entre 13 et 31 %) en anticorps anti-VHE dans cinq districts côtiers de l'archipel (Hirano *et al.* 2003), ce qui pose le problème du rôle possible de certains rongeurs dans la circulation du VHE.

**Toutes ces données indiquent que l'hépatite E est une zoonose, plusieurs espèces animales, et en premier lieu les porcins, pouvant jouer le rôle de réservoir.**

### B.1.1.3 Rotavirus

En ce qui concerne les rotavirus, il existe de nombreuses données démontrant la fragilité de la barrière d'espèce. En particulier, des types inhabituels de rotavirus de groupe A, possédant plutôt des caractéristiques de souches animales, sont de plus en plus souvent isolés de cas humains. Ceci est le cas pour des souches de type G9, associées à des diarrhées néonatales sévères (Widdowson *et al.* 2000), de plus en plus fréquemment évoquées ces dernières années en Europe. En Belgique et en Allemagne, les virus G9 sont devenus le deuxième groupe de rotavirus le plus détecté chez l'homme après les virus G1 (Oh *et al.* 2003, van der Donck *et al.* 2003). Diverses études tendent à montrer que les souches G9 émergentes sont vraisemblablement d'origine animale (ovins et porcins) (Fitzgerald *et al.* 1995, Santos *et al.* 1999, Hoshino *et al.* 2005).

De fait, il semble de plus en plus pertinent de vérifier si les animaux peuvent constituer une source de rotavirus pour l'homme, et surtout si cette transmission inter-spécifique a une réelle importance épidémiologique. Deux types d'événements peuvent conduire à une transmission zoonotique de ces virus atypiques : la transmission directe d'un virus animal, ou encore le réassortiment entre virus humains et animaux lors de co-infections (ou d'infections séquentielles). Ces événements propres aux virus à ARN segmentés permettent d'ailleurs d'évoquer la notion de « gènes zoonotiques » (Cook *et al.* 2004).

Des preuves expérimentales d'infections interspécifiques, y compris de virus humains, de rotavirus (Theil 1990, Chang *et al.* 2001, Cook *et al.* 2004) complètent les très nombreuses études épidémiologiques évoquant leur transmission zoonotique (voir pour revue (Cook *et al.* 2004)).

Ainsi une souche de rotavirus trouvée chez des enfants au Brésil semble être un réassortant entre une souche humaine et une souche porcine (Santos *et al.* 1999). La même étude rapporte l'isolement de souches de type humain chez les porcs. Un travail récent suggère que des virus humains de type G9 pourraient dériver directement d'une souche G9 porcine (Hoshino *et al.* 2005). Certains auteurs considèrent que les rotavirus bovins sont impliqués dans des événements de réassortiment avec des virus humains conduisant à l'émergence de souches inhabituelles un peu partout dans le monde (ex : souche G8 en Inde en 1993) (Das *et al.* 1993, Nakagomi & Nakagomi 1993). D'ailleurs, des cas de co-isolement de virus humains et bovins ont été rapportés chez des enfants, illustrant ainsi cette notion (Nakagomi *et al.* 1994). Enfin, plusieurs études signalent aussi des infections symptomatiques humaines par des rotavirus strictement animaux pour l'ensemble de leur génome (félins, canins, murins, lapins) (Eiden *et al.* 1985, Nakagomi & Nakagomi 1989, Nakagomi *et al.* 1992, De Leener *et al.* 2004).

Les contaminations humaines par les rotavirus animaux peuvent avoir lieu à l'occasion de contact direct avec l'animal (mains souillées...), qu'il soit de compagnie ou de rente, mais aussi par l'environnement (pollution directe ou indirecte des sols, des eaux de surface, des cultures, des viandes...) (Gratacap-Cavallier *et al.* 2000, Cook *et al.* 2004). Se pose ainsi le problème de la persistance des rotavirus animaux dans les déchets et effluents d'origine animale. Peu de données sont actuellement disponibles. Un modèle expérimental d'infection à rotavirus porcin a permis de montrer que le titre viral ne diminuait que de  $2 \log_{10}$  au bout de 4 mois dans des fèces conservés à température ambiante (Fu *et al.* 1989). Une autre étude a montré que des rotavirus porcins naturellement présents dans des fèces étaient toujours infectieux après 32 mois de conservation à 10°C (Ramos *et al.* 2000). Enfin, (Pesaro *et al.* 1995) ont réalisé une cinétique d'inactivation de rotavirus bovin dans du lisier, montrant une diminution de moins de  $2 \log_{10}$  en 12 semaines.

Enfin, la présence et l'identification précise de rotavirus dans les coquillages ou dans l'environnement a été très rarement réalisée (Dubois *et al.* 1997, Villena *et al.* 2003).

**Les rotavirus sont des virus zoonotiques, impliquant plusieurs espèces animales, à l'origine de contaminations directes ou indirectes.**

### B.1.2 Survie des virus dans les fèces et l'impact des traitements des déjections animales

Les virus sont inactivés par l'ammoniaque, mais ils pourraient survivre de plusieurs jours à plusieurs mois dans les fumiers et les lisiers, particulièrement lors de digestions anaérobies réalisées à basse température et à  $\text{pH} < 8$  (Deng & Cliver 1995, Pesaro *et al.* 1995). Selon (Deng & Cliver 1995, Pesaro *et al.* 1995), les temps de stockage des fumiers recommandés par la Commission européenne, avant leur utilisation en agriculture, ne sont pas suffisants pour inactiver les virus entériques. L'inactivation de virus animaux serait plus rapide lors de digestion aérobie des lisiers. Cependant, la température joue encore un rôle important : plus elle est basse, plus les virus restent infectieux longtemps (Turner & Burton 1997).

Les matières d'origine animale destinées à l'épandage sont soumises au Règlement de la commission européenne n°1774/2002<sup>(22)</sup>. Les produits de catégorie 2 de cette réglementation doivent subir avant leur épandage un traitement de 133°C (20 min, 3 bars). Cependant, les lisiers, fumiers et matières stercoraires (qui font partie de la catégorie 2) en sont exemptés et peuvent être épandus sans traitement préalable.

Notons enfin que, si des traitements peuvent être appliqués aux déjections animales, seule une fraction d'entre elles est concernée puisque 50 % des déjections animales sont émises directement au champ.

## B.2 Eaux usées traitées et boues de STEP

Un vecteur potentiel de dissémination des virus (et des autres micro-organismes) dans l'environnement est l'ensemble des eaux usées. Les eaux usées sont traitées en stations d'épuration qui génèrent deux émissaires potentiellement vecteurs de virus : l'eau épurée rendue au milieu et les boues d'épuration, sous-produit de l'assainissement.

Une étude réalisée sur une station à boues activées montre que les échantillons d'air collectés à des distances allant de 0 à 50 m du bassin d'aération étaient tous positifs en entérovirus et réovirus par culture cellulaire (Carducci *et al.* 1999). Ces aérosols peuvent constituer une voie de contamination de l'environnement par les virus à proximité immédiate de certaines STEP.

(22) Règlement du 3 octobre 2002 établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux non destinés à la consommation humaine.

## Question 4

### B.2.1 Rappels sur l'assainissement

Cf. site <http://www.ademe.fr/partenaires/boues/>

Les activités humaines génèrent des eaux usées. Elles véhiculent une charge organique, des polluants et des micro-organismes (dont des virus entériques, une partie de la contamination des eaux étant d'origine fécale). Afin de préserver les milieux et leurs usages par l'homme (pêche, baignade, adduction d'eau potable...) un traitement des eaux usées est nécessaire avant de la rendre au milieu naturel.

Ainsi, le traitement des eaux usées est régi par la loi sur l'eau du 3 janvier 1992 et le décret 94-469 du 3 juin 1994. Il y est imposé la mise en place d'un système de collecte et de traitement des eaux collectées pour les agglomérations de plus de 2000 Équivalents habitants (EH) ou la mise en place d'un système de traitement lorsqu'il existe déjà une collecte pour les agglomérations de moins de 2000 EH.

Schématiquement, les principes d'obtention des eaux épurées et des boues sont les suivants :

- la **filière de traitement de l'eau** comprend un premier filtrage/dégrillage puis dessablage/déshuilage. L'eau est ensuite acheminée vers divers bassins de dégradation/décantation de la matière organique en suspension dans l'eau. Les systèmes de traitement se différencient par leur taille, leur durée, le type de culture bactérienne mise en œuvre, le taux d'oxygénation, l'adjonction de réactifs chimiques notamment. Les eaux sont rendues au milieu naturel et le sous-produit de cette épuration est une boue. Selon le traitement des eaux, trois grandes familles de boues sont obtenues : Boues biologiques, Boues primaires, Boues physico-chimiques (on rencontre aussi les termes : boues secondaires, boues « mixtes », boues activées). On réunira ici ces boues sous le vocable de boues non traitées<sup>(23)</sup>. Seules les boues peuvent faire l'objet d'une valorisation agricole alors que les déchets du filtrage/dégrillage puis dessablage/déshuilage ne le peuvent pas ;
- la **filière de traitement des boues** vise à traiter les boues obtenues lors de l'épuration des eaux. Les traitements ont vocation à réduire la teneur en eau des boues, à stabiliser la matière organique (réduction du pouvoir fermentescible) ou à les hygiéniser. En fonction du traitement appliqué, on obtient des boues liquides, des boues pâteuses, des boues séchées, des boues chaulées ou encore des boues compostées. Cette formulation a une incidence sur le mode de valorisation de la boue.

### B.2.2 Eaux usées

Plus de 140 types de virus entériques pathogènes pour l'homme sont susceptibles de circuler dans les populations selon les cycles épidémiques et l'hygiène des collectivités. Les personnes infectées éliminent pendant plusieurs semaines plus de  $10^9$  virus par gramme de fèces (rotavirus :  $10^{10}$ /g, entérovirus :  $10^6$ /g, VHA :  $10^8$ /g, (Yates & Yates 1988)). Les eaux usées arrivant en tête de STEP sont donc, en fonction de l'état sanitaire de la population chargées en virus.

Les rejets dans le milieu naturel sont réglementés : des normes de rejet et des obligations de traitement, fonction de la capacité de la STEP, sont fixées par différents textes<sup>(24)</sup>. Les paramètres visés sont exclusivement des paramètres physico-chimiques.

Cependant certaines STEP, en tant qu'installations classées sont tenues de réaliser une étude d'impact qui devrait prendre en compte les risques sanitaires liés au rejet dans le milieu naturel d'eaux usées traitées, notamment les risques microbiologiques associés aux usages de l'eau en aval du point de rejet. En outre, la section des eaux du CSHPF a émis des recommandations sur la désinfection des eaux usées urbaines<sup>(25)</sup> dans des zones jugées sensibles. Ce document présente des orientations destinées à guider la réflexion et la décision des autorités sanitaires locales.

#### Les virus dans les eaux usées

Au niveau européen et par une revue de la littérature (Carrington 2001), les concentrations en virus entériques dans les eaux usées brutes et dans les eaux usées traitées sont estimées respectivement dans des fourchettes de  $10^4$  UFP.L<sup>-1</sup> et  $10^3$  UFP.L<sup>-1</sup>. Le Tableau 17 présente les résultats de différentes études réalisées dans différents pays.

(23) À noter le cas particulier du lagunage, qui combine le traitement de l'eau et le traitement des boues (de part la durée du traitement). Les lagunes produisent des "boues de lagunage". Les boues s'accumulant peu à peu au fond des bassins sont curées annuellement, ou tous les deux ans, dans la première zone d'accumulation des dépôts, et une fois tous les cinq ou dix ans pour les autres bassins.

(24) Arrêté du 21 juin 1996 fixant les prescriptions techniques minimales relatives aux ouvrages de collecte et de traitement des eaux usées dans les communes ayant une station d'épuration d'une capacité de moins de 2 000 EH.

Arrêté du 22 décembre 1994 fixant les prescriptions techniques relatives aux ouvrages de collecte et de traitement des eaux usées mentionnées aux articles L. 372-1-1 et L.372-3 du code des communes

(25) Circulaire DGS/VS4 n° 98-426 du 10 juillet 1998 relative à la transmission des recommandations du Conseil supérieur d'hygiène publique de France sur la désinfection des eaux usées.

Tableau 17 : présence de virus humains dans les eaux usées

Virus	Site	Date	Eaux usées brutes		Eaux usées traitées		Référence
			Culture cellulaire	Biologie moléculaire	Culture cellulaire	Biologie moléculaire	
Norovirus	Pays-Bas	Nov. 1998 – Avr. 1999		5.10 <sup>3</sup> à 8.10 <sup>5</sup> PDU/L		9.10 <sup>2</sup> à 8.10 <sup>3</sup> PDU/L	(Lodder & De Roda Husman 2005)
Rotavirus							
Entérovirus et réovirus (sur BGM)			10 <sup>2</sup> à 10 <sup>3</sup> UFP/L		5 à 100 UFP/L		
Norovirus	Pays-Bas			10 <sup>5</sup> UG/L		10 <sup>3</sup> UG/L	(van den Berg <i>et al.</i> 2005)
Adénovirus	États-Unis					10 <sup>5</sup> génomés/L	(He & Jiang 2005)
Astrovirus	France			10 <sup>6</sup> à 10 <sup>8</sup> équivalent génomés/L		10 <sup>3</sup> à 10 <sup>5</sup> équivalent génomés/L	(Le Cann <i>et al.</i> 2004)
Norovirus	Grande- Bretagne			10 <sup>7</sup> UG/L		10 <sup>5</sup> UG/L	(Laverick <i>et al.</i> 2004)

Des études ont été faites pour les eaux usées où l'on a comparé différentes étapes de traitement (Fleischer *et al.* 2000). Suivant les auteurs, la simple sédimentation conduit pour des virus ou les coliphages à des résultats entre 0 % (Morris 1984, Rose *et al.* 1996) et 20 % (Irving & Smith 1981, Zaiss & Hennies 1988) d'élimination.

Pour le lagunage tertiaire, on a signalé deux log d'abattement sur les entérovirus (Morris 1984).

Les systèmes de boues activées quant à eux, donnent des résultats qui varient suivant les auteurs : de 0 à 30 % (Morris 1984), de 28 à 93 % (Irving & Smith 1981), 73 % sur le bactériophage MS2 (Zaiss & Hennies 1988), et 98 % (Rose *et al.* 1996).

Si l'on se réfère au Tableau 18 qui compare les efficacités des traitements tertiaires pour les eaux usées, nous voyons effectivement que les stations d'épuration devraient améliorer leur traitement préalable (Schoenen 2001).

L'obligation d'éliminer l'azote et le phosphore contribuera indirectement à une meilleure qualité microbiologique et surtout virale de l'eau rejetée.

Tableau 18 : efficacité des traitements de désinfection des eaux usées sur les micro-organismes

	Micro-organismes libres			Micro-organismes liés à des matières fécales		
	Bactérie	Virus	Parasite	Bactérie	Virus	Parasite
Filtration	+	+	+	+	+	+
Cl <sub>2</sub> ou ClO <sub>2</sub>	+	+	-	-	-	-
O <sub>3</sub>	+	+	-	-	-	-
Chaleur > 90° C	+	+	+	+	+	+

« + » : traitement efficace

« - » : traitement non efficace

Pour les eaux usées, suivant les traitements utilisés, il est possible d'obtenir les abattements suivants :

- lagunage : 2 log (Morris 1984, Rose *et al.* 1996) ;
- coagulation, sédimentation, filtration : 3 log ;
- coagulation, filtration : 3 log (Rose *et al.* 1996) ;
- post-précipitation ou post-filtration : 3 log.

## Question 4

Peu de données sont disponibles qui renseignent sur le niveau de contamination des eaux usées par les virus. La charge en virus dans les eaux arrivant en tête de STEP va être essentiellement fonction de l'état sanitaire de la population déversant ces eaux usées dans le réseau. L'abattement en virus dans la STEP, rarement total, sera fonction des étapes de traitements. En cas de surcharge hydraulique liée notamment à des conditions météorologiques défavorables, des déversements d'eaux usées non traitées dans le milieu naturel peuvent survenir.

### B.2.3 Boues de STEP

#### B.2.3.1 Quelques chiffres et devenir des boues

En 2004, les estimations sur la production des boues en France (source ADEME, chiffres non publiés) affichent un maximum de 10 millions de tonnes (matière brute annuelle) de boues urbaines et 4 800 000 tonnes (matière brute annuelle) de boues industrielles. La grande majorité de ces boues est valorisée en agriculture. Pour les boues urbaines, environ 60 % retournent aux sols, et environ 50 % pour les boues industrielles. Pour une valorisation agricole, environ 15 % des boues sont compostées et 30 % sont chaulées. Les alternatives à la valorisation agronomique des boues sont l'incinération et la mise en centre de stockage.

#### B.2.3.2 Réglementation de l'épandage

Les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles figurant dans l'arrêté du 8 janvier 1998 et pris en application du décret 97-1133 du 8 décembre 1997 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées stipulent qu'une étude préalable doit être menée. Elle décrit les caractéristiques des boues, analyse les contraintes liées aux milieux récepteurs, caractérise les sols et les systèmes de culture récepteurs et définit les conditions d'épandage permettant d'assurer l'adéquation entre les caractéristiques des boues et les systèmes agro-pédologiques récepteurs. Les parcelles réceptrices doivent être identifiées de manière prévisionnelle, avec l'accord de l'exploitant agricole récepteur.

En plus de l'étude préalable, en fonction de la quantité de boues, le dossier doit produire des informations supplémentaires (Tableau 19) comme, par exemple, une étude d'incidence qui doit figurer dans les demandes d'autorisation.

Tableau 19 : prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles

Quantité de boues produites	Q < 3 t MS/an ou Q < 0,015 t Azote/an	3 t MS/an < Q < 800 t MS/an ou 0,15 t azote/an < Q < 40 t azote/an		Q > 800 t MS/an ou Q > 40 t azote/an
Taille de la station d'épuration (EH)	0 - 200	200 - 2 000	2 000 - 50 000	> 50 000
Dossier à constituer avant épandage	Étude préalable Mise en place d'un dispositif de surveillance	Dossier de déclaration Mise en place d'un dispositif de surveillance		Dossier d'autorisation Mise en place d'un dispositif de surveillance
Document à adresser à l'utilisateur des boues	Synthèse du dispositif de surveillance			
Documents à adresser annuellement au Préfet	Synthèse du dispositif de surveillance		Synthèse du dispositif de surveillance Programme prévisionnel d'épandage Bilan agronomique	

Source : ORDIF 2003<sup>(26)</sup>  
MS : matière sèche, t : tonne

Le retour au sol des boues d'épuration peut se faire selon trois modalités réglementaires : une homologation (procédure du ministère de l'agriculture – peu utilisée pour les boues), une conformité avec une norme rendue d'application obligatoire (c'est le cas des composts de boues par la NF U 44-095 « Composts contenant des matières d'intérêt agronomique, issues du traitement des eaux ») ou un plan d'épandage. En matière de micro-organismes, la norme NF U 44-095 ne donne pas de prescription sur les virus.

(26) [http://www.ordif.com/indicateurs/boues\\_STEP.htm](http://www.ordif.com/indicateurs/boues_STEP.htm) (consulté le 23 février 2006).

**Tableau 20 : restrictions d’usage et bonnes pratiques d’épandage des boues selon l’arrêté du 8 janvier 1998**

Nature des activités à protéger	Distance d’isolement minimale	Domaine d’application
Puits, forages, sources, aqueducs transitant des eaux destinées à la consommation humaine en écoulement libre, installations souterraines ou semi-enterrées utilisées pour le stockage des eaux, que ces dernières soient utilisées pour l’alimentation en eau potable ou pour l’arrosage des cultures maraîchères	35 mètres	Tous types de boues, pente du terrain inférieure à 7 %.
	100 mètres	Tous types de boues, pente du terrain supérieure à 7 %.
Cours d’eau et plans d’eau	35 mètres des berges	Cas général, à l’exception des cas ci-dessous.
	200 mètres des berges	Boues non stabilisées ou non solides et pente du terrain supérieure à 7 %.
	100 mètres des berges	Boues solides et stabilisées et pente du terrain supérieure à 7 %.
	5 mètres des berges	Boues stabilisées et enfouies dans le sol immédiatement après l’épandage, pente du terrain inférieure à 7 %.
Immeubles habités ou habituellement occupés par des tiers, zones de loisirs ou établissements recevant du public	100 mètres	Cas général à l’exception des cas ci-dessous.
	Sans objet	Boues hygiénisées, boues stabilisées et enfouies dans le sol immédiatement après l’épandage.
Zones conchylicoles	500 mètres	Toutes boues sauf boues hygiénisées et sauf dérogation liée à la topographie.
<b>Délai minimum</b>		
Herbages ou cultures fourragères	Six semaines avant la remise à l’herbe des animaux ou de la récolte des cultures fourragères	Cas général, sauf boues hygiénisées.
	Trois semaines avant la remise à l’herbe des animaux ou de la récolte des cultures fourragères	Boues hygiénisées.
Terrains affectés à des cultures maraîchères et fruitières à l’exception des cultures d’arbres fruitiers	Pas d’épandage pendant la période de végétation.	Tous types de boues.
Terrains destinés ou affectés à des cultures maraîchères ou fruitières, en contact direct avec les sols, ou susceptibles d’être consommées à l’état cru	Dix-huit mois avant la récolte, et pendant la récolte elle-même	Cas général, sauf boues hygiénisées.
	Dix mois avant la récolte, et pendant la récolte elle-même	Boues hygiénisées.

Le plan d’épandage est régi par l’Arrêté du 8 janvier 1998<sup>(27)</sup> pour les boues de station d’épuration urbaine et par l’Arrêté du 2 février 1998<sup>(28)</sup> pour les boues issues d’ICPE. Le plan d’épandage ne rend pas obligatoire l’hygiénisation des boues mais une non hygiénisation implique des restrictions d’usage. L’épandage est soumis, de manière générale, aux respects de bonnes pratiques d’épandage. Le Tableau 21 présente les seuils d’hygiénisation et le Tableau 20 les modalités d’usage des boues en fonction de leur hygiénisation ou non.

La gestion du risque microbiologique dans le cadre du plan d’épandage est donc double : soit en réduisant les dangers (hygiénisation) soit en réduisant les expositions (restrictions d’usage et bonnes pratiques).

(27) Arrêté du 8 janvier 1998 fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles pris en application du décret n° 97-1133 du 8 décembre 1997 relatif à l’épandage des boues issues du traitement des eaux usées (JO du 31 janvier 1998).

(28) Arrêté du 2 février 1998 relatif aux prélèvements et à la consommation d’eau ainsi qu’aux émissions de toute nature des installations classées pour la protection de l’environnement soumises à autorisation (JO du 3 mars 1998).

## Question 4

Tableau 21 : critères d'hygiénisation selon l'arrêté du 8 janvier 1998

<i>Salmonella</i>	< 8 NPP/10 g MS
Entérovirus	< 3 NPPUC/10 g MS
Œufs d'helminthes viables	< 3/10 g MS

### B.2.3.3 Efficacité des traitements

En premier lieu, les traitements visent à réduire le pouvoir fermentescible des boues. Lorsqu'ils sont poussés, ils réduisent alors la charge en micro-organismes. Ils utilisent en conséquence des phénomènes délétères sur les organismes vivants, et notamment : la température, le pH, le taux d'oxygénation. Les différents traitements peuvent combiner plusieurs phénomènes. L'efficacité du traitement est généralement liée à la durée de son application.

L'efficacité d'un traitement se mesure par le taux d'abattement qu'il permet d'atteindre. On définit ainsi une faible réduction quand le taux de réduction est inférieur à 2 log, une réduction moyenne entre 2 et 4 log, une réduction bonne à excellente quand le taux de réduction est supérieur à 4 log. C'est dans cette dernière gamme que se situe l'hygiénisation (Elissalde *et al.* 1994)

Schématiquement, le Tableau 22 propose une classification des traitements des boues au regard de leur efficacité sur tous les micro-organismes pathogènes potentiellement présents (virus, bactéries, parasites) (D'après Elissalde *et al.* 1994).

Tableau 22 : efficacité des systèmes de traitement des boues

Réduction > 4 Log		Réduction < 4 log	
Traitements	Conditions	Traitements	Conditions
Digestion thermophile	55°C, 10j	Digestion froide	20°C, 30j
Stabilisation thermophile	55°C, 10j	Stabilisation froide	20°C, 30j
Compostage bien conduit	50-60°C, 15-30 j	Compostage à faible température	40 °C, 15-30 j
Chaulage fort	pH 12, 10j	Conditionnement chimique + déshydratation mécanique	-
Pasteurisation	70°C, 3h		

Source : (Elissalde *et al.* 1994)

D'un point de vue réglementaire en France, il n'existe pas d'obligation de moyens quant aux traitements à appliquer aux boues mais uniquement des obligations de résultats (Tableau 21). Par contre, au niveau européen, des textes encore en discussion proposent les prescriptions suivantes (Tableau 23) (Cadiergues 2000)<sup>(29, 30)</sup> :

**Tableau 23 : préconisations possibles des textes européens en cours de rédaction quant aux traitements des boues**

Traitements avancés (hygiénisation)	Traitements conventionnels (stabilisation)
Séchage thermique, 80°C, 90 % siccité, activité en eau >0,9 première heure	Stabilisation thermophile aérobie, 55°C, temps de rétention moyen 20 jours
Stabilisation aérobie thermophile, 55°C, 20 H, système clos	Digestion anaérobie thermophile, 53°C, temps de rétention moyen 20 jours
Digestion anaérobie thermophile, 53°C, 20 H, système clos	Traitement à la chaux, pH>12, 24 H
Traitement thermique, boues liquides, 30 mn 70°C + digestion anaérobie mésophile, 35°C, 12 jours	Digestion anaérobie mésophile, 35°C, temps de rétention moyen 15 jours
Traitement à la chaux, pH>12, 55°C pd 2H	Aération prolongée, température ambiante, système clos
Traitement à la chaux, pH>12, + 3 mois	Stockage des boues liquides, système clos, réduction 2 log <i>E. coli</i>
Compostage Andains 55°C – 2 semaines – 5 retournements 65°C – 1 semaines – 2 retournements Système fermé 60°C – 1 semaine	Stabilisation aérobie à température ambiante.

#### B.2.3.4 Les virus dans les boues non traitées et les boues traitées

La présence des virus pathogènes humains et animaux dans les boues non traitées et traitées est relativement peu documentée comparativement à d'autres micro-organismes. Par ailleurs, les connaissances concernent surtout les boues urbaines plutôt que les boues industrielles.

Au niveau européen et par une revue de la littérature (Carrington 2001), la concentration en virus entériques est estimée dans une fourchette de  $10^2$ - $10^4$  g<sup>-1</sup> MB (matière brute).

En France, les travaux universitaires de (Cadiergues 2000) et (Monpoeho 2001) ont traité de l'occurrence des entérovirus et/ou du virus de l'hépatite A dans les boues et lors de leurs traitements.

Les travaux de (Cadiergues 2000) faisaient le suivi de micro-organismes pathogènes dans les boues lors de divers traitements et lors de stockage. L'efficacité des traitements et l'influence du stockage au regard de la charge virale n'ont pu être réellement étudiées car ces organismes n'étaient pas présents dans les boues non traitées sauf par une fois en entrée de compostage. Une concentration faible (proche du seuil de détection de 3 NPPUC/10 g MS) en entrée de traitement a été mesurée. Aucun virus n'est mesuré en sortie de compostage. Dans cette même étude, les phages ont été suivis. On observe leur présence en entrée de traitement (coliphages somatiques :  $6.10^5$  –  $3.10^6$  UFP.  $10g^{-1}$  MS ; bactériophages à ARN F-spécifiques  $4.10^3$  –  $3.10^5$  UFP.  $10g^{-1}$  MS ; bactériophages de *B. fragilis* : <12 UPF. $10g^{-1}$  MS – 79 UFP. $10g^{-1}$  MS). Lors du chaulage des boues liquides, les coliphages somatiques sont toujours présents après 24h dans une gamme de pH de 10 à 13,5. Dans les boues solides, ils disparaissent en 24h pour un pH > 12. Les bactériophages à ARN F-spécifiques disparaissent des boues solides en 24h lorsque le pH>10 et de manière plus variable dans les boues liquides pour des pH variant entre 11,6 et 13. Les bactériophages de *B. fragilis* sont peu résistants et disparaissent en 24h au-delà de pH=10.

Lors du compostage, les phages sont drastiquement réduits et sont dans la majorité des cas non détectés dans le compost. Seuls les coliphages somatiques ont été retrouvés par deux fois (sur 4 systèmes de compostage suivis) et avaient subi un abattement de 2 à 5 log.

(29) Commission européenne, DG environnement. Document de travail sur les boues d'épuration. 3<sup>e</sup> version. 27 avril 2000.

(30) Commission européenne, DG environnement. Document de travail sur le traitement biologique des biodéchets. 2<sup>e</sup> version. 12 Février 2001.

## Question 4

Les travaux de (Monpoeho 2001) étaient spécifiquement tournés vers les virus (entérovirus et HAV) dans les boues et leurs traitements. Les suivis ont eu lieu par cultures cellulaires (entérovirus) et par PCR. Un des objectifs atteints de la thèse était de disposer d'une méthode de mesure des HAV et des Entérovirus dans les boues par RT-PCR quantitative. Quatre filières de traitements ont été suivies : le chaulage, le compostage, le conditionnement thermique et la digestion anaérobie. Pour les entérovirus, en début de traitement la charge virale est de 37 à 288 NPPUC/g (ou 4 et 5 log copies de génomes/g). Seule la digestion anaérobie ne permet pas une chute sous le seuil de détection. Le VHA est détectable de façon irrégulière avant les traitements en fonction de la saison et de la STEP considérée. Les charges virales évoluent entre le seuil de détection et  $6.10^3$  copies de génomes/g. Du matériel génétique a été retrouvé une fois dans le compost, lors de la digestion et lors du conditionnement thermique. Notons que rien ne permet de prédire le potentiel infectieux des particules ainsi détectées (cf. question 3). Enfin, le typage des entérovirus a montré la prédominance des coxsackievirus et des échovirus.

Lors d'un programme conjoint d'Anjou Recherche, Lyonnaise des eaux, IRH environnement, NANCY, Université Henri Poincaré (Anjou Recherche *et al.* 2000) différentes boues ont été stockées en cuve pendant 8,5 mois. L'évolution de la qualité microbiologique des boues a été ainsi suivie, dans une boue d'aération prolongée, une boue digérée, une boue séchée, deux boues chaulées et une boue compostée. Les résultats sont  $<1$  UFP / 10 g MS pour la boue séchée, les boues chaulées et la boue compostée. Trois échantillons de boue d'aération prolongée ou de boue digérée (sur 8 analyses) ont montré une présence de 2 UFP / 10g MS, 2 UFP / 10g MS et 10 UFP / 10g MS.

Enfin, si une méthode de détection normalisée des virus dans les boues d'épuration n'existe pas encore, des travaux en ce sens sont en cours à l'AFNOR (méthode par culture)<sup>(31)</sup>.

### B.2.4 Risque viral et épandage

Le risque viral lié aux épandages est *a priori* faible. À notre connaissance aucune étude n'a jamais lié une épidémie virale à un épandage. Par ailleurs, la cellule de veille sanitaire vétérinaire<sup>(32)</sup> des épandages qui recueille et expertise des cas de pathologies vétérinaires potentiellement liés à un épandage n'a jamais pu incriminer formellement un épandage dans la survenue d'une pathologie animale, et ce depuis 1997<sup>(33)</sup>.

Quelques auteurs ont proposé une approche d'évaluation quantitative du risque viral lié aux épandages de boues. Les voies d'exposition concernées sont la voie aérienne (par aérosolisation de la boue lors de l'épandage) et l'ingestion (par consommation de cultures contaminées).

Dans une première étude (cette étude est détaillée dans la question 8), (Brooks *et al.* 2005a) ont évalué les risques pour les travailleurs réalisant les épandages et les riverains des parcelles épandues lors d'une exposition aux aérosols générés par l'épandage. Il ressort de ce travail que le risque est plus fort pour les travailleurs que pour les riverains et qu'à partir d'une distance de 10 m autour du point d'épandage, le risque lié à la dispersion de l'aérosol était en deçà de  $10^{-6}$ . Les hypothèses posées pour ce travail étaient majorantes et pour certaines conditions impossibles en France car interdites par la réglementation.

Concernant la voie alimentaire, un programme anglais, financé par les industriels de l'eau (UKWIR), le DEFRA (Department for Environment, Food and Rural Affairs) et l'Agence de l'environnement, a proposé une démarche d'évaluation des risques microbiologiques liés à la consommation de cultures ayant reçu des épandages de boues (Gale 2003, 2005). Entre autres micro-organismes, étaient étudiés les entérovirus. En conclusion de ce travail, le risque individuel annuel d'infection par les entérovirus des boues digérées épandues sur des légumes racines a été estimé à  $1,8.10^{-9}$ . La démarche présentée dans cette étude est détaillée dans la question 8.

**En conclusion, les mesures de virus ne sont pas nombreuses dans les boues en France. Il en ressort cependant que la charge est sujette à variations et que les traitements appliqués aux boues sont en général délétères pour les virus. Par ailleurs, au regard des quelques études disponibles, les risques viraux associés aux épandages de boues sont très faibles. Les boues de station d'épuration ne semblent pas être une source notable de danger viral.**

**Néanmoins, si elles sont peu stabilisées (boues liquides), ce risque peut augmenter. Cependant, les contraintes s'appliquant à l'épandage de ces matières sur les terres agricoles (distance de sécurité, restrictions d'usage...) permettent de maîtriser une éventuelle diffusion virale.**

(31) AFNOR. 2004. Rapport d'activité 2004, Caractérisation des boues.

(32) On s'intéresse ici aux animaux d'une part pour veiller à la sécurité des élevages mais en considérant également que les animaux sont sentinelles pour le risque humain.

(33) [http://www.ademe.fr/Collectivites/bois-energie/pages/Filiere/cellule\\_veille/default.htm](http://www.ademe.fr/Collectivites/bois-energie/pages/Filiere/cellule_veille/default.htm)

### B.3 Déchets (décharges et compostage)

La présence de changes, de pansements, de déchets organiques dans les déchets ménagers et assimilés s'accompagne de celle de micro-organismes dont des virus.

Leur présence dans les déchets a été rapportée par différents auteurs dans les années 1975-80. (De Bertoldi *et al.* 1983) ont proposé une liste de virus ayant été trouvés dans les déchets solides (et dans les boues résiduaires urbaines). Il s'agit d'entérovirus, du poliovirus, de coxsackie, d'échovirus, du virus de l'hépatite A, d'adénovirus et de réovirus.

L'incinération et la mise en stockage constituent les filières les plus utilisées pour l'élimination des déchets ménagers. L'incinération (à une température de 850°C au minimum) conduit à l'hygiénisation des déchets.

Les travaux de (Gray *et al.* 1993) ont montré que les virus (Hépatite A, poliovirus 1 et coliphages F+) pouvaient survivre plus de 90 jours dans les changes et dans les lixiviats de décharge en particulier à basse température (5 et 25°C). A 40°C, les virus étaient présents à un niveau non détectable après un délai de 8 à 29 jours dans les changes et après 2 jours dans les lixiviats (abattement >4 log). Cependant lors de la mise en décharge des déchets, l'oxydation de la matière organique facilement dégradable conduit à une montée en température (thermophase : 50-60°C) favorable à l'élimination des micro-organismes pathogènes.

Par ailleurs, les contraintes imposées actuellement pour la création des décharges vis-à-vis de l'étanchéité des sites (barrière passive argileuse, barrière active constituée d'une membrane en polymère, drainage des lixiviats) conduisent à ne pas considérer les centres de stockages de déchets comme des sources de contamination pour les eaux souterraines (ASTE 2005). Ceci vaut pour les virus.

Enfin le compactage pratiqué sur un très grand nombre de sites et la couverture rapide des alvéoles après exploitation s'opposent à la dissémination des micro-organismes par l'envol de déchets ou par les oiseaux qui peuvent coloniser les centres de stockage.

Les seuls effluents véhiculant une charge en micro-organismes sont les lixiviats issus de la percolation des eaux de pluies dans les déchets. Ces lixiviats qui doivent être captés font l'objet d'un traitement avant rejet dans le milieu superficiel. Les traitements classiques sont des traitements biologiques (boues activées, lagunage aéré) complétés éventuellement par un traitement physico-chimique (coagulation-floculation). Les lixiviats sont alors rejetés dans le milieu superficiel. Ceux-ci peuvent véhiculer une contamination microbiologique. Celle-ci a fait l'objet de peu d'études. Face aux limites des procédés de traitement classiques, les exploitants de décharges visent à supprimer les rejets de lixiviats traités utilisant l'osmose inverse et de la déshydratation des lixiviats en utilisant le biogaz comme combustible.

Dans une étude commanditée par les ministères en charge de l'environnement et de la santé, l'InVS a traité de la santé publique et du stockage (InVS 2004)<sup>(34)</sup>. Ce travail réunissant de nombreux experts cite une recherche des virus entériques dans les décharges où sur 110 échantillons, après 25 ans de stockage, trois analyses PCR se sont avérées positives. Tant pour les virus que pour les autres micro-organismes, le groupe de travail de cette étude conclut à un manque de données concernant le stockage et le risque microbiologique.

Les unités de compostage des déchets ménagers bruts n'existent plus qu'en nombre limité. Il en existe environ 70 parmi les 500 plates-formes recensées en France. Les virus sont présents dans les ordures ménagères notamment par la présence de couches souillées (sauf pour les cas de couches issues de patients des services de maladies infectieuses des hôpitaux). La plupart des unités compostent aujourd'hui des déchets verts auxquels peuvent être mélangés des déchets organiques dont des boues.

Le compostage vise à stabiliser les déchets par une oxydation aérobie. Celle-ci s'accompagne de la montée en température des déchets qui, selon la nature des matériaux, leur teneur en eau et leur aération, peut atteindre 70°C. Cette montée en température constitue un élément favorable à l'élimination des virus qui sont sensibles aux températures élevées. Il faut cependant signaler que la montée en température est conditionnée par la teneur en eau des déchets et par une aération correcte des andains. L'hygiénisation de certains lots de compost peut être en conséquence incomplète. Toutefois, avant utilisation agricole, le compost fait l'objet d'une maturation (plusieurs mois) au niveau de l'unité de compostage ou en bout de champ afin d'achever sa stabilisation. Au final le compost est incorporé au sol. S'agissant d'un amendement, ce produit n'est pas apporté chaque année sur une même parcelle.

(34) ce document est disponible en ligne [www.invs.sante.fr](http://www.invs.sante.fr)

## Question 4

Les informations concernant la présence de virus dans les déchets sont peu nombreuses. Les risques associés aux virus présents dans les déchets sont maîtrisés au niveau des filières de collecte (spécifiques pour les déchets d'activité de soins à risques infectieux (DASRI)) et par les modes d'élimination des déchets utilisés (incinération, stockage). Les conditions qui prévalent dans les déchets ne sont pas favorables à la survie des virus et ceux-ci ne devraient plus être détectés à la fin d'un compostage bien mené.

### C. Persistance, survie et transfert des virus dans l'environnement (sol, eaux de surface, sédiments et eaux souterraines)

#### C.1 Sol

Les virus peuvent être introduits dans les eaux souterraines par différents usages du sol. Les épandages de boues résiduaires et plus rarement en France d'effluents urbains constituent ainsi des sources de contamination des sols et des eaux. L'épandage de ces produits est réalisé sur le sol. Les systèmes d'épandage des dispositifs d'assainissement autonome, qu'ils soient installés en terrain naturel ou en sol reconstitué (filtres à sable), s'accompagnent de l'infiltration en sub-surface du sol d'effluents véhiculant une contamination microbiologique. Ces dispositifs fonctionnent avec de faibles charges (4 cm/j). Il existe aussi des dispositifs à haute charge (bassin d'infiltration, 60 cm/j). Ceux-ci, peu développés en France, sont en général réservés à l'infiltration d'effluents tertiaires à la différence de beaucoup de dispositifs décrits aux États-Unis. Les réseaux d'assainissement qui présentent en raison de leur vieillissement des déboitements et des phénomènes de corrosion, de même que les anciennes décharges établies sur des terrains perméables peuvent également favoriser la percolation de virus dans le sous-sol.

Les travaux concernant la présence de virus dans les eaux souterraines se sont développés en parallèle avec les méthodes de numération des virus viables sur cultures cellulaires autour des années 1970-80. Le développement des méthodes de PCR depuis 1990 a renouvelé l'intérêt pour la recherche des virus dans l'environnement.

La connaissance de la présence et de la survie des virus dans les eaux souterraines provient de différents types d'études. Il s'agit d'abord des études réalisées pour la mise au point des méthodes d'analyse ainsi que des recherches virales effectuées à l'occasion d'épidémies hydriques associées à la consommation d'eau souterraine contaminée.

De nombreuses études se sont aussi intéressées au risque de transfert des virus lors de l'infiltration d'eaux usées vers les nappes. Les études ont été réalisées soit sur des installations pilotes, soit sur des dispositifs d'épuration ou d'irrigation de taille réelle. Les zones humides utilisées pour le traitement des effluents (« wetlands », « cypress dom » aux États-Unis) ont aussi fait l'objet d'études.

Les caractéristiques des effluents infiltrés varient largement et il peut s'agir d'effluents primaires (fortes charges en micro-organismes mais aussi fortes charges en matière organique), d'effluents secondaires (charges en micro-organismes un peu plus faibles mais beaucoup moins de matières organiques), voire d'effluents tertiaires ou d'eaux grises.

Plusieurs auteurs se sont intéressés à la survie des virus dans le milieu souterrain en recourant le plus souvent à des essais en pilote dans l'objectif de déterminer les facteurs contribuant à leur élimination.

Peu d'auteurs ont travaillé directement sur le milieu souterrain en raison de la complexité des études. Il existe cependant des travaux récents pour lesquels les informations hydrogéologiques fournies permettent d'éclairer le transfert dans les nappes.

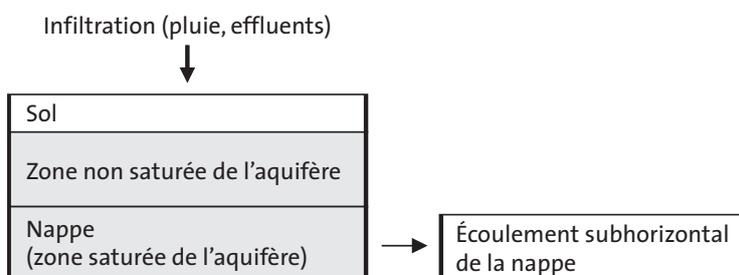
Les micro-organismes étudiés sont soit des phages, soit des virus. Il peut s'agir alors de virus cultivés ou de virus indigènes présents dans les eaux usées.

## C.1.1 Les virus dans les sols

### C.1.1.1 Rappels sur la structure du sol et du sous-sol

La Figure 6 présente la coupe du sol (voire du sous-sol) avec les différents compartiments où la rétention des virus est possible.

Figure 6 : compartiments du sol réservoir de virus



Plusieurs facteurs influencent la rétention des virus dans le sol et parmi ceux-ci le type de sol, le pH, la minéralisation de l'eau qui s'infiltré, la présence dans celle-ci de matières organiques dissoutes, le type de virus, l'état de saturation du sol et le flux d'infiltration.

### C.1.1.2 Type de sol

Les virus sont retenus dans les sols principalement par des phénomènes d'adsorption. La rétention des virus dans le sol est indépendante de la concentration en virus. (Moore *et al.* 1981) rapportent l'adsorption de  $2,2 \cdot 10^6$  virus par g/sable. Les mêmes auteurs ont montré que la capacité d'adsorption du poliovirus sur 34 sols variait de 16 à 79 % pour un sol organique et atteignait 99,99 % pour un sable riche en oxydes métalliques. Il est admis que les sols de texture fine retiennent plus efficacement les virus que les sols sableux, la très forte capacité d'adsorption des argiles s'expliquant par la surface développée considérable de ces minéraux et leur capacité d'échange ionique. La teneur en argile est de ce fait déterminante vis-à-vis de la fixation des virus (Drewdy & Eliassen 1968). La présence d'oxydes de fer peut accroître la capacité de rétention des virus par certains sols. Les caractéristiques du sol auront une influence déterminante sur le mouvement des virus en sub-surface.

### C.1.1.3 pH du sol

Les virus possèdent comme les protéines une charge électrique qui dépend du pH du milieu où ils sont en suspension. Pour des  $\text{pH} > 7$  les virus sont chargés négativement. Il n'est cependant pas possible de conclure directement que l'adsorption est minimale pour des pH alcalins et que celle-ci est maximale en sol acide car d'autres facteurs tels que la présence de certains composés (argiles, oxydes de Al et Fe, acides humiques et fulviques) influent sur le comportement des virus, dont certains possèdent par ailleurs deux points isoélectriques (Gerba & Bitton 1984).

### C.1.1.4 Caractéristiques de l'eau d'infiltration

La concentration et les espèces dissoutes présentes dans l'eau qui s'infiltré interviennent sur l'importance de l'adsorption des virus. Celle-ci s'accroît avec la minéralisation et certaines espèces ioniques (cations divalents) l'influencent beaucoup. En conséquence l'infiltration d'eau usée est favorable à la rétention des virus alors que l'infiltration des pluies très peu minéralisées conduit à la redistribution des virus selon les profils (Duboise *et al.* 1976, Lance *et al.* 1976, Sobsey *et al.* 1980a), et avec de fortes pluies, la remobilisation des virus peut s'accompagner de la contamination de captages d'eau souterraine (Wellings *et al.* 1975).

Les matières organiques dissoutes dans les eaux, telles que les acides humiques et fulviques, viennent en concurrence avec les virus dans les phénomènes d'adsorption. Ces matières peuvent en conséquence favoriser le transport des virus dans les sols organiques en particulier lors de l'épandage ou de l'infiltration d'effluents.

### C.1.1.5 Type de virus

Les capacités d'adsorption et d'élution dans le sol varient avec le type de virus. (Gerba *et al.* 1979) ont comparé l'adsorption de 27 entérovirus, d'un virus de singe (SA 11) et de 5 phages. À l'exception des Échovirus 1, 12, 29, du virus SA11 et du phage f2, les virus sont bien adsorbés. Le mouvement des virus est contrôlé par l'interaction entre le type de virus, le type de souche, le type de sol et d'autres facteurs connus ou inconnus.

### C.1.1.6 Conditions de saturation du sol et flux d'infiltration

En conditions de non-saturation, les virus viennent au plus près des particules du sol, ce qui accroît les opportunités d'adsorption. Beaucoup d'essais sur colonnes ont été réalisés en conditions de saturation qui conduisent au final à sous-estimer les capacités de rétention des virus par le sol. De plus, la dessiccation du sol entre deux apports d'effluents limite la désorption lors d'épisodes pluvieux ultérieurs.

Aux conditions de saturation s'ajoutent la vitesse d'infiltration de l'eau donc l'importance de la lame d'eau appliquée. Green cité par (Gerba 1984) a observé que la rétention des virus s'accroissait avec la diminution du flux d'infiltration pour des effluents de fosse septique.

### C.1.2 Survie des virus dans le sol

Il est aujourd'hui admis que certains virus associés au sol peuvent être désorbés et redistribués dans le sol à la faveur de la modification de certaines caractéristiques de la solution du sol (force ionique par exemple). Ceci peut conduire à la contamination de la nappe sous jacente. La contamination de celle-ci peut résulter de la persistance des virus dans le sol.

L'exposition au rayonnement solaire est la première des causes d'inactivation de virus pouvant être présents dans les effluents épanchés en surface du sol. Ce phénomène est cependant moins important que dans le cas des eaux superficielles.

La température est probablement le facteur le plus important vis-à-vis de l'inactivation des virus dans l'environnement. Pour des températures basses la survie des virus est accrue en comparaison de celle observée pour des températures plus élevées. Une étude réalisée aux États-Unis a montré que parmi les caractéristiques chimiques et physiques des eaux étudiées, seule la température était significativement corrélée avec le rapport d'inactivation des virus (Yates *et al.* 1998). La survie des virus dans les sols est aussi affectée par la température. Ainsi du Poliovirus a persisté 180 j en sol sableux et sablo-organique à 4°C alors qu'aucun virus n'était retrouvé après 12 j dans ces sols pour une température de 37 °C (Yeager & O'Brien 1979).

La dessiccation du sol contribue aussi à l'élimination des virus dans les sols.

La teneur en argile des sols, qui influence l'écologie microbienne dans ceux-ci, pourrait favoriser le maintien des virus en les protégeant de l'action des nucléases.

Des comparaisons de survie des virus dans des eaux brutes ou filtrées, voire stériles, montrent que l'activité microbienne pourrait contribuer à l'inactivation des virus. Certains auteurs ont toutefois conclu à l'absence d'effet de l'activité microbienne. La libération d'enzymes protéolytiques par les bactéries pourrait détruire la capsid de certains virus. La production d'autres composés par les micro-organismes (tannins, phénols...), qui pourraient être des agents réducteurs ou oxydants inactivant les virus, est aussi notée (Melnick & Gerba 1980).

### C.1.3 Transfert en milieu poreux saturé

La propagation et la survie des virus dans les aquifères ont été étudiées de manière poussée au laboratoire dans des essais sur colonnes et en batch. L'influence de la saturation ou non du milieu, la présence de matière organique, et divers facteurs physiques tels que la température et le pH ont été particulièrement étudiés (Lance *et al.* 1982, Lance & Gerba 1984, Powelson *et al.* 1991, Straub *et al.* 1992a). Les résultats dans le milieu naturel sont beaucoup moins abondants et la connaissance de la porosité, de la distribution des perméabilités dans les aquifères ainsi que des conditions aux limites est encore insuffisante pour permettre d'établir aisément une relation éventuelle entre la propagation des virus et les conditions hydrogéologiques locales.

Le Tableau 24 extrait d'une étude de (Yates & Yates 1988) présente une synthèse des informations disponibles quant au transfert vertical et horizontal des virus dans les années 1980.

Tableau 24 : synthèse des informations disponibles quant au transfert vertical et horizontal des virus dans les années 1980

Micro-organismes	Milieu	Distances maximales traversées (m)		Référence
		Verticale	Horizontale	
Bactériophage	Sable	45,7	400	(Aulenbach 1979)
	Argile sableuse	1,2		(McGauhey & Krone 1954, Merrell 1967)
	Argile	0,85		(Merrell 1967)
	Argile à blocaux		510	(Martin & Thomas 1974)
	Grès		570	(Martin & Thomas 1974)
Coliphage f2	Sable limoneux	29	183	(Shaub & Sorber 1977)
Coliphage T4	Calcaire karstifié		1 600	(Fletcher & Myers 1974)
Coxsackievirus B3	Sable fin argilo limoneux	18,3		(Keswick & Gerba 1980)
	Sable	22,8	408	(Vaughn & Landry 1977)
Échovirus	Sable gros + gravier fin	11,3	45,7	(Vaughn et al. 1978)
Entérovirus	Sable argilo limoneux	3,5	14,5	(Hain & O'Brien 1979)
Poliovirus	Limon argilo sableux	0,4		(Gerba & Lance 1978)
	Sable moyen		0,6	(Green & Cliver 1974)
	Sable argilo limoneux	1,6		(Lance & Gerba 1980)
	Sable	0,2		(Lefler & Kott 1974)
	Limon argileux			(Stramer 1984)
	Sable fin à moyen		46,2	(Stramer 1984)
	Sable moyen argilo limoneux		9	(Stramer 1984)
	Sable	9,1	6	(Vaughn & Landry 1977)
	Sable Gros + gravier fin	10,6		(Vaughn et al. 1978)
	Sable Gros + gravier fin	7,62	3,0	(Vaughn et al. 1981)
Virus	Sable	6		(Wellings et al. 1975)
	Argile sableuse	3		(Wellings et al. 1975)
	Sable	38		(Wellings et al. 1975)
	Sable + gravier gros	16,8	250	(Koener & Haws 1979)

Source (Yates & Yates 1988)

Le transfert des virus dans les terrains fracturés en zone de socle (schistes, grès, granits) est possible, si la roche est nue et la fracturation ouverte (De Serres *et al.* 1999). Celui-ci est encore plus aisé en terrain carbonaté où les fractures peuvent être élargies par les processus de dissolution (Lawson *et al.* 1991), les bactériophages étant d'ailleurs utilisés comme traceurs du mouvement des eaux dans le karst (Keswick *et al.* 1982, Beaudeau *et al.* 1997).

Peu d'études ont par contre été consacrées au transfert des virus en milieu poreux saturé en raison des difficultés d'expérimentation. Les résultats d'études pour lesquelles le contexte hydrogéologique est décrit avec précision sont présentés dans le Tableau 25.

## Question 4

Tableau 25 : études bibliographiques mentionnant le transfert en milieu poreux saturé

Auteurs	Virus étudiés	Caractéristiques hydrogéologiques	Observations
(Noonan & McNaab 1979)	Phages	Graviers bien triés $K = 6,2 \cdot 10^{-2} \text{ m/s}$	Transport sur 900 m, vitesse $>300 \text{ m/j}$
(Rossi et al. 1994)	Phages T7 et f1, T7 : ( $8,9 \cdot 10^{13}$ : 960 ml et f1 : $9,6 \cdot 10^{13}/2 \cdot 280 \text{ ml}$ ) + colorant	Alluvions $K = 10^{-4}$ à $10^{-5} \text{ m/s}$ avec un paléo chenal : $K = 10^{-3} \text{ m/s}$	Vitesse des phages 3,15 fois supérieure à celle du colorant, phages subissent une dispersion mais pas de retard, concentrations de 1 phage T7/ml à 162 m après 219 h et de 1 phage f1/ml à 112,5 m après 243 h
(Bales et al. 1995)	Phages PRD-1 ( $1,4 \cdot 10^{10}$ PFU l-1) + bactéries+ microsphères de latex et traceur (NaBr)	Sables et graviers ( $K = 0,7-1,4 \cdot 10^{-3} \text{ m/s}$ )	Vitesse de 0,2 à 1 m/j, retard par rapport au traceur, atténuation de la contamination en PRD-1, (1-3 PFU mL-1 à 14 m). ; <sd au-delà de quelques dizaines de mètres ; un pH modifié (de 5,7 à 8,3) entraîne un relargage de virus
(Sinton et al. 1997)	Phages présents dans l'eau d'irrigation ou F-RNA, injection de $3,18 \cdot 10^{13}$ de F-RNA et $6,5 \cdot 10^{12}$ UFP/100 mL de phages somatiques	Graviers d'origine glaciaire bien triés, $K = 6,2 \cdot 10^{-2} \text{ m/s}$	Les pics de concentration mesurés à 385 m sont de $3,9 \cdot 10^2$ F-RNA et $4,5 \cdot 10^3$ phages somatiques et de $6,5 \cdot 10^3$ F-RNA et de $6,5 \cdot 10^3$ phages somatiques à 401 m, soit un abattement $>9 \log$
(De Borde et al. 1999)	Coliphages MS2 ( $10^9$ PFU/mL) et $\phi X174$ ( $1,12 \cdot 10^6$ PFU /mL)	Sable et gravier, $K = 2,7- 3,5 \cdot 10^{-3} \text{ m/s}$	Vitesse 1 à 2,9 m/j, abattement : $1\log/2,5\text{m}$ (MS2) et $1\log/5 \text{ m}$ ( $\phi X174$ ), survie des virus supérieure à 9 mois
(Flynn et al. 2004)	Phages H40/1 ( $6,3 \cdot 10^{14}$ UFP/L)	Graviers de sable et de limon $K = 5 \cdot 10^{-4}$ à $10^{-2} \text{ m/s}$	Concentrations retrouvées à 60 m après 165 h correspondent, $1,46 \cdot 10^2$ et $6,3 \cdot 10^{-2\%}$ de la concentration initiale

### C.1.4 Conclusions

Les études abordant le transfert dans la zone saturée montrent que celui-ci est possible mais surtout dans des aquifères fissurés (karstiques ou parfois de socle) ou pour des aquifères poreux présentant des perméabilités élevées ( $K=10^{-2}-10^{-3} \text{ m/s}$ ). Dans les milieux poreux le transfert ne s'opère que sur des distances limitées. Dans tous les articles étudiés s'intéressant au transfert en zone saturée il a été nécessaire d'injecter les virus directement dans la nappe pour obtenir des résultats, le sol et la zone non saturée plus globalement, constituant une barrière au transfert des virus vers la nappe.

L'abattement en virus dans la zone saturée est sous-estimé, la filtration, la sédimentation et l'adsorption irréversible n'étant en général pas prises en compte (Sinton *et al.* 1997).

### C.2 Eaux de surface

La qualité microbiologique des eaux de surface, eaux douces et marines, est directement influencée par les activités anthropiques et peut être altérée par des apports fécaux d'origine humaine ou animale. De la même façon, les animaux domestiques ou sauvages éliminent des virus entériques susceptibles de constituer un danger pour leur population voire pour l'homme dans certains cas (VHE par exemple).

Les principales sources de contamination sont les rejets des stations d'épuration collectives des eaux usées urbaines ou industrielles, des dispositifs d'assainissement autonomes individuels et des eaux de ruissellement. Les aléas climatiques peuvent contribuer aux débordements des ouvrages d'assainissement, à la remise en suspension de sédiments et au transport à distance des charges virales. Les eaux douces superficielles utilisées pour la production d'eau potable représentent un tiers des ressources en eau en France (2 milliards de  $\text{m}^3/\text{an}$  avec 4 % des captages). Elles sont également utilisées pour l'irrigation et l'arrosage des cultures. Les lacs, les cours d'eau et les zones côtières sont fréquentés pour des activités ludiques nautiques. La conchyliculture utilise, quant à elle, des ressources d'eau de mer. La présence de virus entériques dans les eaux de surface fait émerger 2 situations à risque, la consommation d'eau ou d'aliments et le contact lors de baignades.

Les virus peuvent s'adsorber sur les sédiments (Schwarztbrod *et al.* 1987) et en particulier sur les argiles. Ils vont constituer ainsi des réservoirs à partir desquels les virus peuvent être remobilisés et dispersés à distance lors de perturbations des fonds survenues en périodes de crues, d'inversion thermique, de travaux.

## C.2.1 Les eaux douces

### C.2.1.1 Température

Si le froid ( $T < 10^{\circ}\text{C}$ ) contribue à la persistance des virus, des températures supérieures à  $20\text{-}25^{\circ}\text{C}$  favorisent l'inactivation virale. Ainsi, (Hurst *et al.* 1989), ont évalué la persistance du caractère infectieux de 3 entérovirus (coxsackie virus B3, échovirus 7 et poliovirus 1) dans différentes eaux douces superficielles ; ils ont obtenu des réductions moyennes de 6,5 à 7 log après 8 semaines à  $22^{\circ}\text{C}$ , de 4 à 5 log après 12 semaines à  $-1^{\circ}\text{C}$  et de 0,4 à 0,8 log après 12 semaines à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ces valeurs sont 10 fois plus élevées que celles obtenues dans les sols ou les boues résiduaires aux mêmes températures.

Des essais menés sur le poliovirus en suspension en tampon phosphate (PBS) (Nuanualsuwan & Cliver 2003) ou en eau minérale (Gassilloud *et al.* 2003) montrent que la capsid virale est plus sensible à la chaleur que le génome. En eau de rivière, le génome du poliovirus est détecté plus longtemps que le pouvoir infectieux à 4, 18 et  $25^{\circ}\text{C}$  (Skraber *et al.* 2004b).

### C.2.1.2 Ensoleillement et UV

Les données relatives à l'action du rayonnement solaire vis-à-vis des virus indigènes dans les eaux naturelles restent parcellaires et concernent essentiellement des bactériophages et des virus des animaux (Rijal & Fujioka 2001, Sinton *et al.* 2002, Kitamura *et al.* 2004). Toutefois, l'efficacité des UV vis-à-vis des différents types de virus humains est évaluée en situation expérimentale. Les virus à ADN tels les adénovirus sont plus résistants à l'action des UV que les virus à ARN (Gerba *et al.* 2002b).

### C.2.1.3 Caractéristiques physico-chimiques et biologiques

La turbidité et la concentration en matières en suspension ont un effet bénéfique pour la persistance des entérovirus, tandis que la dureté, la conductivité et la présence de bactéries en phase de multiplication favorisent l'inactivation virale (Hurst *et al.* 1989). (Ward *et al.* 1986b) suggèrent que la flore bactérienne viable produit des enzymes capables de cliver les protéines virales exposant l'ARN à la digestion par des nucléases.

### C.2.1.4 Phase particulaire

Dans les eaux usées traitées (Hejkal *et al.* 1981), les eaux d'estuaire (Metcalf *et al.* 1984) et les eaux de rivière (Payment *et al.* 1988), les virus sont préférentiellement attachés à des particules de moins de  $0,3\ \mu\text{m}$  de type argile et limon.

Les virus associés aux particules de taille supérieure à  $6\ \mu\text{m}$  ont tendance à sédimenter dans les fonds qui peuvent constituer des réservoirs potentiels de dissémination en présence de turbulence. Les virus fixés à des particules ou à des colloïdes de moins de  $3\ \mu\text{m}$ , quant à eux, restent en suspension dans l'eau où ils pourront être captés par les ouvrages de potabilisation.

### C.2.1.5 Contamination virale

L'abondance virale des eaux de surface est directement influencée par l'implantation et les volumes des rejets des collectivités humaines ou animales sur les bassins versants. Les concentrations rapportées dans la littérature sont difficilement comparables entre elles, compte tenu des informations restreintes relatives aux caractéristiques locales et des systèmes de détection très différents.

En région parisienne, une surveillance virologique mensuelle des prises d'eau, sur la Seine et sur la Marne à hauteur du point de captage de 2 usines de potabilisation, met en évidence des concentrations d'entérovirus de 1 à 7 PFU/50L dans 0 à 73 % des échantillons selon les années (Duguet & Montiel 2002).

Le suivi de la contamination virale de la Moselle, de décembre 2000 à mai 2002, a permis la mise en évidence de génomes d'entérovirus en période estivo-automnale ou de norovirus en hiver dans 38 % des échantillons de 500 mL et ce, en l'absence de détection d'entérovirus infectieux (Skraber *et al.* 2004a).

## Question 4

Lors d'une étude réalisée sur l'Orne (AESN 2003), les investigations ont porté sur 3 types de virus : les entérovirus, le virus de l'hépatite A et les rotavirus. D'octobre 1999 à décembre 2001, 349 échantillons (eaux, sédiments et coquillages) recueillis mensuellement ont été analysés virologiquement et bactériologiquement. 43 % des prélèvements contenaient des génomes de virus et 53 % des virus infectieux. À noter qu'au terme de cette étude, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre la contamination virale d'une part et la contamination bactériologique et bactériophagique d'autre part, soulignant l'importance de réaliser une analyse virologique et non d'indicateur de contamination fécale pour représenter correctement le risque viral.

(Sedmak *et al.* 2005) détectent des virus cultivables dans 6,8 à 10,9 % des échantillons prélevés dans 2 prises d'eau du lac Michigan aux États-Unis ; les réovirus y sont fréquents et présentent une prédominance hivernale avec des concentrations maximales de 59 MPN/100 L. Au Japon, une surveillance mensuelle de la contamination virale d'une rivière en milieu urbain fait apparaître une prédominance des entérovirus en été-automne, la présence de poliovirus après les campagnes vaccinales et un pic en hiver pour les réovirus ; les concentrations sont comprises entre 0 et 325 PFU/L (Tani *et al.* 1995). En Finlande, (Hörman *et al.* 2004) détectent des norovirus essentiellement dans 2 des 30 sites examinés et ce, quelle que soit la saison.

En Grande-Bretagne, 12 % des eaux de rivière ont été trouvées positives en norovirus avec une concentration estimée entre 0 et 1 600 ADNc copies par litre (Laverick *et al.* 2004).

(Lodder & De Roda Husman 2005) mettent en évidence, dans l'ensemble des échantillons prélevés dans 2 rivières des Pays-Bas, recevant des rejets d'eaux résiduaires, des concentrations de norovirus de 4 à 4 900 PCR-detectable units (PDU) par litre, de rotavirus de 57 à 5 386 PDU/L, d'entérovirus de 2 à 10 PFU/L et de réovirus à 0,3 à 2 PFU/L.

(Jiang & Chu 2004) détectent par nested-RT-PCR et PCR la présence d'adénovirus, d'entérovirus et de VHA dans 52 à 76 % des échantillons d'eau de surface dans le sud de la Californie (USA) et ce, sans relation claire avec les indicateurs bactériens. À la différence de (Haramoto *et al.* 2005) qui détectent dans une rivière du Japon, des norovirus, adénovirus, entérovirus et torque teno virus par PCR dans 67 % des échantillons et obtiennent une forte corrélation avec les coliformes fécaux et les phages F-spécifiques.

À l'aide d'une technique associant des cultures cellulaires à une RT-multiplex nested PCR, (Chapron *et al.* 2000), (Spinner & Di Giovanni 2001) et (Lee *et al.* 2004) détectent des astrovirus, des entérovirus, des réovirus ou des adénovirus dont les types 40 et 41 dans des échantillons et en précisent le caractère infectieux.

En 1988, une épidémie d'hépatite A dans un camp militaire situé dans les Pyrénées a été reliée à la présence de VHA dans la rivière utilisée pour l'alimentation en eau potable, malgré l'absence d'indicateurs fécaux et une concentration en chlore résiduel de 0,2 mg/L. À noter que si la souche épidémique a pu être détectée par RT-PCR, la culture cellulaire est restée négative (Bosch *et al.* 1991).

(Payment *et al.* 1986) rapportent la large dissémination d'entérovirus porcins, avec un pic estival, (0,6 à 6 NPPUC/L) dans le bassin de la rivière Assomption au Canada qui comprend un grand nombre d'élevages de porcs. Pour définir l'origine de la contamination, élevage de bétail ou activités humaines, (Fong *et al.* 2005) ont utilisé une méthode de RT-nested PCR pour caractériser les entérovirus animaux et humains et les adénovirus humains de la rivière Altamaha en Géorgie. Les 3 groupes de virus sont détectés dans 37 à 57 % des échantillons avec une prédominance hivernale lorsque la température de l'eau s'abaisse à 10°C et le débit atteint 300 m<sup>3</sup>/sec.

Ainsi, selon la méthodologie utilisée pour la recherche des virus (culture cellulaire ou biologie moléculaire), le Tableau 26 expose les valeurs de contamination des milieux qui sont assez classiquement retrouvées dans la littérature.

Au niveau européen et par une revue de la littérature (Carrington 2001), la concentration en entérovirus dans les eaux superficielles est estimée dans une fourchette de 0-10<sup>2</sup> L<sup>-1</sup> (0-10<sup>4</sup> L<sup>-1</sup> par les techniques de biologie moléculaire).

**De nombreuses sources de contamination sont possibles mais elles semblent plutôt liées aux points de rejet d'eaux résiduaires. Ces contaminations semblent également parfois fonctions de la saison (aléas climatiques, température de l'eau), en liaison avec des épisodes cliniques connus. Il faut noter néanmoins qu'elles peuvent être découplées des indicateurs classiques de contamination fécale. Enfin, on peut regretter le peu de données disponibles à l'échelle nationale, les nombreuses informations Nord Américaines n'étant pas toujours extrapolables.**

Tableau 26 : présence de virus humains dans les eaux de surface

Virus	Site	Date	Culture cellulaire		Biologie moléculaire		Référence
			% échant. $\oplus$	Concentration	% échant. $\oplus$	Concentration PDU/L <sup>(35)</sup>	
Virus cultivables (Réovirus)	Lac Michigan États-Unis		6,8 % à 10,9 %	59MPN/100L (réovirus – hiver)			(Sedmak <i>et al.</i> 2005)
Entérovirus (animaux et humains) et adénovirus	Rivière Altamaha - Géorgie	Prédominance hiver T° <10°C			37 à 57 %		(Fong <i>et al.</i> 2005)
Entérovirus						10 à 10 <sup>3</sup> PDU/L	(Rutjes <i>et al.</i> 2005)
Astrovirus						10 <sup>3</sup> à 10 <sup>8</sup> équivalent génome/L	(Pusch <i>et al.</i> 2005)
Norovirus	Allemagne					10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup> équivalent génome/L	
Entérovirus						10 <sup>2</sup> équivalent génome/L	
Norovirus, adénovirus, entérovirus et torque teno virus					67 % (forte corrélation indic. Bact.)		(Haramoto <i>et al.</i> 2005)
Norovirus						4 à 4 900 PDU/L	
Rotavirus	Rivières - Pays-Bas					50 à 5 386 PDU/L	(Lodder & De Roda Husman 2005)
Entérovirus				2 à 10 PFU/L			
Réovirus				0,3 à 2 PFU/L			
Entérovirus	Moselle - France	Déc. 00 à mai 02	Abs.		38 % (500 ml) été-automne		(Skraber <i>et al.</i> 2004a)
Norovirus	Finlande		2/30 sites				(Hörman <i>et al.</i> 2004)
Norovirus	Grande-Bretagne				12 %	0 à 1 600 PDU/L	(Laverick <i>et al.</i> 2004)
Adénovirus, entérovirus et VHA	Eaux de surface - Californie				52 à 76 % (pas corrélation indic. Bact.)		(Jiang & Chu 2004)
Entérovirus, virus de l'hépatite A et rotavirus	Orne (Caen à la mer) - France	Oct. 99 à déc. 01	43 %		53 %		(AESN 2003)
Entérovirus	Marne (points capatages) - France		0 à 73 %	1 à 7 PFU/50 L			(Duguet & Montiel 2002)
Entérovirus	Rivière milieu urbain- Japon	Été automne					
Polivirus		Suite campagne vaccinale		0 à 325 PFU/L			(Tani <i>et al.</i> 1995)
Réovirus		Été					
Entérovirus porcins	Bassin rivière Assomption - Canada	Pic estival		0,6 à 6 NPPUC/L			(Payment <i>et al.</i> 1986)

(35) PCR-detectable units par litre.

## C.2.2 Les eaux de mer

### C.2.2.1 Transport

Les virus peuvent être disséminés à distance de leur point d'émission. (Hugues *et al.* 1979) et (Finance *et al.* 1982) n'ont pas observé de dilution des entérovirus à plus de 200 mètres du rejet en mer où les concentrations restent de l'ordre de 1 MPNCU/L (minimum : 0,1 ; maximum : 27). Des essais de traçage réalisés avec des bactériophages injectés dans des rejets domestiques mettent en évidence une migration rapide vers le littoral qui est influencée notamment par les marées et la nature poreuse des terrains (Paul *et al.* 1995).

### C.2.2.2 Température

L'augmentation de la température diminue la survie des virus dans l'eau de mer. Une réduction de 90 % de poliovirus et de parvovirus est obtenue en 3 jours à 28°C et en 10 jours à 6°C (Wait & Sobsey 2001). (Wetz *et al.* 2004) observent que le passage de 22°C à 30°C de la température de l'eau de mer filtrée entraîne une réduction du pouvoir infectieux et de l'ARN de poliovirus qui est plus rapide dès 22°C en eau de mer non filtrée, c'est-à-dire en présence de flore bactérienne.

### C.2.2.3 Phases particulières

(Rao *et al.* 1986)

L'adsorption des virus sur des particules favorise la persistance du pouvoir infectieux. En absence de particules, des entérovirus et rotavirus infectieux disparaissent en 9 jours alors qu'ils persistent 19 jours en leur présence (Rao *et al.* 1984a). Dans les estuaires, les entérovirus sont essentiellement présents sur les matières en suspension (LaBelle & Gerba 1979). Une estimation de la répartition des virus isolés dans la baie de Galveston (États-Unis) indique que la majorité des virus est associée à des particules en suspension de taille < 3 µm et à des sédiments floconneux. (Schernewski & Julich 2001a) évaluent l'impact spatial du rejet de produits résiduaux dans l'estuaire de l'Oder et suggèrent que seuls les virus associés à des particules sont capables de rester infectieux et d'être disséminés à distance.

### C.2.2.4 Contamination virale

Des études conduites, en Méditerranée ou aux États-Unis, le long des zones côtières montrent la présence de différents virus dans les eaux marines : norovirus, rotavirus, HAV, adénovirus, entérovirus, réovirus.

La contamination est associée, très souvent, à des rejets de produits résiduaux d'origine humaine ou animale. Elle est influencée également par les précipitations comme l'ont rapporté (Lipp *et al.* 2001c) en Californie où des entérovirus ont été détectés préférentiellement pendant l'épisode du El Niño en 1997-1998.

En Floride, 60 % des eaux analysées se sont révélées positives en entérovirus par RT-PCR avec un impact direct sur la qualité des éponges au contact de ces eaux (Donaldson *et al.* 2002). Des analyses d'échantillons de coraux en Floride ont également été positives en entérovirus à une concentration plus élevée que dans les eaux environnantes (Lipp *et al.* 2002). En Californie, 32 % des échantillons d'eaux ont été détectés positifs par RT-PCR (Noble & Fuhrman 2001a).

Les adénovirus ont été retrouvés à des concentrations variant de 880 à 7 500 copies de génome par litre d'eau dans des eaux côtières de la baie de Santa Monica (Jiang *et al.* 2001). Très peu de données sont disponibles sur la contamination des eaux côtières françaises. Parmi 26 échantillons analysés dans le sud-ouest, seul un échantillon s'est avéré positif en norovirus (genogroupe 1) alors que les recherches en entérovirus, rotavirus, virus de l'hépatite A et adénovirus étaient négatives (Schvoerer *et al.* 2000). Dans cette même région, l'analyse de 226 échantillons d'eau de baignade, a montré la présence d'entérovirus dans 10 prélèvements avec des concentrations, estimées par RT-PCR compétitive, variant de 3,7 10<sup>2</sup> copies/mL à 7 10<sup>4</sup> copies/mL (Schvoerer *et al.* 2001).

Il faut toutefois savoir qu'en Floride le rejet des effluents domestiques plus ou moins traités se fait dans des calcaires (anciens massifs coralliens) affectés de phénomènes de dissolution donc sans filtration par des bassins d'infiltration (600 à 700) et par 25 000 dispositifs d'assainissement autonome (données 1994). Les eaux dont les vitesses d'écoulement dans le terrain sont comprises entre 2,5 et 35 m/h rejoignent alors rapidement le milieu marin (Paul *et al.* 1997).

**La contamination des eaux de mer est en partie liée à celle des eaux douces. Elle est associée souvent en zone littorale à des rejets d'eaux résiduaux sur les zones côtières. Les phénomènes météorologiques particuliers aggravent ces phénomènes de contamination (pluies). On peut là encore regretter le manque de données concernant les eaux côtières françaises, les résultats d'enquêtes nord-américaines étant rarement extrapolables.**

Tableau 27 : présence des virus humains dans les eaux marines

Virus	Site	Maximum % d'échantillons positifs par culture cellulaire ou PCR/RT-PCR Date	Concentration virale /10 litres	Référence
Entérovirus	Galveston Bay, Texas	40 (culture cellulaire)	-	(Gerba et al. 1979)
Entérovirus	Texas Gulf coast	59 (culture cellulaire)	0,1 - 4,4	(Goyal et al. 1979)
Entérovirus	Galveston Bay, Texas	72, 14 sédiments et eau (culture cellulaire)	0,1 - 10,5	(Rao et al. 1984b)
Entérovirus	Waikiki Hawaii	8 pour les plages, 50 pour les rejets de stations d'épuration (culture cellulaire)	< 0,1 - 130 000	(Reynolds et al. 1998)
Adénovirus, entérovirus et HAV	Littoral de Barcelone, Espagne	78, 44 et 33, respectivement (PCR/RT-PCR)	Présence/absence	(Pina et al. 1998b)
Entérovirus et adénovirus	Plages de Patras, Grèce	83,4 et 90, respectivement, (RT-PCR/PCR)	1,2-6,0 (entérovirus par culture cellulaire)	(Vantarakis & Papapetropoulou 1998)
Entérovirus, HAV, et Norwalk virus	Canals and nearshore waters of the Florida Keys	79, 63 et 11 respectivement (RT-PCR)	Présence/absence	(Griffin et al. 1999)
Réovirus	Plages le long de côte Sicile	27 (culture cellulaire)	Présence/absence	(Aulicino et al. 2000)
Entérovirus et réovirus	Plages de Pesaro, Italie	32,6 et 49,3, respectivement (culture cellulaire)	Présence/absence	(Pianetti et al. 2000)
Réovirus	Estuaire du Tibre, Italie	3 (culture cellulaire)	2,0-5,0	(Aulicino et al. 2001)
Entérovirus	Littoral Florida Keys	93 (RT-PCR)	0,1 par culture cellulaire pour un échantillon d'eau ; présence/absence via RT-PCR	(Lipp et al. 2001b)
Entérovirus	Sarasota estuary, Floride	25,0 for samples (cell culture) 91,0 for stations positive (RT-PCR)	17-77 (culture cellulaire)	(Lipp et al. 2001a)
Entérovirus	Charlotte Harbor estuary, Floride	21,9 (culture cellulaire), 75,0 pendant El Niño (1997-1998)	100-200	(Lipp et al. 2001d)
Adénovirus	Plages de Malibu, Calif., à la frontière mexicaine	33,3 (PCR)	8.800-75.000 (MPN-nested PCR)	(Jiang et al. 2001)
Réovirus et entérovirus	Plage de Fano et Albani Channel Harbour, Italie	30 et 0 respectivement (RT-PCR)	Présence/absence	(Muscillo et al. 2001)
Entérovirus	Santa Monica Bay, Californie	32 (RT-PCR)	Présence/absence	(Noble & Fuhrman 2001b)

Source : (Griffin et al. 2003)

## D. Diffusion des virus dans les matrices alimentaires

### D.1 Mode de transfert/de contamination

#### D.1.1 Ressources en eaux destinées à la consommation humaine : eaux souterraines

L'infiltration des eaux au travers du sol et des roches est connue pour sa capacité d'élimination ou de rétention des virus (Powelson & Gerba 1994b, Kuehn & Müller 2000), cependant de nombreux travaux ont permis de retrouver des virus dans des eaux souterraines. Certains travaux récents utilisant la PCR apportent des informations plus précises sur des cas de contamination de ces eaux par du génome viral.

(Borchardt *et al.* 2003) se sont intéressés à l'incidence des dispositifs d'assainissement autonome et à l'épandage de matières de vidange sur la qualité de l'eau de captages publics et de puits privés dans le Wisconsin. 24 puits sont placés près d'un site d'épandage, 26 près d'assainissements autonomes. Les aquifères étudiés correspondent à des sables et des graviers, des roches ignées peu perméables, des grès et des dolomites fracturées et des formations glaciaires. Un prélèvement a été effectué à chaque saison et la recherche d'acide nucléique viral effectuée par RT-PCR. Les puits sont profonds de 8,8 m à 93 m. La nappe est libre. Au total les entérovirus ont été recherchés sur 194 échantillons. Les virus retrouvés sont le HAV (6 échantillons), les entérovirus, les rotavirus et le NoV G1 (2 échantillons). Sur les 50 puits, 4 présentent une contamination virale. Sur 3 puits la présence de HAV est détectée et sur le quatrième celle de rotavirus, de NoV et d'entérovirus. Trois des 4 puits touchés sont implantés dans des sables et des graviers, le dernier probablement dans des calcaires fracturés. La contamination est intermittente (saisonnalité). Aucun entérovirus cultivable n'était présent dans les 194 échantillons.

(Abbaszadegan *et al.* 2003) se sont intéressés à la présence de virus dans les eaux souterraines aux États-Unis. Ils ont étudié l'eau de 448 puits de collectivités ou services des eaux dans 35 États (539 échantillons au total, certains sites étant échantillonnés plusieurs fois). La recherche des virus cultivables, celle d'acide nucléique viral (RT-PCR) ainsi que celle des coliformes totaux, des entérocoques, des *Clostridium perfringens* et des bactériophages pour 3 bactéries a été effectuée. Vingt-et-un sites (4,8 % de 442) et 22 échantillons (4,21 % de 529) sont positifs pour les virus cultivables avec une concentration de 0,09 à 1,86 NPP/100L. Par PCR le nombre de sites positifs est de 31,5 %. Cette valeur peut être comparée aux sites positifs pour les phages ou bactéries recherchés (40,6 %). Les différences entre les 2 méthodes résulteraient de la plus grande sensibilité de la PCR, de la non prise en compte de certains virus par culture, de la possibilité de déterminer une plus grande variété de virus et de la possible détection d'acide nucléique de virus non infectieux par PCR. Une saisonnalité dans la présence des différents virus apparaît dans les résultats par PCR. Il n'existe pas de corrélation entre la contamination en germes témoins de contamination fécale (GTCF) et celle en virus. Les distances de sources potentielles de contamination ont été étudiées. En accord avec la littérature, il ressort que 81 % des points positifs sont distants de moins de 168 m d'une source d'effluent. Les formations de socle ainsi que les formations alluviales et carbonatées sont les plus concernées par la contamination.

(Powell *et al.* 2003) ont recherché la présence de virus dans l'eau d'un aquifère gréseux (grès de Sherwood à granulométrie variée) s'étendant sous les villes de Nottingham et Birmingham. La nappe peu profonde (10 m environ) est essentiellement libre, en particulier sous les zones urbanisées. L'écoulement s'organise selon les failles. Sur 5 piézomètres profonds de 50 à 92 m et permettant des prélèvements à de multiples profondeurs (tubes en jeu d'orgue), le dénombrement des coliformes thermotolérants, des streptocoques fécaux, des *Clostridium perfringens* et des entérovirus (sur BGM et par RT-PCR) a été effectué. Les bactéries, en particulier les spores de clostridies, sont retrouvées partout mais certains points sont plus fréquemment contaminés que d'autres. Les virus, sont présents aux 5 points avec de grandes variations de concentration sans qu'il y ait de lien avec la contamination bactérienne. Au point 1 (à 50 m d'un égout) sont retrouvés à différentes profondeurs des norovirus (en hiver surtout période de prévalence dans la population), des Coxsackie B4, des coliphages. L'origine de cette contamination faible en particulier en virus est attribuable aux réseaux d'assainissement, le transfert des micro-organismes, en particulier pour les virus, se faisant plutôt par la porosité globale que par la fracturation des grès.

Parmi les travaux considérés il n'est jamais fait mention de l'infiltration possible d'eaux parasites le long du coulage des puits ou du tubage des forages non dotés d'une cimentation annulaire. Il s'agit pourtant d'une cause fréquente de contamination des eaux captées et ce quel que soit le type de terrain.

La présence de virus dans les eaux souterraines est possible. Celle-ci requiert plusieurs conditions. Les virus doivent avoir franchi la zone non saturée du terrain (sol et une partie de la roche aquifère éventuellement) qui constitue la première barrière à leur migration verticale.

Le transfert en milieu poreux ne s'opère le plus souvent que sur des distances limitées à quelques dizaines de mètres. Les virus subissent un retard dans leur transfert et sont inactivés. Une désorption d'une fraction des virus est possible avec des variations des caractéristiques physiques ou chimiques de l'eau. Ces variations vont bien au-delà des variations naturelles affectant la nappe.

L'élévation de température contribue fortement à l'inactivation des virus. Ceci devrait conduire à l'absence de virus viable dans les eaux thermales sauf mélange avec la nappe superficielle dans le secteur d'émergence.

Dans tous les cas il faut un apport massif ou chronique de virus pour pouvoir retrouver ceux-ci dans les eaux.

De nombreuses épidémies virales d'origine hydrique aux États-Unis proviennent de la contamination des ressources captées par des effluents insuffisamment filtrés issus de dispositifs d'assainissement autonome ou d'épandage d'effluents domestiques.

### D.1.2 Coquillages (hôtes intermédiaires)

L'accumulation des virus dans les mollusques filtreurs dépend des caractéristiques hydrauliques du système d'exposition, du type de virus et de sa concentration dans l'eau, de la température, du pH, de la salinité et de la présence de particules en suspension dans l'eau (Sobsey & Jaykus 1991). Les coquillages ne constituent pas un hôte de répllication pour les virus entériques humains, mais un simple transporteur passif permettant de les concentrer. Un modèle mathématique permettant de simuler la contamination en NoV des huîtres sous influence de 3 stations d'épurations pendant une épidémie dans la population a été décrit (Pommepuy *et al.* 2004).

Peu de données sont disponibles sur la contamination des coquillages dans le milieu. Par exemple concernant le virus de l'hépatite A, 36 % des échantillons de moules prélevées en mer Adriatique étaient contaminés (Crocchi *et al.* 2002), 60 % des échantillons collectés en zone C ou D en mer ionienne (Italie) (Di Pinto *et al.* 2003), 12 % des moules prélevées dans un site situé près de Hong Kong (Lee *et al.* 1999), 6 % des huîtres prélevées dans l'État de Caroline du Nord (États-Unis) (Chung *et al.* 1996), 3 % en Grèce et en Espagne et 0,5 % au Royaume-Uni (Formiga-Cruz *et al.* 2002). Dans le sud de la France, ce même virus a été régulièrement détecté par RT-PCR chaque hiver pendant 3 ans (Le Guyader *et al.* 2000). Des échantillons d'huîtres prélevés sur le marché étaient négatifs aux États-Unis (Goswami *et al.* 1993) et en Nouvelle-Zélande (Green & Lewis 1999), ou dans différents pays européens (Beuret 2003).

Une étude réalisée en France après une épidémie d'hépatite A survenue dans l'Ouest a montré la présence d'ARN dans 72 % des échantillons prélevés en zone insalubre, dont 25 % contenaient du virus infectieux (Crance *et al.* 1995). De même en Italie, parmi 49 échantillons positifs par RT-PCR, seuls 18 ont montré la présence de virus infectieux (De Medici *et al.* 2001).

Concernant les norovirus, ils ont été détectés dans 21 % des échantillons de coquillages prélevés en zone insalubre et 8 % des échantillons prélevés sur les étals en Angleterre (Lees *et al.* 1995). Dans ce même pays, 56 % des échantillons prélevés chez un producteur étaient contaminés par diverses souches de norovirus (Henshilwood *et al.* 1998). En France, ces virus ont été détectés dans 35% d'échantillons de moules et 23 % d'échantillons d'huîtres prélevés en zone insalubre (Le Guyader *et al.* 2000) et 5 % des coquillages exportés en Suisse (Beuret 2003). En Grèce, seulement 1,4 % des échantillons ont été détectés positifs contre 6 % en Angleterre, 25 % en Espagne, et 76 % en Suède (Formiga-Cruz *et al.* 2002), 8 % en Norvège (Myrmel *et al.* 2004).

D'autres virus ont été recherchés plus sporadiquement tels les adénovirus : 18,6 % de positifs en Norvège (Myrmel *et al.* 2004), 61 % en Suède, 22 % en Grèce, 34 % en Espagne, et 26 % en Angleterre (Formiga-Cruz *et al.* 2002), 43 % en Espagne (Pina *et al.* 1998b), 20% au Maroc (Karamoto *et al.* 2005), ou les astrovirus (17 % et 50 % de positifs dans des coquillages prélevés en zone salubre et insalubre respectivement) (Le Guyader *et al.* 2000). Les premières données concernant les entérovirus ont été obtenues par culture cellulaire dans les années 1980 essentiellement aux États-Unis. Ainsi, des entérovirus ont été détectés dans trois échantillons parmi 24 collectés en zone insalubre (Sobsey *et al.* 1980b) et 37,5 % dans des zones insalubres (Vaughn *et al.* 1980). Plus récemment par RT-PCR, des entérovirus ont été détectés dans 10 % des échantillons en Grèce, 25 % en Espagne, 44 % en Suède et 8 % en Angleterre (Formiga-Cruz *et al.* 2002), 32 % aux États-Unis (Chung *et al.* 1996), 43 % en Espagne (Pina *et al.* 1998b), 19 % en France (Le Guyader *et al.* 2000), 14 % en Italie (Crocchi *et al.* 2002), et 40 % en France (Dubois *et al.* 2004). Les rotavirus ont été rarement recherchés : en Nouvelle-Zélande 6 échantillons positifs parmi 7 analysés (Green & Lewis 1999), et en France 27 % d'échantillons positifs en zone salubre (Le Guyader *et al.* 2000).

## Question 4

### Persistence dans les coquillages

Peu de données sont disponibles sur la persistance de virus dans les tissus de coquillages. En 1973, lors d'une épidémie d'hépatite A liée à la consommation de coquillages, le facteur probable de contamination a été une inondation survenue quelques mois auparavant, impliquant la persistance du virus dans les tissus (Metcalfe 1982). Des essais sur des coquillages contaminés artificiellement par du VHA et maintenus en aquarium a confirmé la persistance de virus infectieux pendant au moins 3 semaines et de l'ARN pendant 6 semaines (Kingsley & Richards 2003). Suite à une épidémie liée à la consommation de coquillages, le lot d'huîtres contaminées a été suivi dans le milieu naturel et la souche de norovirus a été détectée pendant environ deux mois. Cependant dans ce cas un apport continu de virus n'a pu être exclu (Le Guyader *et al.* 2003). Récemment en utilisant des « virus-like particules » (VLP) de rotavirus il a pu être démontré que les virus restent dans les tissus de coquillage pendant environ 2,5 mois pour des concentrations élevées et environ 1 mois pour des concentrations plus basses (Loisy *et al.* 2005).

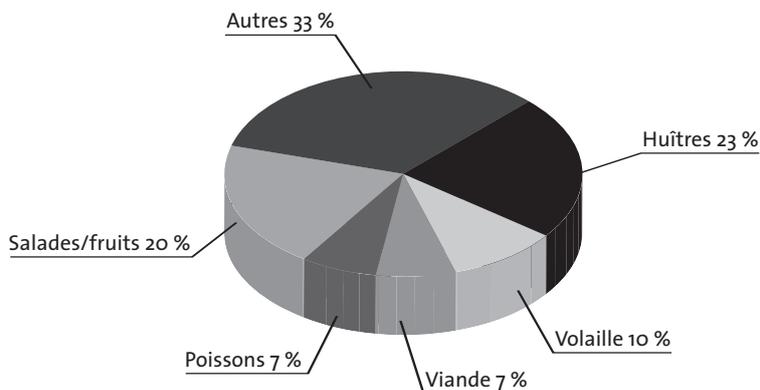
### D.1.3 Denrées végétales et autres aliments

#### D.1.3.1 Contexte épidémiologique

L'eau et les coquillages ne sont pas les seules matrices alimentaires susceptibles de transmettre les virus entériques. Dans une étude rétrospective sur les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) survenues au Pays de Galles et en Angleterre, entre 1992 et 2000 (Lopman *et al.* 2003) révèlent également l'importance des fruits et des légumes dans la transmission des norovirus (Figure 7). Les données extraites du site Internet du Centers for Disease Control and Prevention d'Atlanta, sur les TIAC d'étiologie virale, survenues entre 1990 et 2003 aux États-Unis, permettent d'estimer qu'environ 18 % des foyers et 25 % des cas humains documentés seraient associés à la consommation de denrées végétales<sup>(36)</sup>. En particulier, les laitues et les salades représenteraient 38 % des matrices végétales suspectées.

En France, peu d'études ont impliqué des denrées végétales dans l'émergence de foyers épidémiques (Cotterelle *et al.* 2005). Toutefois, notre pays a été concerné par des alertes communautaires relatives à la distribution possible sur le territoire de framboises produites en Europe de l'Est et ayant été incriminées dans l'émergence de TIAC en Suède et Finlande (Ponka *et al.* 1999, Hedlund *et al.* 2000, Le Guyader *et al.* 2004).

Figure 7 : aliments impliqués dans les TIAC à norovirus (86 épidémies) survenues en Angleterre et au Pays de Galles, de 1992 à 2000



Source : (Lopman *et al.* 2003)

#### D.1.3.2 Voies de contamination des aliments

Les denrées alimentaires impliquées dans des TIAC virales sont fréquemment associées à des manipulations par des personnes infectées, en l'absence de mesure d'hygiène. Cependant, le milieu hydrique joue aussi un rôle important dans le transfert des virus entériques, des réservoirs environnementaux vers les matrices alimentaires. L'eau ayant des utilisations alimentaires et agronomiques, sa qualité hygiénique, conditionne la qualité d'une très grande diversité de matrices alimentaires (Tableau 28).

(36) <http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/>.

**Tableau 28 : exemple du rôle de l'eau contaminée dans des TIAC d'étiologie virale**

Domaine	Usage de l'eau possible	Matrices impliquées dans des TIAC d'étiologie virale	Virus	Références
Alimentaire	Matière première	Glaces Crèmes réhydratées Glaçons	norovirus norovirus norovirus	(Cannon et al. 1991) (Brugha et al. 1999) (Pedalino et al. 2003)
	Mouillage	Laits	VHA	(Raska et al. 1966)
	Lavage	Légumes	norovirus	(Warner et al. 1991)
Agronomique	Irrigation	Fruits	VHA	(Calder et al. 2003)
		Légumes	VHA	(Rosenblum et al. 1990)

L'eau est l'élément de base de fabrication d'aliments comme les crèmes, les glaces ou les glaçons. Si elle est contaminée et si les températures atteintes lors des préparations ne sont pas suffisantes pour inactiver les virus, les aliments préparés pourront être responsables de foyers épidémiques.

Toutefois, les denrées végétales sont particulièrement exposées aux contaminations virales lorsque la qualité des ressources en eau est dégradée. Notamment, les virus ont la capacité de s'adsorber spontanément aux surfaces végétales. Des expériences en laboratoire montrent qu'un simple trempage dans une eau contaminée suffit à souiller des fruits ou des légumes. (Crocchi *et al.* 2002) observent également avec cette méthode de laboratoire, des différences dans l'efficacité d'adsorption du virus de l'hépatite A. Ce virus serait plus facilement retenu par les feuilles de laitues que par le fenouil ou les carottes. Les propriétés de surface différentes de ces légumes pourraient expliquer ces résultats. Plus proches des conditions naturelles de contamination, (Ward *et al.* 1982) contaminent des choux en plein champ, par aspersion avec des effluents d'une station de traitement des eaux usées, surchargés avec du poliovirus. Ils observent encore après plus de 5 jours sur le terrain et à des températures comprises entre 5 et 22°C, la présence de virus sur les légumes et cela en dépit de fortes pluies survenues pendant la durée des expériences.

Une autre voie de transmission des réservoirs environnementaux vers les denrées végétales est l'amendement des sols avec des engrais organiques, des boues de station d'épuration voire des eaux usées. Bien que cette pratique fasse l'objet d'une réglementation, les capacités de survie des virus laissent supposer qu'ils puissent être encore infectieux lorsque les épandages se font avec des fumiers insuffisamment fermentés, des boues de stations d'épuration incorrectement hygiénisées ou des eaux usées contaminées (Deng & Cliver 1995, Pesaro *et al.* 1995, Mignotte-Cadiergues *et al.* 2002, Monpoeho *et al.* 2004). Les virus qui persistent dans les sols ont la possibilité d'être transférés aux plantes par l'absorption racinaire (Tierney *et al.* 1977). Cependant, l'efficacité de ce mode de diffusion est très faible (Oron *et al.* 1995) et son influence est négligeable. Le risque majeur de l'amendement des sols avec des engrais contaminés est de souiller la surface des denrées végétales. Ainsi, des études réalisées avec des eaux usées montrent que l'utilisation d'une irrigation goutte-à-goutte, sous bâche plastique, réduirait la possibilité de contamination des légumes (Sadovski *et al.* 1978).

### D.1.3.3 Survie des virus à la surface des denrées végétales

Après la cueillette, les virus survivent plusieurs jours à la surface des fruits et des légumes. La température de stockage semble jouer indirectement un rôle important sur l'inactivation virale ; plus elle sera basse, plus longtemps les virus persisteront à la surface des végétaux (Tableau 29). Cependant, des différences dans les temps de survie ont été observées en fonction des denrées végétales étudiées (Dawson *et al.* 2005). (Petterson *et al.* 2001b) montrent notamment que le bactériophage B40-8 (choisi comme modèle des virus entériques) perd plus rapidement son pouvoir infectieux sur des carottes ( $D = 0,84$  jours) que sur de la laitue ( $D = 2,48$  jours). Les auteurs suggèrent que des composés phénoliques, de l'éthanol et des acétaldéhydes accélèreraient la perte d'infectivité. Toutefois, ces cinétiques d'inactivation virale seraient moins rapides que celles observées pour *Escherichia coli*, l'indicateur de contamination fécale (Allwood *et al.* 2004a). De plus, la réduction du pouvoir infectieux pourrait ne pas suivre un modèle linéaire mais biphasique, caractérisé par une décroissance rapide puis l'observation d'une persistance à la surface des légumes de 0,12 à 2 % des virus inoculés (Petterson *et al.* 2001b).

## Question 4

Tableau 29 : inactivation virale à la surface des denrées végétales

Virus	Surface	Température (°C)	Valeur de D (jours)	Références
Poliovirus	Laitues	4	11,6	Kurdziel <i>et al.</i> , 2001
	Choux		14,2	
	Framboises		> 9	
Calicivirus félin	Laitue	4	4	Allwood <i>et al.</i> , 2004
		25	1	
	Choux	4	3	
		25	1	
MS2	Laitue	4	7	
		25	1	
	Choux	4	3	
		25	1	

À la surface des tomates, les virus seraient plus facilement retenus par les cicatrices de la peau que la surface lisse du fruit (Lukasik *et al.* 2001). Les surfaces irrégulières pourraient favoriser l'adsorption des virus. Néanmoins, il semble que les salades aient aussi des propriétés particulières d'adsorption des virus, connues depuis de nombreuses années. Konowalchuk et Speirs décrivaient en 1973, la récupération d'entérovirus en suspension dans l'eau par l'utilisation de particules végétales (colloïdes) issues de laitues, de chicorées ou de persil, alors que des extraits issus de blettes étaient totalement inefficaces. Toutefois, la nature même des forces qui retiennent les virus ou même les sites privilégiés d'adsorption à la surface de ces denrées végétales ne sont pas encore connus. Il faut considérer cependant que les virus présents à la surface des fruits et des légumes sont dans un environnement qui favorise leur résistance notamment aux traitements de désinfection. En effet, si les virus sont généralement sensibles à la chloration lorsqu'ils sont en suspension dans l'eau, à la surface des salades, des doses de 100 à 200 mg/L de chlore ne réduisent que peu (0,30 à 2,14 log) la quantité de virus adsorbés (Dawson *et al.* 2005) et ils seraient notamment plus résistants aux traitements de désinfection que *E. coli* (Allwood *et al.* 2004a).

### D.1.3.4 Contrôles virologiques des denrées végétales consommées crues

La sécurité sanitaire des aliments passe inévitablement par la maîtrise de points critiques associés à la contamination des denrées, lors de l'ensemble des étapes du processus de production, de transformation et de distribution. Néanmoins, le contrôle des denrées est aussi un élément de gestion du risque sanitaire. Les critères microbiologiques, auxquels doivent satisfaire les denrées végétales consommées crues pour être reconnues propres à la consommation humaine, sont bactériologiques (*Salmonella* et *Listeria monocytogenes*, règlement 2073/2005 du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires). Le règlement 178/2002 du 28 janvier 2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l'Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires prévoit également que les produits ne doivent être pas être mis sur le marché si ils sont dangereux pour la santé des consommateurs. Cependant, les virus entériques pathogènes de l'homme ne représentent pas un danger actuellement mesuré alors que leur capacité de survie est supérieure à celle des bactéries indicatrices. La recherche de bactériophages ARN F-spécifiques, en complément des mesures de contrôle actuelles, augmenterait la sensibilité des plans de surveillance des denrées végétales consommées crues (Endley *et al.* 2003, Allwood *et al.* 2004b). Les récents développements méthodologiques et les validations entreprises dans ce domaine permettent d'envisager de telles applications (Dubois *et al.* 2006).

Parmi les matrices alimentaires autres que les coquillages, les denrées végétales (fruits et légumes) sont celles qui sont les plus exposées au transfert des virus à partir des réservoirs environnementaux. Les récentes données épidémiologiques confirment le rôle important que jouent ces denrées dans les TIAC d'étiologie virales. Les conditions favorisant la contamination des fruits ou des légumes sont rencontrées lorsque la qualité hygiénique des engrais, de l'eau d'irrigation ou de lavage est dégradée. Les végétaux ne constituent pas un réservoir de virus mais, en champ comme après la cueillette, des particules virales infectieuses peuvent persister plusieurs jours à la surface des plantes ou des fruits. La recherche de bactériophages, en complément des analyses microbiologiques classiques, pourrait améliorer le contrôle sanitaire des denrées végétales consommées crues.

## D.2 Description des facteurs de risques potentiels : humains et météorologiques (forte pluviométrie)...

### D.2.1 Facteurs environnementaux

Les facteurs de contamination des coquillages sont mal connus et peu d'études ont évalué les facteurs contributifs de ce phénomène. Les crues des cours d'eau ou le déversement d'eaux usées non traitées ont été depuis longtemps suspectés comme la cause probable de contamination de gisements de coquillages impliqués dans des épidémies, le virus pouvant ensuite persister plusieurs mois dans les bivalves (Metcalf 1982). La contamination peut aussi être causée par un rejet ponctuel d'excréments. Ainsi, un ostréiculteur souffrant d'une gastroentérite à bord de son embarcation a suffi à contaminer une baie de production (1 km de long sur 100 m de large et 2 m de profondeur) contaminant environ 1 million d'huîtres responsables ensuite de plusieurs foyers épidémiques dans plusieurs États (Kohn *et al.* 1995).

Lors d'une étude réalisée sur 3 ans dans le sud de la France, un lien étroit entre les phénomènes épidémiques d'étiologie virale dans la population littorale, l'apport massif de particules virales dans les eaux usées et la contamination des coquillages a été mis en évidence (Miossec *et al.* 1998). Cependant l'impact réel des rejets sur la qualité des coquillages est difficile à évaluer. L'utilisation de modèle mathématique intégrant les phénomènes de dispersion et dilution ainsi que les courants marins peut permettre de prévoir et donc prévenir les risques de contamination des gisements de coquillages (Pommepuy *et al.* 2004).

Le risque majeur pour les gastroentérites réside dans les problèmes d'hygiène et de contact avec des personnes infectées (de Wit *et al.* 2003). Le rejet de virus humains dans l'environnement dépend dans un premier temps de la circulation de celui-ci dans la population. Les gastroentérites suivent un cycle saisonnier relativement reproductible d'une année à l'autre avec des variations en fonction de la latitude des pays (Dowell 2001). Cependant l'apparition de variants peut certaines années entraîner une augmentation considérable du nombre de cas de gastroentérites comme cela a été montré avec la caractérisation de la souche de norovirus appartenant au génogroupe II4 (Lopman *et al.* 2004). Après rejet dans le milieu extérieur ils peuvent résister pendant des semaines même si le pouvoir pathogène reste difficile à évaluer (Metcalf *et al.* 1995).

Ainsi dès les années 1980 aux États-Unis ou en Australie deux équipes mettent en relation des pluies importantes et la contamination des coquillages. En France, la fréquence de détection de virus entériques humains dans les coquillages a pu être corrélée avec l'épidémie de gastroentérites dans la population dans les semaines précédentes (Miossec *et al.* 1998). En fin de période épidémique, des événements climatiques exceptionnels tels que des pluies importantes peuvent alors favoriser une contamination massive des eaux littorales et entraîner celle des coquillages (Miossec *et al.* 2000, Lee *et al.* 2004).

### D.2.2 Forte pluviométrie

Différents auteurs ont montré que les épidémies d'origine hydrique sont souvent corrélées aux précipitations en particulier lorsqu'elles sont fortes. Ainsi (Laursen *et al.* 1994) signalent l'existence d'un lien pour de petites villes au Danemark et (Curriero *et al.* 2001) ont montré également l'existence d'un lien statistique pour les États-Unis sur la période 1948-1994.

Récemment l'enquête environnementale menée lors d'une épidémie de gastroentérite liée à la consommation de coquillages a révélé des pluies importantes quelques jours avant la collecte des coquillages (Barataud *et al.* 2003), Ifremer (données non publiées). L'épidémie de Walkerton (Auld *et al.* 2004) associée à des bactéries ayant contaminé des eaux souterraines après des précipitations très importantes montre aussi la possibilité de transfert de virus.

Lors de précipitations importantes, la capacité d'absorption des sols étant limitée, le ruissellement se développe. En ruisselant l'eau va rincer les surfaces (terrain naturel ou urbanisé), entraînant les parasites, les bactéries et les virus qui peuvent être présents. Le ruissellement qui correspond à un écoulement rapide (en heures), s'opère sur de faibles distances, l'eau rejoignant les fossés puis les cours d'eau. De plus lors des grosses pluies les déversoirs d'orage des réseaux d'assainissement unitaires apportent des bouffées de contamination au milieu récepteur.

En conséquence, un accroissement notable de la contamination microbiologique (appréciée en général par le suivi des concentrations en bactéries GTCF ou autres et éventuellement en parasites) est observé dans les eaux de surface. Ce phénomène est décrit par de nombreux auteurs pour les eaux douces (do Amaral *et al.* 1994, Kistemann *et al.* 2002, Emiliani & Garcia de Emiliani 2003, Chigbu *et al.* 2004) ou marines (Miossec *et al.* 2000).

## Question 4

Les nappes contenues dans des aquifères poreux ne sont en général pas affectées par ces épisodes pluvieux importants, la zone non saturée constituant un obstacle au transfert des agents microbiologiques. La contamination d'une nappe peu profonde lors d'une recharge rapide de celle-ci après des pluies est toutefois évoquée par (Howard *et al.* 2003). L'infiltration d'eaux de ruissellement à la périphérie des ouvrages de captage mal protégés (cimentation ou corroi d'argile absents) peut cependant s'accompagner d'une contamination de l'eau captée. L'épisode de Walkerton correspond probablement à ce cas.

En revanche, en terrain karstique où l'eau s'infiltré dans les fractures élargies par les phénomènes de dissolution, les précipitations importantes se traduisent de manière systématique par des pics de crue auxquels sont associés des pics de contamination bactériologique. Cette dernière est surtout importante lors de la montée de crue.

En eau de surface les précipitations importantes génèrent des crues qui vont entraîner très rapidement vers l'aval les contaminants microbiologiques. Ceux-ci vont atteindre les estuaires et les secteurs littoraux pouvant toucher des secteurs conchylicoles.

## E. Bilan et recommandations

### E.1 Bilan

À partir du schéma conceptuel de contamination des aliments *via* les réservoirs environnementaux (Figure 5), il apparaît nécessaire de pondérer les différents éléments notés tout en prenant en compte les circonstances particulières d'exposition aux dangers et les risques associés.

Ainsi, nous avons identifié des sources primaires d'émission de virus (réservoirs vrais ou émanation de ceux-ci). Elles sont constituées des eaux usées traitées et leurs produits dérivés (boues, eaux épurées), et, au regard du potentiel zoonotique, des animaux et de leurs déjections.

Concernant les sources animales, il semble évident que certaines espèces (porcs, ruminants, rongeurs, lagomorphes) puissent être à l'origine de contaminations humaines par le virus de l'hépatite E et les rotavirus. Ces virus semblent être de plus en plus fréquemment transmis de façon interspécifique, et étant donné le portage fréquent chez les espèces animales et leur résistance dans les déchets animaux ou le milieu extérieur, il convient d'être particulièrement vigilant à leur sujet. Les norovirus quant à eux, ne sont pour le moment pas considérés comme des agents zoonotiques avérés mais ils présentent un potentiel de transmission qu'il convient d'étudier encore.

Peu de données renseignent sur le niveau de contamination des eaux usées par les virus. La quantité et la diversité des virus présents dans les eaux arrivant en tête de STEP dépendent en grande partie de l'état sanitaire de la population raccordée au réseau d'assainissement. L'abattement en virus dans la STEP, rarement total, sera fonction des processus de traitements. Toutefois, en cas de surcharge hydraulique liée notamment à des conditions météorologiques défavorables, des déversements d'eaux usées non traitées dans le milieu naturel peuvent survenir. Le risque d'une contamination durable de l'environnement et des aliments dépendant de ce milieu est alors accru.

Les procédés de traitement (traitements thermophiles, compostage, chaulage), des boues de station d'épuration, s'ils sont respectés, permettent un abattement important des virus entériques. Considérant également les mesures réglementaires stipulant les conditions d'utilisation, les boues de station d'épuration même non hygiénisées ne semblent pas être une source notable de danger viral. Dans ces conditions, les épandages ne sont pas considérés comme un facteur important de contamination de la ressource en eau.

Par ailleurs, les déchets (décharges et compostages) suivent en général un processus de collecte et de traitement efficace, qui limite énormément leur rôle potentiel dans la contamination virale des ressources.

Les compartiments environnementaux où les virus émis peuvent être retenus et persister, constituant ainsi une source secondaire virale potentielle, sont les sols, les eaux souterraines, les eaux de surface et les sédiments. Le sol semble, en général, constituer une barrière efficace au transfert des virus vers les nappes voire les denrées ; de plus, l'abattement mesuré dans la zone saturée n'est pas négligeable. En revanche pour les eaux superficielles, la remise en suspension des sédiments contribue à une recontamination des masses d'eaux marines et environnementales. Le risque lié aux eaux de surface contaminées paraît également plus important en fonction de divers facteurs (principalement climatiques et anthropique) pouvant être à l'origine de leurs contaminations.

Par effet de cascade, les ressources alimentaires comme les coquillages ou les végétaux, directement en contact avec les eaux de surface ou les eaux usées contaminées, sont des intermédiaires de contamination humaine importants (en quantité et en durée).

## E.2 Recommandations

- Il apparaît important d'évaluer le potentiel zoonotique des norovirus et de surveiller particulièrement la circulation des rotavirus chez les diverses espèces animales. Diverses données récentes concernant le VHE doivent également inciter à une grande vigilance et une surveillance accrue tant chez l'homme que chez les animaux.
- Peu de données sont encore disponibles sur la contamination virale des boues, des eaux usées et des déchets (décharges, compostages) au niveau national.
- De même, l'essentiel des données concernant les eaux de surface (y compris les eaux côtières) mais aussi les eaux souterraines vulnérables, provient d'auteurs anglo-saxons (surtout Amérique du nord) ; l'extrapolation à d'autres pays pourrait être source d'erreurs et des études de la contamination des eaux superficielles en France seraient donc à promouvoir.
- Parmi les travaux considérés, il n'est jamais fait mention de l'infiltration possible d'eaux parasites le long du cuvelage des puits ou du tubage des forages non dotés d'une cimentation annulaire. Il s'agit pourtant d'une cause fréquente de contamination des eaux captées et ce quel que soit le type de terrain. Une attention particulière devrait être apportée à la cimentation des têtes d'ouvrage en raison du risque accru d'infiltration d'eau.
- Une meilleure investigation en cas d'épidémie (cf. question 7) est souhaitable.
- Concernant les coquillages et les végétaux, les virus entériques pathogènes de l'homme ne sont pas pris en compte par la réglementation, alors que leur capacité de survie est supérieure à celle des bactéries indicatrices. La recherche de bactériophages, tout comme la détection des virus pathogènes par biologie moléculaire, pourrait, en complément des analyses microbiologiques, améliorer l'appréciation des risques sanitaires liés aux virus pathogènes. Il faut néanmoins souligner que les bactériophages n'ont pas été retenus dans la réglementation applicable aux denrées alimentaires (Règlement (CE) n°2073/2005). Les récents développements méthodologiques et les validations entreprises dans ce domaine devraient permettre d'envisager de telles applications.
- Enfin, il semble important de prendre en compte l'influence des incidents météorologiques dans la pollution des ressources en eau et d'initier des actions préventives pour assurer leur protection ; ainsi, il semble nécessaire d'avoir à une échelle locale, une connaissance fine des sources et des réservoirs de virus situés en amont d'exploitations sensibles : alimentation en eau potable, gisements naturels ou non de coquillages, terrains potagers.

- Abbaszadegan, M., Lechevallier, M. & Gerba, C. 2003.** Occurrence of viruses in US groundwaters. *J.A.W.W.A.* 95 (9), 107-120.
- AESN 2003.** Étude qualitative et quantitative des virus entériques de l'Orne entre Caen et la mer Agence de l'Eau Seine-Normandie. Agence pour le Développement de la Recherche scientifique et technique (ADER) - Centre de Recherche et de Contrôle des Eaux de Paris (CRECEP) - Laboratoire Départemental Frank Duncombe. 41 p.
- Allwood, P.B., Malik, Y.S., Hedberg, C.W. & Goyal, S.M. 2004a.** Effect of temperature and sanitizers on the survival of feline calicivirus, *Escherichia coli*, and F-specific coliphage MS2 on leafy salad vegetables. *J Food Prot* 67 (7), 1451-1456.
- Allwood, P.B., Malik, Y.S., Maherchandani, S., Vought, K., Johnson, L.A., Braymen, C., Hedberg, C.W. & Goyal, S.M. 2004b.** Occurrence of *Escherichia coli*, noroviruses, and F-specific coliphages in fresh market-ready produce. *J Food Prot* 67 (11), 2387-2390.
- Anjou Recherche, Lyonnaise des eaux, IRH environnement & NANCY, U.H.P. 2000.** Micropolluants organiques et germes pathogènes dans les boues d'eaux résiduaires. Rapport d'étude final. Pour consultation à l'ADEME n° de convention : 9775018. 247 p.
- ASTEE 2005.** Guide pour l'évaluation du risqué sanitaire dans les cadre de l'étude d'impact d'une installation de stockage de déchets ménagers et assimilés. 125 p.
- Auld, H., MacIver, D. & Klaassen, J. 2004.** Heavy rainfall and waterborne disease outbreaks: the Walkerton example. *J Toxicol Environ Health A* 67 (20-22), 1879-1887.
- Aulenbach, D.B. 1979.** Long-Term recharge of trickling filter effluent into sand. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C. p.
- Aulicino, F.A., Mauro, L., Marranzano, M., Biondi, M., Ursino, A. & Carere, M. 2000.** [Microbiological quality of the Catania coastal sea water]. *Ann Ig* 12 (6), 533-541.
- Aulicino, F.A., Orsini, P., Carere, M. & Mastrantonio, A. 2001.** Bacteriological and virological quality of seawater bathing areas along the Tyrrhenian coast. *Int J Environ Health Res* 11 (1), 5-11.
- Bales, R., Li, S., Aguire, K., Yahya, M., Gerba, C. & Harvey, R. 1995.** Virus and bacteria transport in a sandy aquifer, Cape Cod, MA. *Ground Water* 33 (4), 653-661.
- Barataud, D., Doyle, A., Gallay, A., Thiolet, J.-M., Le Guyader, S., Kholi, E. & Vaillant, V. 2003.** Toxi-infections alimentaires collectives à Norovirus, liées à al consommation d'huîtres de l'étang de Thau, France, décembre 2002. *Bull. Epid. Heb.* 38, 177-179.
- Beauudeau, P., Bertin, L., Leboulanger, T. & Foulex, J.N. 1997.** Traçages aux bactériophages dans le karst normand. *TSM* 1, 41-53.
- Beuret, C. 2003.** A simple method for isolation of enteric viruses (noroviruses and enteroviruses) in water. *J Virol Methods* 107 (1), 1-8.
- Borchardt, M.A., Bertz, P.D., Spencer, S.K. & Battigelli, D.A. 2003.** Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* 69 (2), 1172-1180.
- Bosch, A., Lucena, F., Diez, J.M., Gajardo, R., Blasi, M. & Jofre, J. 1991.** Waterborne viruses associated with hepatitis A outbreak. *J. Am. Water Works Assoc.* 83, 80-83.
- Brooks, J.P., Tanner, B.D., Gerba, C.P., Haas, C.N. & Pepper, I.L. 2005.** Estimation of bioaerosol risk of infection to residents adjacent to a land applied biosolids site using an empirically derived transport model. *J Appl Microbiol* 98 (2), 397-405.
- Brugha, R., Vipond, I.B., Evans, M.R., Sandifer, Q.D., Roberts, R.J., Salmon, R.L., Caul, E.O. & Mukerjee, A.K. 1999.** A community outbreak of food-borne small round-structured virus gastroenteritis caused by a contaminated water supply. *Epidemiol Infect* 122 (1), 145-154.

**Cadiergues, B. 2000.** Boues d'épuration et micro-organismes pathogènes : influence de différents traitements et du stockage. Nancy, Université Henri Poincaré - Nancy I, pp. 239.

**Calder, L., Simmons, G., Thornley, C., Taylor, P., Pritchard, K., Greening, G. & Bishop, J. 2003.** An outbreak of hepatitis A associated with consumption of raw blueberries. *Epidemiol Infect* 131 (1), 745-751.

**Cannon, R.O., Poliner, J.R., Hirschhorn, R.B., Rodeheaver, D.C., Silverman, P.R., Brown, E.A., Talbot, G.H., Stine, S.E., Monroe, S.S., Dennis, D.T. & et al. 1991.** A multistate outbreak of Norwalk virus gastroenteritis associated with consumption of commercial ice. *J Infect Dis* 164 (5), 860-863.

**Carducci, A., Gemelli, C., Cantiani, L., Casini, B. & Rovini, E. 1999.** Assessment of microbial parameters as indicators of viral contamination of aerosol from urban sewage treatment plants. *Lett Appl Microbiol* 28 (3), 207-210.

**Carrington, E.G. 2001.** Evaluation of sludge treatments for pathogen reduction - final report. European Commission Directorate-general environment. 52 p.

**Chang, K.O., Vandal, O.H., Yuan, L., Hodgins, D.C. & Saif, L.J. 2001.** Antibody-secreting cell responses to rotavirus proteins in gnotobiotic pigs inoculated with attenuated or virulent human rotavirus. *J Clin Microbiol.* 39, 2807-2813.

**Chapron, C.D., Ballester, N.A., Fontaine, J.H., Frades, C.N. & Margolin, A.B. 2000.** Detection of astroviruses, enteroviruses and adenoviruses types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (6), 2520-2525.

**Chigbu, P., Gordon, S. & Strange, T. 2004.** Influence of inter-annual variations in climatic factors on fecal coliform levels in Mississippi Sound. *Water Res* 38 (20), 4341-4352.

**Chung, H., Jaykus, L.A. & Sobsey, M.D. 1996.** Detection of human enteric viruses in oysters by *in vivo* and *in vitro* amplification of nucleic acids. *Appl Environ Microbiol* 62 (10), 3772-3778.

**Cook, N., Bridger, J., Kendall, K., Gomara, M.I., El-Attar, L. & Gray, J. 2004.** The zoonotic potential of rotavirus. *J Infect.* 48, 289-302.

**Cotterelle, B., Drougard, C., Rolland, J., Becamel, M., Boudon, M., Pinede, S., Traoré, O., Balay, K., Pothier, P. & Espié, E. 2005.** Outbreak of norovirus infection associated with the consumption of frozen raspberries, France, March 2005. *Eurosurveillance weekly releases* 10 (4).

**Crance, J.M., Apaire-Marchais, V., Leveque, F., Beril, C., Le Guyader, F., Jouan, A., Schwartzbrod, L. & Billaudel, S. 1995.** Detection of hepatitis A virus in wild shellfish. *Mar. Poll. Bul.* 30, 372-375.

**Croci, L., De Medici, D., Scalfaro, C., Fiore, A. & Toti, L. 2002.** The survival of hepatitis A virus in fresh produce. *Int J Food Microbiol* 73 (1), 29-34.

**Curriero, F.C., Patz, J.A., Rose, J.B. & Lele, S. 2001.** The association between extreme precipitation and waterborne disease outbreaks in the United States, 1948-1994. *Am J Public Health* 91 (8), 1194-1199.

**Das, B.K., Gentsch, J.R., Hoshino, Y., Ishida, S., Nakagomi, O., Bhan, M.K., Kumar, R. & Glass, R.I. 1993.** Characterization of the G serotype and genogroup of New Delhi newborn rotavirus strain 116E. *Virology* 197, 99-107.

**Dastjerdi, A.M., Green, J., Gallimore, C.I., Brown, D.W. & Bridger, J.C. 1999.** The bovine Newbury agent-2 is genetically more closely related to human SRSVs than to animal caliciviruses. *Virology* 254 (1), 1-5.

**Dawson, D.J., Paish, A., Staffell, L.M., Seymour, I.J. & Appleton, H. 2005.** Survival of viruses on fresh produce, using MS2 as a surrogate for norovirus. *J Appl Microbiol* 98 (1), 203-209.

**De Bertoldi, M., Vanillini, G. & Pera, A. 1983.** The Biology of composting : a review, Waste management and research 1, 157-176.

**De Borde, D., Woessner, W., Kiley, Q. & Ball, P. 1999.** Rapid transport of viruses in a floodplain aquifer. *Water Res.* 33 (10), 2229-2238.

**De Leener, K., Rahman, M., Matthijnsens, J., Van Hoovels, L., Goegebuer, T., van der Donck, I. & Van Ranst, M. 2004.** Human infection with a P[14], G3 lapine rotavirus. *Virology* 325 (1), 11-17.

## Question 4

- De Medici, D., Croci, L., Di Pasquale, S., Fiore, A. & Toti, L. 2001.** Detecting the presence of infectious hepatitis A virus in molluscs positive to RT-nested-PCR. *Lett Appl Microbiol* 33 (5), 362-366.
- De Serres, G., Cromeans, T., Levesque, B., Brassard, N., Barthe, C., Dionne, M., Prud'homme, H., Paradis, D., Shapiro, C., Nainan, O. & Margolis, H. 1999.** Molecular confirmation of hepatitis A virus from well water : Epidemiology and public health implications. *The Journal of infectious diseases* 179 (1), 37-43.
- de Wit, M.A., Koopmans, M.P. & van Duynhoven, Y.T. 2003.** Risk factors for norovirus, Sapporo-like virus, and group A rotavirus gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 9 (12), 1563-1570.
- Deng, M.Y. & Cliver, D.O. 1995.** Persistence of inoculated hepatitis A virus in mixed human and animal wastes. *Appl Environ Microbiol.* 61, 87-91.
- Di Pinto, A., Forte, V.T., Tantillo, G.M., Terio, V. & Buonavoglia, C. 2003.** Detection of hepatitis A virus in shellfish (*Mytillus galloprovincialis*) with RT-PCR. *J. Food Protect.* 66, 1681-1685.
- do Amaral, L.A., Nader Filho, A., Rossi Junior, O.D. & Iaria, S.T. 1994.** [Effect of pluviometric precipitation on the physical, chemical, and health/hygiene aspects of water from three public water supplies]. *Rev Latinoam Microbiol* 36 (1), 33-38.
- Donaldson, K.A., Griffin, D.W. & Paul, J.H. 2002.** Detection, quantitation and identification of enteroviruses from surface waters and sponge tissue from the Florida Keys using real-time RT-PCR. *Water Res* 36 (10), 2505-2514.
- Dowell, S.F. 2001.** Seasonal variation in host susceptibility and cycles of certain infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 7 (3), 369-374.
- Drewdy, W. & Eliassen, R. 1968.** Virus movement in groundwater. *J Water Pollut Control Fed Suppl* (Aug), 257-271.
- Drobeniuc, J., Favorov, M.O., Shapiro, C.N., Bell, B.P., Mast, E.E., Dadu, A., Culver, D., Iarovoi, P., Robertson, B.H. & Margolis, H.S. 2001.** Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J Infect Dis* 184 (12), 1594-1597.
- Dubois, E., Le Guyader, F., Haugarreau, L., Kopecka, H., Cormier, M. & Pommepuy, M. 1997.** Molecular epidemiological survey of rotaviruses in sewage by reverse transcriptase seminested PCR and restriction fragment length polymorphism assay. *Appl Environ Microbiol* 63 (5), 1794-1800.
- Dubois, E., Merle, G., Roquier, C., Trompette, A.L., Le Guyader, F., Cruciere, C. & Chomel, J.J. 2004.** Diversity of enterovirus sequences detected in oysters by RT-nested PCR. *Int J Food Microbiol* 92 (1), 35-43.
- Dubois, E., Hennechart, C., Deboosere, N., Merle, G., Legeay, O., Burger, C., Le Calve, M., Lombard, B., Ferre, V. & Traore, O. 2006.** Intra-laboratory validation of a concentration method adapted for the enumeration of infectious F-specific RNA coliphage, enterovirus, and hepatitis A virus from inoculated leaves of salad vegetables. *Int J Food Microbiol* 108 (2), 164-171.
- Duboise, S.M., Moore, B.E. & Sagik, B.P. 1976.** Poliovirus survival and movement in a sandy forest soil. *Appl Environ Microbiol* 31 (4), 536-543.
- Duguet, J.P. & Montiel, A. 2002.** Une approche de l'évaluation du risque microbiologique : l'application aux usines de production d'eau potable de Paris. Journées Information eaux - 15ème édition. Poitiers. 18-20 septembre 2002.
- Eiden, J., Vonderfecht, S. & Yolken, R.H. 1985.** Evidence that a novel rotavirus-like agent of rats can cause gastroenteritis in man. *Lancet* 2 (8445), 8-11.
- Elissalde, N., Ganière, J.P., L'Hostis, M., Legeas, M., Demillac, R. & Carré, J. 1994.** Les germes pathogènes dans les boues résiduaires des stations d'épuration urbaines. ADEME. 90 p.
- Emiliani, F. & Garcia de Emiliani, M.O. 2003.** Extreme pluvial episodes: bacteriological vulnerability of some subtropical fluvial systems (Santa Fe, Argentina). *Int J Environ Health Res* 13 (3), 303-307.
- Endley, S., Lu, L., Vega, E., Hume, M.E. & Pillai, S.D. 2003.** Male-specific coliphages as an additional fecal contamination indicator for screening fresh carrots. *J Food Prot* 66 (1), 88-93.
- Finance, C., Brigaud, M., Lucena, F., Aymard, M., Bosch, A. & Schwarzbrod, L. 1982.** Viral pollution of seawater at Barcelona. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B* 176, 530-536.

- Fitzgerald, T.A., Munoz, M., Wood, A.R. & Snodgrass, D.R. 1995.** Serological and genomic characterisation of group A rotaviruses from lambs. *Arch Virol* 140 (9), 1541-1548.
- Fleischer, J., Schlafmann, K., Otchwemah, R. & Botzenhart, K. 2000.** Elimination of enteroviruses, other enteric viruses, F specific coliphages, somatic coliphages and E. Coli in sewage treatment plant of southern germany. *J. Water Supply Res. Technol. AQUA* 49.3 (3), 127-138.
- Fletcher, M.W. & Myers, R.L. 1974.** Ground water tracing in karst terrain using phage T-4. *Abstr. Annu. Mtg. Am. Soc. Microbiol.* 74 (52).
- Flynn, R., Hunkeler, D., Guerin, C., Burn, C., Rossi, P. & Aragno, M. 2004.** Geochemical influences on H40/1 bacteriophage inactivation in glaciofluvial sands. *Environmental geology* Berlin 45 (4), 504-517.
- Fong, T., Griffin, D. & Lipp, E. 2005.** Molecular assays for targeting human and bovine enteric viruses in coastal waters and their application for library-independent source tracking. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (4), 2070-2078.
- Formiga-Cruz, M., Tofino-Quesada, G., Bofill-Mas, S., Lees, D.N., Henshilwood, K., Allard, A.K., Conden-Hansson, A.C., Hernroth, B.E., Vantarakis, A., Tsibouxi, A., Papapetropoulou, M., Furones, M.D. & Girones, R. 2002.** Distribution of human virus contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweden, and the United Kingdom. *Appl Environ Microbiol* 68 (12), 5990-5998.
- Fu, Z.F., Hampson, D.J. & Blackmore, D.K. 1989.** Detection and survival of group A rotavirus in a piggery. *Vet Rec.* 125, 576-578.
- Gale, P. 2003.** Pathogens in Biosolids - Microbiological risk Assessment. UKWIR. 125 p.
- Gale, P. 2005.** Land application of treated sewage sludge: quantifying pathogen risks from consumption of crops. *J Appl Microbiol* 98 (2), 380-396.
- Gassilloud, B., Schwartzbrod, L. & Gantzer, C. 2003.** Presence of viral genomes in mineral water: a sufficient condition to assume infectious risk? *Appl Environ Microbiol* 69 (7), 3965-3969.
- Gerba, C. & Bitton, G. 1984.** Microbial pollutants : Their survival and transport pattern to groundwater, in Groundwater pollution microbiology. *Wiley Interscience*, 65-88.
- Gerba, C.P. & Lance, J.C. 1978.** Poliovirus removal from primary and secondary sewage effluent by soil filtration. *Appl Environ Microbiol* 36 (2), 247-251.
- Gerba, C.P., Goyal, S.M., LaBelle, R.L., Cech, I. & Bodgan, G.F. 1979.** Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of enteroviruses in marine waters. *Am J Public Health* 69 (11), 1116-1119.
- Gerba, C.P. 1984.** Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. *Adv Appl Microbiol* 30, 133-168.
- Gerba, C.P., Gramos, D.M. & Nwachuku, N. 2002.** Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. *Appl Environ Microbiol* 68 (10), 5167-5169.
- Goswami, B.B., Koch, W.H. & Cebula, T.A. 1993.** Detection of hepatitis A virus in *Mercenaria mercenaria* by coupled reverse transcription and polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 59 (9), 2765-2770.
- Goyal, S.M., Gerba, C.P. & Melnick, J.L. 1979.** Human enteroviruses in oysters and their overlying waters. *Appl Environ Microbiol* 37 (3), 572-581.
- Gratacap-Cavallier, B., Genoulaz, O., Brengel-Pesce, K., Soule, H., Innocenti-Francillard, P., Bost, M., Gofti, L., Zmirou, D. & Seigneurin, J.M. 2000.** Detection of human and animal rotavirus sequences in drinking water. *Appl Environ Microbiol* 66 (6), 2690-2692.
- Gray, M., De Léon, R., Tepper, B. & Sobsey, M. 1993.** Survival of Hépatitis A virus (HAV), Poliovirus 1 and F-specific coliphages in disposable diapers and landfill leachates. *Wat. Sci. Tech*, 27 (3-4), 429-432.
- Green, D. & Lewis, G. 1999.** Comparative detection of enteric viruses in wastewaters, sediments and oysters by reverse transcription-PCR and cell culture. *Wat. Res.* 33, 1195-1200.
- Green, K. & Cliver, D.O. 1974.** Removal of virus from septik tank effluent by sand columns. *Home Sewage Disposal, Proc. Natl. Homme Sewage Disposal Symp., ASAE, St. Joseph, Mich.*, 137.

## Question 4

**Griffin, D.W., Gibson, C.J., 3rd, Lipp, E.K., Riley, K., Paul, J.H., 3rd & Rose, J.B. 1999.** Detection of viral pathogens by reverse transcriptase PCR and of microbial indicators by standard methods in the canals of the Florida Keys. *Appl Environ Microbiol* 65 (9), 4118-4125.

**Griffin, D.W., Donaldson, K.A., Paul, J.H. & Rose, J.B. 2003.** Pathogenic human viruses in coastal waters. *Clin. Microbiol. Rev.* 16 (1), 129-143.

**Hain, K.E. & O'Brien, R.T. 1979.** The survival of enteric viruses in septic tanks and septic tank drainfields. *Rep n°18, New Mexico Water Resources Research Institute, Las Cruces, N.M.*

**Han, M.G., Wang, Q., Smiley, J.R., Chang, K.O. & Saif, L.J. 2005.** Self-assembly of the recombinant capsid protein of a bovine norovirus (BoNV) into virus-like particles and evaluation of cross-reactivity of BoNV with human noroviruses. *J Clin Microbiol* 43 (2), 778-785.

**Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K. & Ohgaki, S. 2005.** Application of cation-coated filter method to detection of noroviruses, enteroviruses, adenoviruses and Torque teno viruses in the Tamagawa river in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (5), 2403-2411.

**He, J.W. & Jiang, S. 2005.** Quantification of enterococci and human adenoviruses in environmental samples by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 71 (5), 2250-2255.

**Hedlund, K.O., Rubilar-Abreu, E. & Svensson, L. 2000.** Epidemiology of calicivirus infections in Sweden, 1994-1998. *J Infect Dis* 181 Suppl 2, S275-280.

**Hejkal, T.W., Wellings, F.M., Lewis, A.L. & LaRock, P.A. 1981.** Distribution of viruses associated with particles in waste water. *Appl Environ Microbiol* 41 (3), 628-634.

**Henshilwood, K., Green, J. & Lees, D.N. 1998.** Monitoring the marine environment for small round structured viruses (SRSVS): a new approach to combating the transmission of these viruses by molluscan shellfish. *Wat. Sci. Tech.* 38, 51-56.

**Heyman & David, L. 2004.** Control of Communicable Diseases Manual. Washington, DC p.

**Hirano, M., Ding, X., Li, T.C., Takeda, N., Kawabata, H., Koizumi, N., Kadosaka, T., Goto, I., Masuzawa, T., Nakamura, M., Taira, K., Kuroki, T., Tanikawa, T., Watanabe, H. & Abe, K. 2003.** Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan. *Hepato Res* 27 (1), 1-5.

**Hörman, A., Rimhanen-Finne, R., Maunula, L., Von Bonsdorff, C.H., Torvela, N., Heikinheimo, A. & Hänninen, M.L. 2004.** Campylobacter spp, Giardia spp, Cryptosporidium spp., noroviruses, and indicators organisms in surface water in Southwestern Finland, 2000-2001. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (1), 87-95.

**Hoshino, Y., Honma, S., Jones, R.W., Ross, J., Santos, N., Gentsch, J.R., Kapikian, A.Z. & Hesse, R.A. 2005.** A porcine G9 rotavirus strain shares neutralization and VP7 phylogenetic sequence lineage 3 characteristics with contemporary human G9 rotavirus strains. *Virology* 332 (1), 177-188.

**Howard, G., Pedley, S., Barrett, M., Nalubega, M. & Johal, K. 2003.** Risk factors contributing to microbiological contamination of shallow groundwater in Kampala, Uganda. *Water Res* 37 (14), 3421-3429.

**Huang, F.F., Haqshenas, G., Guenette, D.K., Halbur, P.G., Schommer, S.K., Pierson, F.W., Toth, T.E. & Meng, X.J. 2002.** Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *J Clin Microbiol* 40 (4), 1326-1332.

**Hugues, B., Bougis, M.A., Plissier, M., André, M., Laurent, D. & Pagliardini, A. 1979.** Evaluation de la charge virale marine après rejet d'un effluent par un émissaire en mer. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B* 169, 253-264.

**Hurst, C.J., Benton, W.H. & McClellan, K.A. 1989.** Thermal and water source effects upon the stability of enteroviruses in surface freshwaters. *Can. J. Microbiol.* 35, 474- 480.

**InVS 2004.** Le stockage des déchets et la santé publique. Institut de Veille Sanitaire. 348 p.

**Irving, L.G. & Smith, F.A. 1981.** One year survey of enteroviruses, adenoviruses, and reoviruses isolated from effluent at an activated-sludge purification plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 41 41, 51-59.

**Jiang, S., Noble, R. & Chu, W. 2001.** Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California. *Appl Environ Microbiol* 67 (1), 179-184.

- Jiang, S.C. & Chu, W. 2004.** PCR detection of pathogenic viruses in southern California urban rivers. *J. Appl. Microbiol.* 97, 17-28.
- John, M. 2001.** *A dictionary of epidemiology* Last 4th Edition, IEA Oxford University press. 158 p.
- Karamoto, Y., Ibenyassine, K., Aitmhand, R., Idaomar, M. & Ennaji, M.M. 2005.** Adenovirus detection in shellfish and urban sewage in Morocco (Casablanca region) by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth.* 126, 135-137.
- Keskwick, B., Wang, D. & Gerba, C. 1982.** The use of microorganisms as groundwater tracers : a review. *Groundwater* 20 (2), 142-149.
- Keswick, B.H. & Gerba, C.P. 1980.** Viruses in groundwater. *Environ Sci Technol* 14, 1290.
- Kingsley, D.H. & Richards, G.P. 2003.** Persistence of hepatitis A virus in oysters. *J. Food Prot.* 66, 331-334.
- Kistemann, T., Classen, T., Koch, C., Dangendorf, F., Fischeder, R., Gebel, J., Vacata, V. & Exner, M. 2002.** Microbial load of drinking water reservoir tributaries during extreme rainfall and runoff. *Appl Environ Microbiol* 68 (5), 2188-2197.
- Kitamura, S., Kamata, S., Nakano, S. & Suzuki, S. 2004.** Solar UV radiation does not inactivate marine birnavirus in coastal seawater. *Dis Aquat Organ* 58 (2-3), 251-254.
- Koener, E.L. & Haws, D.A. 1979.** Long-term effect of land application of domestic wastewater : Vineland, N.J., Rapid infiltration site. *Pub. N°EPA-600/2-79-072, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.*
- Kohn, M.A., Farley, T.A., Ando, T., Curtis, M., Wilson, S.A., Jin, Q., Monroe, S.S., Baron, R.C., McFarland, L.M. & Glass, R.I. 1995.** An outbreak of Norwalk virus gastroenteritis associated with eating raw oysters. Implications for maintaining safe oyster beds. *Jama* 273 (6), 466-471.
- Kuehn, W. & Müller, U. 2000.** Riverbank filtration an overview. *JAWWA*, 60-69.
- LaBelle, R.L. & Gerba, C.P. 1979.** Influence of pH, salinity, and organic matter on the adsorption of enteric viruses to estuarine sediment. *Appl Environ Microbiol* 38 (1), 93-101.
- Lance, J., Gerba, C. & Wang, D. 1982.** Comparative movement of different enteroviruses in soil columns. *J. Environ. Qual.* 11, 347-354.
- Lance, J.C., Gerba, C.P. & Melnick, J.L. 1976.** Virus movement in soil columns flooded with secondary sewage effluent. *Appl Environ Microbiol* 32 (4), 520-526.
- Lance, J.C. & Gerba, C.P. 1980.** Poliovirus movement during high rate land filtration of sewage water. *J. Environ. Qual.* 9, 31.
- Lance, J.C. & Gerba, C.P. 1984.** Virus movement in soil during saturated and unsaturated flow. *Appl Environ Microbiol* 47 (2), 335-337.
- Laursen, E., Mygind, O., Rasmussen, B. & Ronne, T. 1994.** Gastroenteritis: a waterborne outbreak affecting 1 600 people in a small Danish town. *J Epidemiol Community Health* 48 (5), 453-458.
- Laverick, M.A., Wyn-Jones, A.P. & Carter, M.J. 2004.** Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Lett Appl Microbiol* 39 (2), 127-136.
- Lawson, H.W., Braun, M.M., Glass, R.I.M., Stine, S.E., Monroe, S.S., Atrash, H.K., Lee, L.E. & Engleider, S. 1991.** Waterborne outbreak of Norwalk virus gastroenteritis at a southwest US resort : role of geological formations in contamination of well water. *J Lancet Br. ed.* 1991 8751, 1200-1204.
- Le Cann, P., Ranarijaona, S., Monpoeho, S., Le Guyader, F. & Ferre, V. 2004.** Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. *Res Microbiol* 155 (1), 11-15.
- Le Guyader, F., Haugarreau, L., Miossec, L., Dubois, E. & Pommepuy, M. 2000.** Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Appl Environ Microbiol* 66 (8), 3241-3248.
- Le Guyader, F.S., Neill, F.H., Dubois, E., Bon, F., Loisy, F., Kohli, E., Pommepuy, M. & Atmar, R.L. 2003.** A semi-quantitative approach to estimate Norwalk-like virus contamination of oysters implicated in an outbreak. *Int. J. Food Microbiol.* 87, 107-112.

## Question 4

- Le Guyader, F.S., Mittelholzer, C., Haugarreau, L., Hedlund, K.O., Alsterlund, R., Pommepuy, M. & Svensson, L. 2004.** Detection of noroviruses in raspberries associated with a gastroenteritis outbreak. *Int J Food Microbiol* 97 (2), 179-186.
- Lee, C., Lee, S.H., Han, E. & Kim, S.J. 2004.** Use of cell culture-PCR based on combination of A549 and BGMK cell lines and molecular identification as a tool to monitor infectious adenoviruses and enteroviruses in river water. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (11), 6695-6705.
- Lee, T., Yamw, C., Tam, T.Y., Ho, B.S.W., Ng, M.H. & Broom, M.J. 1999.** Occurrence of hepatitis A virus in green-lipped mussels (*perna viridis*). *Wat. Res.* 33, 885-889.
- Lees, D.N., Henshilwood, K., Green, J., Gallimore, C.I. & Brown, D.W. 1995.** Detection of small round structured viruses in shellfish by reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* 61 (12), 4418-4424.
- Lefler, E. & Kott, Y. 1974.** Virus retention and survival in sand. *Virus Survival in water and wastewater systems*, Malina, J.F. and Sagik, B.P., Eds, Center for Research in *Water Resources*, Austin Tex.
- Lipp, E.K., Farrah, S.A. & Rose, J.B. 2001a.** Assessment and impact of microbial fecal pollution and human enteric pathogens in a coastal community. *Mar Pollut Bull* 42 (4), 286-293.
- Lipp, E.K., Jarrell, J.L., Griffin, D.W., Lukasik, J., Jacukiewicz, J. & Rose, J.B. 2001b.** Preliminary evidence for human fecal contamination in corals of the Florida Keys. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 666-670.
- Lipp, E.K., Kurz, R., Vincent, R., Rodriguez -pallacio, C., Farrah, S.R. & Rose, J.B. 2001c.** The effects of seasonal variability and weather on microbial fecal pollution and enteric pathogens in a subtropical estuary. *Estuaries* 24, 238-258.
- Lipp, E.K., Kurz, R., Vincent, R., Rodriguez-Palacios, C., Farrah, S.R. & Rose, J.B. 2001d.** The effects of seasonal variability and weather on microbial fecal pollution and enteric pathogens in a subtropical estuary. *Estuaries* 24, 238-258.
- Lipp, E.K., Jarrell, J.L., Griffin, D.W., Lukasik, J., Jacukiewicz, J. & Rose, J.B. 2002.** Preliminary evidence for human fecal contamination in corals of the Florida Keys, USA. *Mar Pollut Bull* 44 (7), 666-670.
- Liu, B.L., Lambden, P.R., Gunther, H., Otto, P., Elschner, M. & Clarke, I.N. 1999.** Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. *J Virol* 73 (1), 819-825.
- Lodder, W.J. & De Roda Husman, A.M. 2005.** Presence of norovirus and other enteric viruses in sewage and surface waters in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (3), 1453-1461.
- Loisy, F., Atmar, R.L., Le Saux, J.C., Cohen, J., Caprais, M.-P., Pommepuy, M. & Le Guyader, S.F. 2005.** Rotavirus virus like particles as surrogates to evaluate virus persistence in shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* Accepted for publication 2005.
- Lopman, B., Vennema, H., Kohli, E., Pothier, P., Sanchez, A., Negrodo, A., Buesa, J., Schreier, E., Reacher, M., Brown, D., Gray, J., Iturriza, M., Gallimore, C., Bottiger, B., Hedlund, K.O., Torven, M., von Bonsdorff, C.H., Maunula, L., Poljsak-Prijatelj, M., Zimsek, J., Reuter, G., Szucs, G., Melegh, B., Svensson, L., van Duynhoven, Y. & Koopmans, M. 2004.** Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet* 363 (9410), 682-688.
- Lopman, B.A., Adak, G.K., Reacher, M.H. & Brown, D.W. 2003.** Two epidemiologic patterns of norovirus outbreaks: surveillance in England and Wales, 1992-2000. *Emerg Infect Dis* 9 (1), 71-77.
- Lukasik, J., Bradley, M.L., Scott, T.M., Hsu, W.Y., Farrah, S.R. & Tamplin, M.L. 2001.** Elution, detection, and quantification of polio I, bacteriophages, *Salmonella montevideo*, and *Escherichia coli* O157:H7 from seeded strawberries and tomatoes. *J Food Prot* 64 (3), 292-297.
- Martin, R. & Thomas, A. 1974.** An example of the use of bacteriophage as a groundwater tracer. *J. Hydrol.* 23 (73).
- Masuda, J.I., Yano, K., Tamada, Y., Takii, Y., Ito, M., Omagari, K. & Kohno, S. 2005.** Acute hepatitis E of a man who consumed wild boar meat prior to the onset of illness in Nagasaki, Japan. *Hepatol Res* 31 (3), 178-183.
- McGauhey, P.H. & Krone, R.B. 1954.** Report on the investigation of travel of pollution. *State Water Pollution Control Board, State of California* 11.

- Melnick, J.L. & Gerba, C.P. 1980.** The ecology of enteroviruses in natural waters. *Crit. Rev. Environ. Control* 10, 65-93.
- Meng, X.J., Purcell, R.H., Halbur, P.G., Lehman, J.R., Webb, D.M., Tsareva, T.S., Haynes, J.S., Thacker, B.J. & Emerson, S.U. 1997.** A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (18), 9860-9865.
- Meng, X.J., Halbur, P.G., Shapiro, M.S., Govindarajan, S., Bruna, J.D., Mushahwar, I.K., Purcell, R.H. & Emerson, S.U. 1998.** Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol* 72 (12), 9714-9721.
- Meng, X.J., Dea, S., Engle, R.E., Friendship, R., Lyoo, Y.S., Sirinarumitr, T., Urairong, K., Wang, D., Wong, D., Yoo, D., Zhang, Y., Purcell, R.H. & Emerson, S.U. 1999.** Prevalence of antibodies to the hepatitis E virus in pigs from countries where hepatitis E is common or is rare in the human population. *J Med Virol* 59 (3), 297-302.
- Meng, X.J. 2000.** Novel strains of hepatitis E virus identified from humans and other animal species: is hepatitis E a zoonosis? *J Hepatol* 33 (5), 842-845.
- Meng, X.J., Wiseman, B., Elvinger, F., Guenette, D.K., Toth, T.E., Engle, R.E., Emerson, S.U. & Purcell, R.H. 2002.** Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J Clin Microbiol* 40 (1), 117-122.
- Merrell, J.C. 1967.** The santee recreaton project, Santee, Calif.,. *Water Pollut. Res. Serv. Fed. Water Pollut. Control Admin., Cincinnati, OH* 20-7.
- Metcalf, T.G. 1982.** Viruses in shellfish-growing waters. *Environ. Inter.* 7, 21-27.
- Metcalf, T.G., Rao, V.C. & Melnick, J.L. 1984.** Solid-associated viruses in a polluted estuary. *Virology* 15, 97-110.
- Metcalf, T.G., Melnick, J.L. & Estes, M.K. 1995.** Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology--a trip of over 50 years. *Annu Rev Microbiol* 49, 461-487.
- Mignotte-Cadiergues, B., Gantzer, C. & Schwartzbrod, L. 2002.** Evaluation of bacteriophages during the treatment of sludge. *Water Sci Technol* 46 (10), 189-194.
- Miossec, L., Le Guyader, F., Haugarreau, L., Comps, M. & Pommepuy, M. 1998.** Possible relationship between a winter epidemic of acute gastroenteritis in France and viral contamination of shellfish. *J Shellf Res* 17, 1661-1664.
- Miossec, L., Le Guyader, F., Haugarreau, L. & Pommepuy, M. 2000.** [Magnitude of rainfall on viral contamination of the marine environment during gastroenteritis epidemics in human coastal population]. *Rev Epidemiol Sante Publique* 48 Suppl 2, 2S62-71.
- Monpoeho, S. 2001.** Quantification génomique de deux virus entériques (entérovirus et HAV) dans les boues de station d'épuration. Estimation de l'impact sanitaire lié à leur valorisation. *Faculté de Pharmacie - Université de Nantes*. 181 p.
- Monpoeho, S., Maul, A., Bonnin, C., Patria, L., Ranarijaona, S., Billaudel, S. & Ferre, V. 2004.** Clearance of human-pathogenic viruses from sludge: study of four stabilization processes by real-time reverse transcription-PCR and cell culture. *Appl Environ Microbiol* 70 (9), 5434-5440.
- Moore, B., Sagik, B. & Sorber, C. 1981.** Viral transport to ground water at a wastewater land application site. *J WATERW PORT C-ASCE* 53 (10), 1492-1502.
- Morris, R. 1984.** Reduction of naturally occurring enteroviruses by wastewater treatment processes. *J Hyg. Camb* 92, 97-103.
- Muscillo, M., La Rosa, G., Marianelli, C., Zaniratti, S., Capobianchi, M.R., Cantiani, L. & Carducci, A. 2001.** A new RT-PCR method for the identification of reoviruses in seawater samples. *Water Res* 35 (2), 548-556.
- Myrmel, M., Berg, E.M., Rimstad, E. & Grinde, B. 2004.** Detection of enteric viruses in shellfish from the Norwegian coast. *Appl Environ Microbiol* 70 (5), 2678-2684.
- Nakagomi, O., Mochizuki, M., Aboudy, Y., Shif, I., Silberstein, I. & Nakagomi, T. 1992.** Hemagglutination by a human rotavirus isolate as evidence for transmission of animal rotaviruses to humans. *J Clin Microbiol* 30 (4), 1011-1013.

## Question 4

**Nakagomi, O. & Nakagomi, T. 1993.** Interspecies transmission of rotaviruses studied from the perspective of genogroup. *Microbiol Immunol* 37 (5), 337-348.

**Nakagomi, O., Isegawa, Y., Ward, R.L., Knowlton, D.R., Kaga, E., Nakagomi, T. & Ueda, S. 1994.** Naturally occurring dual infection with human and bovine rotaviruses as suggested by the recovery of G1P8 and G1P5 rotaviruses from a single patient. *Arch Virol* 137 (3-4), 381-388.

**Nakagomi, T. & Nakagomi, O. 1989.** RNA-RNA hybridization identifies a human rotavirus that is genetically related to feline rotavirus. *J Virol* 63 (3), 1431-1434.

**Noble, R. & Fuhrman, J. 2001a.** Enteroviruses detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction from the coastal waters of Santa Monica bay, California : low correlation to bacterial indicator levels. *Hydrobiologia* 460, 175-184.

**Noble, R.T. & Fuhrman, J.A. 2001b.** Enteroviruses detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction from the coastal waters of Santa Monica Bay, California : low correlation to bacterial indicator levels. *Hydrobiologia* 460, 175-184.

**Noonan, M.J. & Mc Naab, J.F. 1979.** Movement of bacteriophages in groundwater in New Zealand. Abstracts of the annual meeting, 221 p.

**Nuanualsuwan, S. & Cliver, D.O. 2003.** Infectivity of RNA from inactivated poliovirus. *Appl Environ Microbiol* 69 (3), 1629-1632.

**Oh, D.Y., Gaedicke, G. & Schreier, E. 2003.** Viral agents of acute gastroenteritis in German children: prevalence and molecular diversity. *J Med Virol* 71 (1), 82-93.

**Oliver, S.L., Dastjerdi, A.M., Wong, S., El-Attar, L., Gallimore, C., Brown, D.W., Green, J. & Bridger, J.C. 2003.** Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans. *J Virol* 77 (4), 2789-2798.

**Oron, G., Goemans, M., Manor, Y. & Feyen, J. 1995.** Poliovirus distribution in the soil-plant system under reuse of secondary wastewater. *Wat Res.* 29 (4), 1069-1078.

**Paul, J.H., Rose, J.B., Shinn, E.A., Miller, S. & Farrah, S.R. 1995.** Viral tracer studies indicate contamination of marine waters by sewage disposal practices in key largo. Florida. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (6), 2230- 2234.

**Paul, J.H., Rose, J.B., Jiang, S.C., Zhou, X., Cochran, P., Kellogg, C., Kang, J.B., Griffin, D., Farrah, S. & Lukasik, J. 1997.** Evidence for groundwater and surface marine water contamination by waste disposal wells in the Florida keys. *Water Research* 31 (6), 1448-1454.

**Payment, P., Affoyon, F., DiFranco, E. & Trudel, M. 1986.** Pollution de la rivière l'Assomption (province de Québec, Canada) et de ses affluents par les virus entériques porcins. *Rev. Int. Sciences de l'eau.* 2 4, 113-116.

**Payment, P., Morin, E. & Trudel, M. 1988.** Coliphages and enteric viruses in the particulate phase of river water. *Can J Microbiol* 34 (7), 907-910.

**Pedalino, B., Feely, E., McKeown, P., Foley, B., Smyth, B. & Moren, A. 2003.** An outbreak of Norwalk-like viral gastroenteritis in holidaymakers travelling to Andorra, January-February 2002. *Euro Surveill* 8 (1), 1-8.

**Pesaro, F., Sorg, I. & Metzler, A. 1995.** In situ inactivation of animal viruses and a coliphage in nonaerated liquid and semiliquid animal wastes. *Appl Environ Microbiol* 61 (1), 92-97.

**Petterson, S.R., Teunis, P.F. & Ashbolt, N.J. 2001.** Modeling virus inactivation on salad crops using microbial count data. *Risk Anal* 21 (6), 1097-1108.

**Pianetti, A., Baffone, W., Citterio, B., Casaroli, A., Bruscolini, F. & Salvaggio, L. 2000.** Presence of enteroviruses and reoviruses in the waters of the Italian coast of the Adriatic Sea. *Epidemiol Infect* 125 (2), 455-462.

**Pina, S., Jofre, J., Emerson, S.U., Purcell, R.H. & Girones, R. 1998a.** Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. *Appl Environ Microbiol* 64 (11), 4485-4488.

**Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J. & Girones, R. 1998b.** Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl Environ Microbiol* 64 (9), 3376-3382.

**Pommepeuy, M., Dumas, F., Caprais, M.-P., Camus, P., Le Mennec, C., Parnaudeau, S., Haugarreau, L., Sarrette, B., Vilagenes, P., Pothier, P., Kohli, E. & Le Guyafder, S.F. 2004.** Sewage impact on shellfish microbial contamination. *Wat. Sci. Technol.* 50, 117-124.

**Ponka, A., Maunula, L., von Bonsdorff, C.H. & Lyytikäinen, O. 1999.** An outbreak of calicivirus associated with consumption of frozen raspberries. *Epidemiol Infect* 123 (3), 469-474.

**Powell, K.L., Taylor, R.G., Cronin, A.A., Barrett, M.H., Pedley, S., Sellwood, J., Trowsdale, S.A. & Lerner, D.N. 2003.** Microbial contamination of two urban sandstone aquifers in the UK. *Water Res* 37 (2), 339-352.

**Powelson, D.K., Simpson, J.R. & Gerba, C.P. 1991.** Effects of organic matter on virus transport in unsaturated flow. *Appl Environ Microbiol* 57 (8), 2192-2196.

**Powelson, D.K. & Gerba, C.P. 1994.** Virus removal from sewage effluents during saturated and unsaturated flow through soil columns 1994. *Water Res* 28, 175-181.

**Pusch, D., Oh, D.Y., Wolf, S., Duke, R., Schroter-Bobsin, U., Hohme, M., Roske, I. & Schreier, E. 2005.** Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Arch. Virol.* 150 (5), 929-947.

**Ramos, A.P., Stefanelli, C.C., Linhares, R.E., de Brito, B.G., Santos, N., Gouvea, V., de Cassia Lima, R. & Nozawa, C. 2000.** The stability of porcine rotavirus in feces. *Vet Microbiol* 71 (1-2), 1-8.

**Rao, V.C., Seidel, K.M., Goyal, S.M., Metcalf, T.G. & Melnick, J.L. 1984a.** Isolation of enterovirus from water, suspended solids and sediments from Galveston Bay: survival of poliovirus and rotavirus in sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 548, 404-409.

**Rao, V.C., Seidel, K.M., Goyal, S.M., Metcalf, T.G. & Melnick, J.L. 1984b.** Isolation of enteroviruses from water, suspended solids, and sediments from Galveston Bay: survival of poliovirus and rotavirus adsorbed to sediments. *Appl Environ Microbiol* 48 (2), 404-409.

**Rao, V.C., Metcalf, T.G. & Melnick, J.L. 1986.** Human viruses in sediments, sludges and soils. *Bull. World Health Organization* 64, 1-14.

**Raska, K., Helcl, J., Jezek, J., Kubelka, Z., Litov, M., Novak, K., Radkovsky, J., Sery, V., Zejdl, J. & Zikmund, V. 1966.** A milk-borne infectious hepatitis epidemic. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 10 (4), 413-428.

**Reynolds, K.A., Roll, K., Fujioka, R.S., Gerba, C.P. & Pepper, I.L. 1998.** Incidence of enteroviruses in Mamala Bay, Hawaii using cell culture and direct polymerase chain reaction methodologies. *Can J Microbiol* 44 (6), 598-604.

**Rijal, G.K. & Fujioka, R.S. 2001.** Synergistic effect of solar radiation and solar heating to disinfect drinking water sources. *Water Sci Techno* 43 (12), 155-162.

**Rose, J.B., Dickson, L.J., Farrah, S.R. & Carnahan, R.P. 1996.** Removal of pathogenic and indicator microorganisms by a full-scale water reclamation facility. *Water Res.* 30, 2785-2787.

**Rosenblum, L.S., Mirkin, I.R., Allen, D.T., Safford, S. & Hadler, S.C. 1990.** A multifocal outbreak of hepatitis A traced to commercially distributed lettuce. *Am J Public Health* 80 (9), 1075-1079.

**Rossi, P., De Carvalho-Dill, A., Müllerr, I. & Aragano, M. 1994.** Comparative tracing experiments in a porous aquifer using bacteriophages and fluorescent dye on a test field located at Wilerwald (Switzerland) and simultaneously surveyed in detail on a local scale by radio-magneto-tellury (12-240 kHz). *Environmental Geology* 23, 192-200.

**Rutjes, S.A., Italiaander, R., van den Berg, H.H., Lodder, W.J. & de Roda Husman, A.M. 2005.** Isolation and detection of enterovirus RNA from large-volume water samples by using the NucliSens miniMAG system and real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Appl Environ Microbiol* 71 (7), 3734-3740.

**Sadovskii, A.Y., Fattal, B., Goldberg, D., Katzenelson, E. & Shuval, H.I. 1978.** High levels of microbial contamination of vegetables irrigated with wastewater by the drip method. *Appl Environ Microbiol* 36 (6), 824-830.

**Santos, N., Lima, R.C., Nozawa, C.M., Linhares, R.E. & Gouvea, V. 1999.** Detection of porcine rotavirus type G9 and of a mixture of types G1 and G5 associated with Wa-like VP4 specificity: evidence for natural human-porcine genetic reassortment. *J Clin Microbiol* 37 (8), 2734-2736.

**Schernewski, G. & Julich, W.D. 2001.** Risk assessment of virus infections in the Oder estuary (southern Baltic) on the basis of spatial transport and virus decay simulations. *Int J. Hyg. Environ Health.* 203 (4), 317-325.

## Question 4

Schlauder, G.G., Dawson, G.J., Erker, J.C., Kwo, P.Y., Knigge, M.F., Smalley, D.L., Rosenblatt, J.E., Desai, S.M. & Mushahwar, I.K. 1998. The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States. *J Gen Virol* 79 ( Pt 3), 447-456.

Schoenen, D. 2001. Requirements for the catchment, treatment and surveillance of drinking water to avoid the transmittance of pathogenic bacterial, viral and parasitic organisms. *Acta hydrochim. Hydrobiol* 29 (4), 187-196.

Schvoerer, E., Bonnet, F., Dubois, V., Cazaux, G., Serceau, R., Fleury, H.J. & Lafon, M.E. 2000. PCR detection of human enteric viruses in bathing areas, waste waters and human stools in Southwestern France. *Res Microbiol* 151 (8), 693-701.

Schvoerer, E., Ventura, M., Dubos, O., Cazaux, G., Serceau, R., Gournier, N., Dubois, V., Caminade, P., Fleury, H.J. & Lafon, M.E. 2001. Qualitative and quantitative molecular detection of enteroviruses in water from bathing areas and from a sewage treatment plant. *Res Microbiol* 152 (2), 179-186.

Schwarzbrod, J., Lucena, F., Bosch, A., Beryl, C., Schwarzbrod, L. & Pares, R. 1987. Influence des eaux continentales et des eaux usées sur la contamination microbiologiques des sédiments marins. *J. Fr. Hydrol.* 18 (2-3), 141-156.

Sedmak, G., Bina, D., Macdonald, J. & Couillard, L. 2005. Nine-year study of the occurrence of culturable viruses in source water for two drinking water treatment plants and the influent and effluent of a Wastewater Treatment Plant in Milwaukee, Wisconsin (August 1994 through July 2003). *Appl Environ Microbiol* 71 (2), 1042-1050.

Shaub, S. & Sorber, C. 1977. Virus and bacteria removal from wastewater by rapid infiltration through soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 609.

Sinton, L.W., Finlay, R.K., Pang, L. & Scott, D.M. 1997. Transport of bacteria and bacteriophages in irrigated effluent into and through an alluvial gravel aquifer. *Water air and soil pollut* 98 (1-2), 17-42.

Sinton, L.W., Hall, C.H., Lynch, P.A. & Davies-Colley, R.J. 2002. Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters. *Appl Environ Microbiol* 68 (3), 1122-1131.

Skraber, S., Gassilloud, B. & Gantzer, C. 2004a. Comparison of coliforms and coliphages as tools for assessment of viral contamination in river water. *Appl Environ Microbiol* 70 (6), 3644-3649.

Skraber, S., Gassilloud, B., Schwartzbrod, L. & Gantzer, C. 2004b. Survival of infectious Poliovirus-1 in river water compared to the persistence of somatic coliphages, thermotolerant coliforms and Poliovirus-1 genome. *Water Res* 38 (12), 2927-2933.

Smiley, J.R., Hoet, A.E., Traven, M., Tsunemitsu, H. & Saif, L.J. 2003. Reverse transcription-PCR assays for detection of bovine enteric caliciviruses (BEC) and analysis of the genetic relationships among BEC and human caliciviruses. *J Clin Microbiol* 41 (7), 3089-3099.

Sobsey, M.D., Dean, C.H., Knuckles, M.E. & Wagner, R.A. 1980a. Interactions and survival of enteric viruses in soil materials. *Appl Environ Microbiol* 40 (1), 92-101.

Sobsey, M.D., Hackney, C.R., Carrick, R.J., Ray, B. & Peck, M. 1980b. Occurrence of enteric bacteria and viruses in oysters. *J. Food Prot.* 43, 111-113.

Sobsey, M.D. & Jaykus, L.A. 1991. Human enteric viruses and depuration of bivalve mollusks. Molluscan Shellfish depuration. Edts Otwell W. S., Rodrick G.E., Martin R.E. *CRC Press.*, 71-114.

Spinner, M.L. & Di Giovanni, G.D. 2001. Detection and identification of mammalian reoviruses in surface water by combined cell culture and reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (7), 3016-3020.

Stramer, S.L. 1984. Fates of Poliovirus and Enteric indicator bacteria during treatment in a septic tank system including septage disinfection, Ph.D dissertation, University of Wisconsin, Madison.

Straub, T.M., Pepper, I.L. & Gerba, C.P. 1992. Persistence of viruses in desert soil amended with anaerobically digested sewage sludge. *Appl Environ Microbiol* 58 (2), 636-641.

Sugieda, M., Nagaoka, H., Kakishima, Y., Ohshita, T., Nakamura, S. & Nakajima, S. 1998. Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *Arch Virol* 143 (6), 1215-1221.

- Takahashi, K., Kitajima, N., Abe, N. & Mishiro, S. 2004.** Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. *Virology* 330 (2), 501-505.
- Tani, N., Dohi, Y., Kurumatani, N. & Yonemasu, K. 1995.** Seasonal distribution of adenoviruses, enteroviruses and reoviruses in urban river water. *Microbiol Immunol* 39 (8), 577-580.
- Tei, S., Kitajima, N., Takahashi, K. & Mishiro, S. 2003.** Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 362 (9381), 371-373.
- Theil, K.W. 1990.** Group A rotaviruses. In: Saif JL, Theil KW, editors. *Viral diarrhoea of man and animals*. West Palm Beach, FL. *CRC Press*, 35-72.
- Tierney, J.T., Sullivan, R. & Larkin, E.P. 1977.** Persistence of poliovirus 1 in soil and on vegetables grown in soil previously flooded with inoculated sewage sludge or effluent. *Appl Environ Microbiol* 33 (1), 109-113.
- Turner, C. & Burton, C.H. 1997.** The inactivation of viruses in pig slurries: A review. *Bioresource Technology* 61 (1), 9-20.
- van den Berg, H., Lodder, W.J., van der Poel, W., Vennema, H. & de Roda Husman, A.M. 2005.** Genetic diversity of Norovirus in raw and treated sewage water. *Res Microbiol* 156 (4), 532-540.
- van der Donck, I., van Hoovels, L., de Leener, K., Goegebuer, T., Vanderwegen, L., Frans, J., Rahman, M. & van Ranst, M. 2003.** [Severe diarrhea due to rotavirus infection in a Belgian hospital 1981-2002]. *Acta Clin Belg* 58 (1), 12-18.
- van Der Poel, W.H., Vinje, J., van Der Heide, R., Herrera, M.I., Vivo, A. & Koopmans, M.P. 2000.** Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. *Emerg Infect Dis* 6 (1), 36-41.
- van der Poel, W.H., Verschoor, F., van der Heide, R., Herrera, M.I., Vivo, A., Kooreman, M. & de Roda Husman, A.M. 2001.** Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, The Netherlands. *Emerg Infect Dis* 7 (6), 970-976.
- Vantarakis, A.C. & Papapetropoulou, M. 1998.** Detection of enteroviruses and adenoviruses in coastal waters of SW Greece by nested polymerase chain reaction. *Water Res* 32, 2365-2372.
- Vaughn, J.M. & Landry, E.F. 1977.** Data report : an assessment of the occurrence of human viruses in Long Island aquatic systems. p.
- Vaughn, J.M., Landry, E.F., Baranosky, L.J., Beckwith, C.A., Dahl, M.C. & Delihis, N.C. 1978.** Survey of human virus occurrence in wastewater-recharged groundwater on Long Island. *Appl Environ Microbiol* 36 (1), 47-51.
- Vaughn, J.M., Landry, E.F., Vicale, T.J. & Dahl, M.C. 1980.** Isolation of naturally occurring enteroviruses from a variety of shellfish species residing in long island and new jersey marine embayments. *J. Food Protect.* 43, 95-98.
- Vaughn, J.M., Landry, E.F., Beckwith, C.A. & Thomas, M.Z. 1981.** Virus removal during groundwater recharge: effects of infiltration rate on adsorption of poliovirus to soil. *Appl Environ Microbiol* 41 (1), 139-147.
- Villena, C., El-Senousy, W.M., Abad, F.X., Pinto, R.M. & Bosch, A. 2003.** Group A rotavirus in sewage samples from Barcelona and Cairo: emergence of unusual genotypes. *Appl Environ Microbiol* 69 (7), 3919-3923.
- Wait, D.A. & Sobsey, M.D. 2001.** Comparative survival of enteric viruses and bacteria on Atlantic ocean seawater. *Water SC. Technol.* 43 (12), 139 -142.
- Ward, B.K., Chenoweth, C.M. & Irving, L.G. 1982.** Recovery of viruses from vegetable surfaces. *Appl Environ Microbiol* 44 (6), 1389-1394.
- Ward, R.L., Knowlton, D.R. & Winston, P.E. 1986.** Mechanism of inactivation of enteric viruses in fresh water. *Appl Environ Microbiol* 52 (3), 450-459.
- Warner, R.D., Carr, R.W., McCleskey, F.K., Johnson, P.C., Elmer, L.M. & Davison, V.E. 1991.** A large nontypical outbreak of Norwalk virus. Gastroenteritis associated with exposing celery to nonpotable water and with *Citrobacter freundii*. *Arch Intern Med* 151 (12), 2419-2424.

## Question 4

**Wellings, F.M., Lewis, A.L., Mountain, C.W. & Pierce, L.V. 1975.** Demonstration of virus in groundwater after effluent discharge onto soil. *Appl Microbiol* 29 (6), 751-757.

**Wetz, J.J., Lipp, E.K., Griffin, D.W., Lukasik, J., Wait, D., Sobsey, M.D., Scott, T.M. & Rose, J.B. 2004.** Presence, infectivity and stability of enteric viruses in seawater: relationship to marine water quality in the Florida keys. *Mar. pollut Bull.* 48 (7-8), 698 - 704.

**Widdowson, M.A., van Doornum, G.J., van der Poel, W.H., de Boer, A.S., Mahdi, U. & Koopmans, M. 2000.** Emerging group-A rotavirus and a nosocomial outbreak of diarrhoea. *Lancet* 356 (9236), 1161-1162.

**Widdowson, M.A., Rockx, B., Schepp, R., van der Poel, W.H., Vinje, J., van Duynhoven, Y.T. & Koopmans, M.P. 2005.** Detection of serum antibodies to bovine norovirus in veterinarians and the general population in the Netherlands. *J Med Virol* 76 (1), 119-128.

**Wise, A.G., Monroe, S.S., Hanson, L.E., Grooms, D.L., Sockett, D. & Maes, R.K. 2004.** Molecular characterization of noroviruses detected in diarrheic stools of Michigan and Wisconsin dairy calves: circulation of two distinct subgroups. *Virus Res* 100 (2), 165-177.

**Yates, M.V. & Yates, S.R. 1988.** Modelling microbial fate in the subsurface environment. *CRC Critical Reviews in Environmental Control* 17 (4), 307-344.

**Yazaki, Y., Mizuo, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Sasaki, N., Gotanda, Y. & Okamoto, H. 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 (Pt 9), 2351-2357.

**Yeager, J.G. & O'Brien, R.T. 1979.** Enterovirus inactivation in soil. *Appl Environ Microbiol* 38 (4), 694-701.

**Zaiss, U. & Hennies, H.H. 1988.** Quantitative studies of the elimination of coliphages and other fecal indicators during wastewater treatment. *Zentrbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B* 186 (5-6), 512-525.

**Question 5 : Quels sont les moyens mis en œuvre dans l'industrie agroalimentaire pour maîtriser le danger viral (HACCP, qualité...) ? - Quel est l'impact des différents procédés utilisés en industrie agroalimentaire sur ce danger ?**



## Question 5 : Quels sont les moyens mis en oeuvre dans l'industrie agroalimentaire pour maîtriser le danger viral (HACCP, qualité...) ? Quel est l'impact des différents procédés utilisés en industrie agroalimentaire sur ce danger ?

### Question 5

Coordinateur de la question : M. Picoche

Membres du sous-groupe : Mme Legeay, Mme Le Guyader, M. Dubois

### Résumé de la Question 5

Selon la littérature (législation américaine relative au traitement de l'eau potable, norme Afnor relative aux tests d'efficacité virologique des désinfectants, directive pour des produits à risque dans l'industrie pharmaceutique) une réduction de 4 log (10 000 fois) du titre viral est nécessaire pour qualifier le traitement d'efficace. Toutefois, cette valeur devra être confrontée aux données de prévalence, en cours d'acquisition et futures, afin d'être adaptée aux évaluations du risque sanitaire et aux objectifs de sécurité alimentaire.

Sur le plan technologique, seule la stérilisation (température à cœur supérieure à 110°C durant plusieurs minutes) assure une très bonne sécurité au regard du risque viral. Cependant, des traitements thermiques de l'ordre de 90°C et plus, à cœur du produit et durant plusieurs minutes, démontrent, selon la littérature, une bonne efficacité sur différents aliments (chair de coquillages, purée de fraises par exemple). Toutefois, l'efficacité virucide d'un traitement thermique est très dépendante de la matrice et du virus étudié ; il est donc difficile de généraliser l'efficacité virucide de traitements moins drastiques.

On dispose de peu de données pour les autres technologies dont certaines connaissent quelques applications industrielles (hautes pressions par exemple).

L'utilisation de molécules désinfectantes est soumise à autorisation réglementaire, peu d'entre elles peuvent être utilisées comme auxiliaire technologique. Le chlore, l'acide peracétique et le système lactopéroxydase sont autorisés pour le lavage des salades pré-découpées mais s'ils sont bactéricides, leur activité virucide au contact des aliments reste à démontrer. Sous l'angle des désinfectants, peu de données sont disponibles au regard des virus transmissibles par les aliments et sur leur action dans l'environnement d'un atelier de production. De plus, la présence de biofilms potentiels est susceptible de limiter l'efficacité de ces désinfectants.

L'évaluation du risque viral lié à un aliment produit de façon industrielle reste complexe car celui-ci peut subir différents procédés durant son itinéraire technologique ; par exemple, il est susceptible de connaître plusieurs traitements thermiques selon son stade de transformation (matière première, produit semi élaboré, produit fini) aux effets encore méconnus sur les virus qui le contamineraient.

La réduction du risque passe par la mise en place d'un plan d'analyse des dangers - points critiques pour leur maîtrise (HACCP-Hazard Analysis and Critical Control Points) qui sera d'autant plus pertinent que les données utilisées seront robustes et représentatives de la réalité de terrain (prévalence sur les matières premières, efficacité des technologies, interactions avec les constituants de l'aliment, survie dans l'environnement de production...).

### A. Introduction

Suite aux différentes alertes sanitaires relatives à la présence de calicivirus dans des fruits importés d'Europe de l'Est, de nombreux professionnels de l'industrie agroalimentaire utilisateurs de ces matières premières se sont interrogés sur l'impact virucide des technologies qu'ils mettent en oeuvre. Afin de mieux répondre à ces questions, l'ADRIA NORMANDIE (centre technique agroalimentaire) a réalisé une large bibliographie sur ce thème et a publié début 2005 un ouvrage intitulé « Incidence des paramètres technologiques et des désinfectants sur le risque viral en agroalimentaire ».

Dans le cadre du groupe de travail de l'Afssa « virus transmissibles à l'homme par voie orale » une question est posée sur l'impact des différents procédés utilisés en agroalimentaire. La première partie de ce document vise

à répondre à cette question et correspond à une extraction partielle de l'ouvrage bibliographique pré-cité. La seconde partie du document vise à faire un état des lieux du niveau de sensibilisation des professionnels du secteur agroalimentaire au danger viral et à présenter les démarches qualité mises en œuvre. Pour ce, une enquête a été menée auprès d'industriels et d'interprofessions (voir liste en début du rapport) ; cette enquête a été menée conjointement par l'ACTIA et l'Afssa. Dans tous les cas, les interprofessions contactées correspondent à des activités de transformation de matières premières potentiellement à risques et/ou mettant en œuvre de nombreuses manipulations susceptibles d'entraîner des post-contaminations virales non détruites par un traitement technologique sur le produit fini. Les risques de contamination virale liés à l'eau de consommation et aux coquillages vivants ne sont pas traités dans le cadre de ce document ; ils le sont par ailleurs dans les questions 4 et 6.

Enfin, les usages domestiques (préparations, conservation, etc.) et leur impact au regard du risque viral ne sont pas traités dans le cadre de ce document.

## **B.Impact des différents procédés utilisés en agroalimentaire sur le danger viral**

Cette synthèse a pour objectif de transposer, dans la mesure du possible, les résultats obtenus en laboratoire aux procédés agroalimentaires.

Elle se décompose en trois parties :

- présentation des principaux procédés de conservation utilisés en agroalimentaire et estimation de leur efficacité au regard de l'élimination virale (Tableau 30) ;
- synthèse, par aliment, des principales données publiées sur l'efficacité virucide du traitement thermique (Tableau 31) ;
- évaluation de l'efficacité virucide des traitements thermiques utilisés lors de la transformation des fruits rouges (Tableau 32 et Tableau 33).

### **B.1 Procédés de conservation en agroalimentaire et élimination virale**

Le Tableau 30 présente les principaux procédés étudiés accompagnés des caractéristiques technologiques se rapportant à quelques produits alimentaires afin d'apprécier leur efficacité au regard de l'abattement viral ainsi que les références bibliographiques sources.

Selon la littérature (législation américaine relative au traitement de l'eau potable, norme Afnor relative aux tests d'efficacité virologique des désinfectants, directive pour des produits à risque dans l'industrie pharmaceutique) une réduction de 4 log (10.000 fois) du titre viral est nécessaire pour qualifier le traitement d'efficace. Toutefois, cette valeur devra être confrontée aux données de prévalence, en cours d'acquisition et futures, afin d'être adaptée aux évaluations du risque sanitaire et aux objectifs de sécurité alimentaire.

Les commentaires proposés pour évaluer l'efficacité du procédé appliqué à l'aliment concernent l'élimination virale, d'une façon générale.

Seule la stérilisation mettant en œuvre des traitements thermiques, à cœur du produit, supérieurs à 110°C et durant plusieurs minutes, semble pouvoir assurer une bonne sécurité au regard du risque viral. Ce commentaire est une extrapolation des bons résultats de destruction virale obtenus à 90°C. En effet, des essais avec des températures supérieures à 100°C ont donné lieu à peu de publications compte tenu des forts abattements viraux obtenus à 90°C/100°C (à cœur du produit). Pour les autres procédés thermiques (cuisson/blanchiment/pasteurisation/séchage), les pratiques industrielles sont multiples (température comprise entre 50 et 100°C durant des temps variables : de quelques secondes à quelques dizaines de minutes) ; aussi l'estimation de l'efficacité virucide du traitement thermique n'est possible qu'au cas par cas et produit par produit.

Les techniques utilisant le froid négatif (congélation) s'avèrent peu ou pas efficaces au regard du risque viral. Par contre, la lyophilisation donne des résultats variables selon les virus.

Pour les technologies athermiques, la bibliographie contient de rares publications et des travaux complémentaires sont nécessaires pour vérifier quelques premiers résultats obtenus (acidification/fermentation/conservateurs par exemple : les publications sont anciennes et rien n'a été publié sur le sujet ces dernières années).

Pour les autres technologies athermiques (dites alternatives car elles ont pour objectif de réduire ou de se substituer au traitement thermique de pasteurisation qui peut entraîner des altérations organoleptiques de l'aliment), la bibliographie contient des publications généralement récentes car certaines de ces technologies

(hautes pressions, par exemple) connaissent quelques applications industrielles. Comme pour la température, leur efficacité est variable en fonction des virus.

Il est important de noter que leur utilisation dans le cadre industriel est soumise à autorisation préalable par l'administration (par exemple, dossier Novel Food pour les hautes pressions et liste positive dans une directive européenne pour l'irradiation).

Tableau 30 : principaux procédés de conservation en agroalimentaire

Procédé	Paramètres technologiques	Matrice	Élimination virale	Sources
<b>Chaleur (à cœur du produit)</b>				
Stérilisation UHT classique	>130°C/qq sec 110-120°C/qq min	Tout produit	Bonne	-
	148°C/2 à 3 sec	Lait	FMDV inactivation complète	(Cunliffe <i>et al.</i> 1978)
Cuisson/ Pasteurisation	60 à 100°C/de qq dizaines de sec à qq dizaines de min	Tout produit	variable (selon barèmes et produits)	Cf. Tableau 31
Blanchiment	90 à 100°C/qq min	Végétaux	-	-
Séchage	50 à 90°C/qq dizaines de min	Tout produit	-	-
<b>Froid</b>				
Congélation	-15 à -20°C/plusieurs mois	Tout produit	Faible ou nulle	
	5 mois à -20°C	Huîtres	NV toujours infectieux	(Linco & Grohmann 1980)
Lyophilisation	(congélation/sublimation sous vide)	Tout produit	Variable suivant virus	
		Lait	Rotavirus Réduction 1-3 log	(Meng <i>et al.</i> 1987)
		Salade de pommes de terre, saumon, bœuf roti bœuf roti et légumes, poulet en sauce	Poliovirus Réduction 3-4 log	(Heidelbaugh Giron 1969)
<b>Autres facteurs</b>				
Acidité (pH<4)		Tout produit	À démontrer	
		Purée de fraises	VHA A 85°C pH 3,3 D = 1,04 min A 85°C pH 4,3 D = 2,78 min	(Deboosere <i>et al.</i> 2004)
Fermentation (enzymes)		Tout produit	Nulle (effet pH ?)	
		Saucisses Viande hachée	Coxsackievirus Aucune élimination virale	(Herrmann & Cliver 1973)
		Saucisses	Poliovirus et ECHOvirus Aucune élimination virale	(Kantor & Potter 1975)
Conservateurs* (acides organiques...)		Tout produit	Faible et variable suivant les conservateurs	
	Acides sorbique et benzoïque	Mayonnaise 50 % MG	Virus de Newcastle $\delta = 1,392$ h ( $p = 0,26$ ) contre $\delta = 89$ h ( $p = 0,48$ ) sans conservateurs	(Triemer & Weinhold 1981)
	Nitrites	Saucisses	Poliovirus et ECHOvirus Aucune élimination virale	(Kantor & Potter 1975)
Conditionnement (Atmosphère modifiée)	Mélange N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Tout produit	Faible ou nulle suivant le mélange	
	70/30 à T amb.	Laitues	Réduction VHA 1,28 log	(Bidawid <i>et al.</i> 2001)

**Question 5**

Procédé	Paramètres technologiques	Matrice	Élimination virale	Sources
<b>Technologies alternatives (soumises à autorisation réglementaire)</b>				
<b>Hautes pressions</b>	420 MPa/10 à 30 sec (Jus de fruits (France))	Tout produit	Potentielle (variable selon les virus)	
	250 MPa/180 sec (Jambon cuit (Espagne))			
	400 MPa/10 à 30 sec (Produits à base de fruit (Japon))			
	240 MPa/1 h	Suspension# poliovirus 1	Aucune réduction	(Oliveira <i>et al.</i> 1999)
	600 MPa à 20°C/1 h	Suspension# poliovirus	Aucune réduction	(Wilkinson <i>et al.</i> 2001)
	400 MPa à 20°C/15 min	Suspension# adénovirus	> 5 log	
	220 MPa/2 h	Suspension# adénovirus	5 log	(Pontes <i>et al.</i> 1997)
	250 MPa/1 h	Suspension# rotavirus bovin	5 log	
	250 MPa/30 min	Suspension# rotavirus simien	4 log	
	300 MPa/2 min	Suspension# rotavirus	8 log	(Khadre & Yousef 2002)
	350 MPa/1 min	Huîtres	> 1 log de VHA	(Calci <i>et al.</i> 2005)
	375 MPa/1 min		> 2 log VHA	
	400 MPa/1 min		> 3 log VHA	
<b>Champs électriques pulsés</b>			Faible	
	29kV/cm	Suspension# virale	Rotavirus humain Réduction de 1 log	(Khadre & Yousef 2002)
<b>Lumière pulsée</b>			Variable suivant la dose	
	0,5 J/cm <sup>2</sup>	Suspension# virale protéinée	Poliovirus 1 et VHA Réduction de 2 log	(Roberts & Hopes 2003)
2 J/cm <sup>2</sup>	Poliovirus 1 et VHA Réduction > 5 log			
<b>Ultra-violet</b>	UVB			
	34 mJ/cm <sup>2</sup>	Suspension# CaCV et FeCV	Réduction de 3 log	(Duizer <i>et al.</i> 2004)
<b>Irradiation*</b>	0,5 à 10 kGy	Tout produit	Variable selon les virus	
		Poisson	Poliovirus 1 % = 1,308 kGy p = 0,697	(Heidelbaugh & Giron 1969)
		Palourdes, huîtres	VHA, D = 2,02 kGy Poliovirus, D = 2,4 kGy Rotavirus, D = 3,1 kGy	(Mallet <i>et al.</i> 1991)
		Viandes hâchées	Coxsachievirus B2 D = 7 kGy	(Sullivan <i>et al.</i> 1973)
		Laitues	VHA, D = 2,73 kGy	(Bidawid <i>et al.</i> 2000a)
		Fraises	VHA, D = 3,02 kGy	

Remarque :

\* signifie que les valeurs de D/δ et p ont été calculées par l'ADRIA-NORMANDIE à partir des données de base de la publication.

# suspension virale (milieu de culture).

calcul de D (temps de réduction logarithmique) selon le modèle linéaire.

calcul de δ (première durée de réduction décimale) et p (paramètre de forme) selon le modèle de Mafart (modèle non linéaire).

- : pas de données.

## B.2 Synthèse des données de réduction virale lors du traitement thermique de différents aliments

Même si l'application de la température a fait l'objet du plus grand nombre de publications, il n'existe pas de données se rapportant aux principaux virus à risque (VHA, *Norovirus*, *Rotavirus*) pour l'ensemble des matrices alimentaires. De plus, pour le *Norovirus*, l'absence de lignée cellulaire spécifique fait que les travaux sont conduits sur un autre calicivirus (FeCV). Le Tableau 31 reprend les principales données obtenues sur différents virus.

Tableau 31 : publications par produits relatives aux traitements thermiques (à cœur du produit)

Produit	Barème (à cœur du produit)	Réduction	Source	Commentaires	
Lait (3,5 % MG)	71°C/10,8 sec	1 log VHA	(Bidawid <i>et al.</i> 2000b)	Temps non proportionnel à 71°C (> si contamination virale + forte)	
	71°C/8,31 min	4 log VHA			
	80°C/6 sec	1 log VHA			
	80°C/24,6 sec	4 log VHA			
Crème (18 % MG)	71°C/31,2 sec	1 log VHA		Effet « retardateur ou protecteur » de la matrice (matière grasse)	
	71°C/12,67 min	4 log VHA			
	80°C/7,2 sec	1 log VHA			
	80°C/27,6 sec	4 log VHA			
Lait (3,5 % MG)	55°C/30 min	> 5 log poliovirus	(Strazynski <i>et al.</i> 2002)	Effet « retardateur ou protecteur » du lait et du yaourt/à l'eau	
	62°C/30 min	> 5 log poliovirus			
	72°C/15 sec	0,56 log poliovirus			
	72°C/30 sec	> 5 log poliovirus			
	95°C/15 sec	> 5 log poliovirus			
Yaourt (3,5 % MG)	55°C/30 min	> 5 log poliovirus			Complète inactivation poliovirus 1 (6,4 log) et ECHOvirus 6 (4,4 log)
	42°C/30 min	0,30 log poliovirus			
	42°C/3h	0,41 log poliovirus			
Œufs	56,7°C/20 min	Aucun abattement Adénovirus 1 ECHOvirus 7			(Strok & Potter 1972)
	60°C/3,5 min				
Viande de porc	50°C/40 min		(Pirtle <i>et al.</i> 1997)		
Coquillages (coques)	85-90°C/1 min	4,5 log FeCV	(Slomka & Appleton 1998)	Résultats non concordants sur VHA	
	85-90°C/1 min	5 log VHA	(Millard <i>et al.</i> 1987)		
Coquillages (moules)	60°C/30 min	> 4 log VHA	(Crocchi <i>et al.</i> 1999)		
	80°C/15 min				
	85-90°C/1 min	<3 log VHA			
	90°C/2 min	5 log VHA			
Crabes	94°C/8 min	4 log ECHOvirus 1 > 4 log rotavirus	(Hejkal & Gerba 1981)		
Purée de fraises (28 % de sucre)	80°C/4,88 min	4 log VHA	(Deboosere <i>et al.</i> 2004)	Effet « retardateur ou protecteur » de la matrice (sucre)	
	90°C/1,28 min				
Purée de fraises (52 % de sucre)	80°C/35,76 min	4 log VHA			
	90°C/12 min				

## Question 5

Pour les produits laitiers (lait et crème), les résultats de (Bidawid *et al.* 2000b) montrent que la réduction n'est pas linéaire car il faut un temps beaucoup plus important, à 71°C, pour détruire 4 log que le temps nécessaire pour détruire 4 fois 1 log. En outre, les résultats montrent bien l'effet matrice et le rôle protecteur ou retardateur de la matière grasse qui réduit la vitesse de destruction virale. À titre indicatif et selon ces données, un traitement standard de pasteurisation (71°C/20 sec) permettrait d'éliminer totalement le risque viral dans un lait entier contaminé par 2 log de VHA.

Pour les coquillages consommés cuits (coques/moules), les résultats obtenus diffèrent. Pour (Millard *et al.* 1987), un traitement à cœur de 85/90°C durant 1 minute permet d'inactiver 5 log de VHA alors que pour (Crocchi *et al.* 1999), ces conditions permettent une destruction inférieure à 3 log. Sur le plan technologique, l'application de la recommandation faite par le Ministère Britannique en 1988, (chauffage des mollusques bivalves à cœur à 90°C pendant 1,5 minute) mériterait d'être vérifiée notamment pour les coquillages importés de zones à risques et traités thermiquement sur les lieux de pêche du pays d'origine. Lors d'une enquête suite à la consommation de coquillages contaminés, le taux d'attaque était de 54 % pour les convives ayant consommé des huîtres cuites à la vapeur et 56 % pour ceux ayant consommé les huîtres crues (Dowell *et al.* 1995).

Pour les purées de fruits rouges sucrées, les résultats montrent l'effet important de la matrice sur la thermorésistance du VHA. En effet, l'élévation de la teneur en sucre augmente la thermorésistance alors que la diminution de pH diminue la thermorésistance.

### B.3 Évaluation de l'efficacité des traitements thermiques utilisés lors de la transformation des fruits rouges

Ce paragraphe a pour objectif de donner des éléments qui permettront de mesurer la complexité de l'appréciation du risque viral lié à un aliment en fonction des technologies de transformation mises en œuvre.

L'exemple retenu concerne le risque à calicivirus sur des framboises importées de Serbie qui ont donné lieu à deux alertes en Europe (1998 et 2003). Les framboises sont importées crues surgelées et les utilisations finales sont multiples.

À titre d'exemple, on peut citer :

- utilisation à l'état cru :
  - en l'état : consommation individuelle (salade de fruits...);
  - comme ingrédient dans un produit élaboré (pâtisserie surgelée...);
- utilisation à l'état transformé après traitement thermique (Tableau 32) et intervenant comme ingrédient dans un produit élaboré susceptible de subir un traitement thermique complémentaire.

**Tableau 32 : exemples de cumuls possibles de technologies sur l'ingrédient et le produit fini correspondant**

Ingrédient		Produit fini	
Forme	Technologie	Nature	Technologie
Purée de fruits ± sucrée	Pasteurisation	Pâtisserie Glaces	Pasteurisation possible
		Compote Confiture	Cuisson/Pasteurisation
Fruits sur sucre ± sucrés	Pasteurisation	Yaourts	-
Fruits entiers ou morceaux	Lyophilisation/séchage	Muesli	-

Aussi, la matière première potentiellement contaminée est susceptible, en fonction de son utilisation finale (nature du produit) de subir des traitements thermiques à plusieurs niveaux de la chaîne de transformation :

- dans son pays d'origine (ex. concentré) ;
- dans le pays transformateur (ingrédient/produit fini).

Le Tableau 33 donne des exemples de procédés thermiques utilisés lors de la transformation des fruits rouges et montre que pour une technologie donnée, par exemple, la pasteurisation de fruits rouges, les pratiques industrielles en terme de barème thermique sont très variables (60 à 100 °C/quelques secondes à quelques minutes) en fonction :

- de la nature du produit fini dans lequel sera intégrée la purée (glace/pâtisserie, etc.) ;
- du positionnement commercial du produit fini (ex. un produit haut de gamme valorisera au mieux la qualité sensorielle du produit fini et limitera le plus possible l'impact négatif du traitement thermique).

De plus, la bibliographie (Deboosere *et al.* 2004) montre que l'impact virucide du traitement thermique dépend très fortement de la matrice :

- l'élévation de la teneur en sucre diminue l'efficacité du traitement : rôle retardateur ou protecteur ;
- la réduction du pH augmente l'efficacité du traitement : rôle synergique.

**Tableau 33 : exemples de procédés thermiques utilisés pour la transformation des fruits rouges**

Procédé	Exemples de produits	Barème à cœur du produit
Pasteurisation	Fruits au sirop	95 à 100°C/15 à 30 sec
	Coulis	
	Confiture	Cuisson à ébullition Empotage à chaud (80 à 90°C)
	Compote	
	Jus de fruits	Pasteurisation dans l'emballage (75 à 85°C/qq min) Flash pasteurisation en vrac (95 à 100°C/10 à 50 sec)
	Fruits sur sucre	Flash pasteurisation en vrac (80 à 90°C/qq min)
	Purée ± sucrée	60 à 100°C/qq. sec à qq min
Concentration	Concentrés pour jus de fruits, purée...	Flash pasteurisation (90°C/qq sec) + évaporation sous vide (50 à 80°C/qq min)
Séchage	Produits entiers déshydratés	Air chaud (50 à 100°C/qq. min à qq dizaines de min) Lyophilisation (congélation et sublimation)
Confisage/ semi-confisage	Produits entiers	qq jours en solution sucrée (objectif $a_w \approx 0,6$ ) couplage possible avec séchage
Congélation	Produits entiers	-18°C

**Remarque :** les fruits rouges ont un pH inférieur à 4,5 et sont donc considérés comme des produits acides à risque microbiologique réduit. C'est pourquoi, dans ce cas, la stérilisation met en œuvre des barèmes thermiques ne dépassant pas 100°C. Toutefois les virus entériques humains tels que le virus de l'hépatite A ou les norovirus peuvent résister à des pH proches de 3.

Ces 2 tableaux montrent que, pour une matière première à risque, les pratiques industrielles en terme de traitement thermique sont multiples car adaptées aux besoins et aux marchés.

L'estimation du risque viral sur un aliment nécessite une approche de type HACCP, comparable à celle mise en œuvre en microbiologie au regard des bactéries pathogènes. Une estimation pertinente ne peut être faite qu'au cas par cas en intégrant l'ensemble de l'itinéraire technologique de l'aliment à consommer.

#### B.4 Auxiliaires technologiques

Il existe très peu de données sur l'efficacité virucide des molécules désinfectantes et peu d'entre elles ont la capacité d'être utilisées comme auxiliaire technologique. Il faut rappeler que ces molécules sont soumises à autorisation réglementaire.

### B.4.1 Dérivés chlorés

Les auteurs (Mariam & Cliver 2000) ont testé la décontamination de fraises préalablement contaminées par le VHA, au dioxyde de chlore par immersion pendant 30 secondes à température ambiante (l'action du ClO<sub>2</sub> est ensuite stoppée par immersion des fraises dans du thiosulfate de Na 0,03 M). Une teneur en chlore de 2 mg/L (ppm) n'est pas suffisante pour réduire la teneur en VHA d'une unité logarithmique (<70 %).

Le projet français AQS R01/04 a permis d'évaluer l'effet du chlore lors du lavage de salades pré-découpées artificiellement inoculées avec des bactériophages (ARN F-spécifiques) en utilisant une méthode de dénombrement validée (Dubois *et al.* 2006). Ces travaux ont ainsi montré que le chlore était efficace sur des virus en suspension dans l'eau (réduction supérieure à 4 log) mais que son activité était réduite quand ces virus se trouvaient adsorbés à la matrice (abattement supérieur de 0,7 log par rapport au lavage sans chlore).

### B.4.2 Acide peracétique

L'efficacité bactéricide de l'acide peracétique a été démontrée comme auxiliaire technologique sur des eaux de lavage de salades, des eaux de process en industrie sucrière et des eaux de lavage d'œufs entiers (Afssa 2000, 2002a, 2003, Beuchat *et al.* 2004). Sur le plan virucide, les publications sont rares, son efficacité a été testée sur des eaux de lavage de salades ou de fraises (Lukasik *et al.* 2003, Allwood *et al.* 2004a) et montre qu'à une dose de 100 mg/L (ppm), l'acide peracétique permet une réduction supérieure à 98 % vis-à-vis du poliovirus de type 1 (Lukasik *et al.* 2003).

### B.4.3 Ozone

Les études de (Crocì *et al.* 1992, Crocì *et al.* 1999) ont permis de comparer, sur 3 jours, l'épuration de moules (*Mytilus galloprovincialis*) dans de l'eau de mer artificielle ozonée et de l'eau non ozonée. Le mode opératoire correspondait au changement d'un litre d'eau de mer par de l'eau de mer ozonée (teneur max. en ozone : 10 mg/L) à la vitesse de 6 L/min (10 min). Les résultats sont reproduits dans le Tableau 34.

**Tableau 34 : épuration de moules contaminées par du virus de l'hépatite A (teneur initiale : 10<sup>3,2</sup> TCID<sub>50</sub>/mL) ou le poliovirus 1 (10<sup>4,0</sup> TCID<sub>50</sub>/mL) dans de l'eau de mer ozonée ou non**

Temps d'épuration (h)	Abattement du VHA (log TCID <sub>50</sub> /mL)		Abattement du PV1 (log TCID <sub>50</sub> /mL)	
	Eau non traitée	Eau ozonée	Eau non traitée	Eau ozonée
2	0,6	1,2	0,5	1,0
24	1,2	1,7	1,0	2,5
48	1,2	1,7	1,3	2,5
72	1,4	2,2	1,5	2,5

Tiré de (Crocì *et al.* 1992, Crocì *et al.* 1999)  
Les valeurs correspondent à des moyennes de 5 expériences

L'action de l'ozone sur les deux virus testés est immédiate et permet un niveau d'abattement similaire. L'absence de rémanence de l'ozone est confirmée par l'évolution semblable de la teneur virale avec le temps d'épuration dans l'eau ozonée et dans l'eau non ozonée.

Après 24 h, l'évolution des titres viraux est très lente : l'épuration ne permet pas un relargage important des virus présents dans les tissus de la moule.

Selon cette étude, les teneurs précises en ozone ne sont pas accessibles, mais on observe que les sensibilités du poliovirus-1 (Mahoney) et du VHA à l'ozone sont très semblables.

### B.4.4 Système lactoperoxydase

Un avis de l'Afssa a été rendu le 2 juin 2003 concernant l'emploi du système lactoperoxydase comme auxiliaire technologique pour le traitement des salades de 4<sup>e</sup> gamme. Au vu de l'ensemble des considérations susmentionnées, l'Afssa a estimé que la consommation des salades crues prêtes à l'emploi (IV<sup>ème</sup> gamme) traitées avec le procédé évalué, sous les conditions de fonctionnement décrites dans le dossier d'évaluation, n'était pas de nature à présenter un risque sanitaire pour le consommateur. Néanmoins, cet avis soulignait qu'au vu des éléments présentés, il ne paraissait pas possible de conclure sur l'efficacité virucide du procédé.

### B.4.5 Autres molécules

Une comparaison de trois molécules désinfectantes a été réalisée sur des fraises et des salades contaminées par 7,5 log TCID<sub>50</sub> de FeCV. Les fraises et les laitues contaminées sont immergées dans 100 mL de solutions de désinfectants pendant 10 min. Après élution (agitation pendant 15 min en tampon glycine 0,05 M (pH 9,5) contenant 3 % d'extrait de bœuf), des virus dans l'éluat sont précipités à pH 3,5 et le culot de centrifugation (4 000 X g, 15 min) est repris dans du tampon phosphate et titré sur cellules. Les meilleurs résultats d'abattement viral sont repris dans le Tableau 35.

**Tableau 35 : efficacité des désinfectants sur le FeCV contaminant les fraises et les laitues**

Désinfectant	Teneur	Facteur multiplicateur	Abattement viral sur laitues (log)	Abattement viral sur fraises (log)
CH <sub>3</sub> CO <sub>3</sub> H 15 % + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 11 %	Réf. Fab. X 4	X 4	3,0	3,0
NaClO 5,25 %	800 mg/L (ppm)	X 4	1,5	1,0
Quats 10 %	800 mg/L (ppm)	X 4	2,0	1,5

Tiré de (Gulati *et al.* 2001).

### B.5 Conclusion

Même si la température a fait l'objet des publications les plus nombreuses, on ne dispose pas de résultats sur toutes les matrices alimentaires avec les principaux virus (VHA, norovirus, rotavirus). De plus, pour le norovirus, l'absence de lignée cellulaire spécifique fait que les travaux sont conduits sur d'autres calicivirus (FeCV par exemple).

Contrairement à la bactériologie alimentaire, le calcul des paramètres *D* et *z* n'est pas aussi fréquent car les courbes de destruction ne sont pas toujours linéaires. Les hypothèses avancées concernant les mécanismes d'agrégation et d'adsorption mériteraient d'être approfondies afin de disposer de données plus robustes. Les résultats obtenus montrent aussi l'effet important de la matrice sur la thermosensibilité virale : soit en ayant un effet retardateur ou protecteur (sucres/matières grasses...), soit en ayant un effet synergique (pH, molécules spécifiques...).

Des publications récentes apparaissent sur de nouvelles technologies en cours de développement industriel. Ces technologies dites alternatives sont athermiques (hautes pressions, lumière pulsée, par exemple) et donnent des résultats intéressants mais variables selon les virus. Ces études méritent d'être développées sur les matrices alimentaires. Par contre, il est important de noter que sur le plan européen, elles sont soumises à autorisation (règlement CE N°258/97 du 27.01.1997 relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires, dit règlement NOVEL FOOD), ce qui ralentit leur développement industriel.

Pour l'irradiation, les données sont plus nombreuses et plus anciennes. Là encore, l'efficacité varie avec les virus. Sur le plan réglementaire, il existe une directive européenne qui liste les produits autorisés et les doses maximales. Le nécessaire étiquetage de ce traitement limite fortement son utilisation industrielle.

Sur le plan chimique, quelques auxiliaires technologiques sont autorisés comme biocides. Si sur le plan de l'efficacité bactéricide, la démonstration est faite, il existe très peu de données sur l'efficacité virucide, notamment sur les nouvelles molécules.

**Au niveau des professionnels du secteur agroalimentaire, une meilleure maîtrise du risque viral passe par la mise en place d'un plan HACCP qui sera d'autant plus pertinent que les données utilisées seront robustes et représentatives de la réalité de terrain (prévalence sur les matières premières, efficacité des technologies, interactions avec les constituants de l'aliment, survie dans l'environnement en contact direct avec l'aliment...).**

**Le champ d'investigation est donc immense. Aussi, il apparaît nécessaire de générer des données fiables pour aider les professionnels à prévenir le risque (choix des matières premières, adaptation de la technologie, optimisation du plan de nettoyage-désinfection...) et à réagir le plus efficacement possible en cas d'alerte sanitaire.**

## C. Quels sont les moyens mis en œuvre dans l'industrie agroalimentaire pour maîtriser le risque viral (HACCP, qualité, etc.) ?

### Question 5

#### C.1 Contexte

Depuis quelques années, quelques programmes de recherche appliquée ont été initiés en France, dans le cadre d'appels d'offre nationaux (AQS, ACTIA...) et en liaison avec des professionnels. Ces projets sont listés ci-après car ils permettent de mesurer le niveau de sensibilisation de certaines filières agroalimentaires :

##### C.1.1 Fruits rouges

- Projet Aliment-Qualité-Sécurité (AQS) soutenu par la Direction générale de l'alimentation. Projet R98-18 intitulé « Bases méthodologiques de la surveillance des virus entériques contaminant les denrées végétales ». Partenaires : Afssa, Faculté de Médecine et Pharmacie de Clermont-Ferrand et les sociétés Descours et Chaucer-Food. Rapport final (2002) ;
- Projet Aliment-Qualité-Sécurité (AQS) soutenu par la Direction générale de l'alimentation. Projet Roo-05 intitulé « Effet de paramètres physico-chimiques sur la thermorésistance du virus de l'Hépatite A dans des préparations de fruits ». Partenaires : Danone, Institut Pasteur de Lille, centre Hospitalier Universitaire de Nantes, et Athys Groupe. Rapport final (2002) ;
- Projet ACTIA soutenu par la Direction générale de l'alimentation. Projet intitulé « Thermo-inactivation des virus contaminants les fruits rouges surgelés importés d'Europe centrale (effet synergique du pH). Partenaires : ADRIA NORMANDIE, Afssa, Institut Pasteur de Lille, laboratoire de chimie, physique et microbiologique pour l'environnement de Nancy, Kerry-Ravifruit, Diana végétal, les vergers de Boiron. (rapport final prévu mi-2008).

##### C.1.2 Végétaux pré-découpés

- Projet Aliment-Qualité-Sécurité (AQS) soutenu par la Direction générale de l'alimentation. Projet Ro1-04 intitulé « Contamination des denrées végétales : évaluation du procédé de lavage des salades destinées à la fabrication des produits de 4<sup>e</sup> gamme ». Partenaires : Afssa, centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Faculté de Médecine et Pharmacie de Clermont-Ferrand, Institut Pasteur de Lille et Syndicat des fabricants de produits végétaux frais prêts à l'emploi (Rapport final, 2006) ;
- Projet Européen Virus safe Seafood (5<sup>ème</sup> PCRD, QLRT-1999-0634) avec un volet sur la purification des coquillages en partenariat avec les professionnels. Partenaires : Ifremer, INRA, U. Barcelone (Espagne), RIVO et RIVM (Pays Bas), U. Helsinki (Suède), U. Lahti (Finlande), BCM Houston (USA). Ce projet a montré l'impact des rejets humains *via* les stations d'épuration sur la qualité des coquillages et surtout la difficulté d'éliminer les particules virales des coquillages contaminés ;
- Projet Européen Seafood+ (6<sup>ème</sup> PCRD), sous-projet RedRisk : identifier les sources de contamination et réduire le risque en zone de production. Partenaires : Ifremer, ISS (Italie), Cefas (UK), U. Taragone et U. Santiago de Compostello (Espagne), Irlande, EAMP (European Association of Molluscan Producer). Projet en cours. Dans ce projet, la mise en évidence des sources de contamination va permettre de mettre en place un système d'alerte rapide afin d'éviter la contamination des coquillages. Par ailleurs, dans un autre volet de ce projet les méthodes de détection du virus de l'hépatite A et des norovirus par RT-PCR en temps réel sont développées.

Ces projets illustrent bien la forte sensibilisation des professionnels importateurs et transformateurs de fruits rouges importés, suite aux différentes alertes à calicivirus sur fruits rouges en provenance d'Europe centrale. Ces travaux ont permis des mises au point méthodologiques (protocoles d'extractions et de détections de calicivirus sur les matières premières) et d'accumuler des données de thermo-résistance du virus de l'Hépatite A lors des traitements de pasteurisation. Pour les végétaux frais prêts à l'emploi, l'étude a permis de mettre au point des méthodologies, de tester l'impact virucide du chlore utilisé lors du lavage-désinfection et de conclure sur un risque viral estimé à ce jour faible pour cette filière.

Pour ces projets visant à mesurer l'efficacité de traitements technologiques, des résultats sont présentés dans la première partie de la question 5.

## C.2 Résultats de l'enquête

(voir courrier en Annexe et liste en début de rapport)

Ce risque émergent est peu connu et donc non intégré dans les plans HACCP à quelques exceptions près. En effet, les professionnels qui ont suivi les programmes de recherche décrits précédemment ou qui ont été concernés par les alertes à calicivirus sur les fruits rouges en provenance des pays d'Europe de l'Est ont, dans la mesure du possible, pris en compte le risque viral au travers de différentes actions préventives :

- exigences au regard des bonnes pratiques culturales afin de limiter les risques de contaminations par les eaux d'irrigation, des matières premières (végétaux crus prêts à l'emploi) avec une intégration dans le cahier des charges des producteurs (guide de bonnes pratiques hygiéniques des végétaux crus prêts à l'emploi : journal Officiel 1996) ;
- modification du barème de pasteurisation des fruits rouges (purée/fruits sur sucre par exemple) afin d'augmenter l'effet virucide ;
- évaluation de l'efficacité virucide du chlore comme auxiliaire technologique, lors du lavage de la salade pré-découpée.

De façon générale, les syndicats interprofessionnels, dans leur réflexion relative à l'analyse des risques biologiques, n'ont pas retenu comme prioritaire le danger viral de par le peu d'alertes sanitaires relatives à ce risque. Par contre, les bonnes pratiques hygiéniques mises en œuvre durant la transformation des matières premières (port de gants et de masque bucco-nasal, utilisation d'eau potable en cours de process, désinfection des locaux et du matériel...) au regard du risque microbiologique constituent un élément de maîtrise pertinent du risque viral.

## C.3 Conclusion

En l'état actuel des données épidémiologiques, les virus d'origine alimentaire n'ont pas été retenus comme danger pertinent dans le cadre de l'HACCP, à quelques exceptions près ; par contre toutes les interprofessions se sont montrées intéressées par :

- des données de prévalence sur les matières premières et dans l'environnement (surfaces en contact avec l'aliment, par exemple) ;
- la quantification de l'impact virucide de différentes technologies mises en œuvre durant la transformation (y compris l'opération de nettoyage-désinfection).

**L'obtention de ces données permettra une évaluation du risque viral et sa meilleure gestion par les professionnels.**

### Question 5

**Afssa 2000.** Avis 2000-SA-0001 relatif à la demande d'autorisation d'un essai à l'échelle industrielle d'un auxiliaire technologique à base d'acide peracétique pour le lavage de salades.

**Afssa 2002.** Avis 2002-SA-0108 relatif à la demande d'autorisation d'emploi d'acide peracétique comme auxiliaire technologique dans l'industrie sucrière.

**Afssa 2003.** Avis 2003-SA-0017 relatif à l'autorisation d'emploi d'une préparation à base de peroxyde d'hydrogène, d'acide acétique et d'acide peracétique dans l'eau de lavage des œufs coquilles avant cassage.

**Allwood, P.B., Malik, Y.S., Hedberg, C.W. & Goyal, S.M. 2004.** Effect of temperature and sanitizers on the survival of feline calicivirus, Escherichia coli, and F-specific coliphage MS2 on leafy salad vegetables. *J Food Prot.* Jul 67 (7), 1451-1456.

**Beuchat, L.R., Adler, B.B. & Lang, M.M. 2004.** Efficacy of chlorine and a peroxyacetic acid sanitizer in killing *Listeria monocytogenes* on iceberg and Romaine lettuce using simulated commercial processing conditions. *J Food Prot.* 67 (6), 1238-1242.

**Bidawid, S., Farber, J.M. & Sattar, S.A. 2000a.** Inactivation of hepatitis A virus (HAV) in fruits and vegetables by gamma irradiation. *Int. J. Food Microbiol.* 57, 91-97.

**Bidawid, S., Farber, J.M., Sattar, S.A. & Hayward, S. 2000b.** Heat inactivation of hepatitis A virus in dairy foods. *J. Food Prot.* 63 (4), 522-528.

**Bidawid, S., Farber, J.M. & Sattar, S.A. 2001.** Survival of hepatitis A virus on modified atmosphere-packaged (MAP) lettuce. *Food Microbiol* 18, 95-102.

**Calci, K.R., Meade, G.K., Tezloff, R.C. & Kingsley, D.H. 2005.** High-pressure inactivation of hepatitis A virus within oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (1), 339-343.

**Croci, L., De Medici, D., Gabrieli, R., Franco, E., Di Pasquale, S. & Toti, L. 1992.** Effectiveness of water disinfection treatment on depuration of shellfish. *Microbiologie Aliments Nutrition* 10, 229-232.

**Croci, L., Ciccozzi, M., De Medici, D., Di Pasquale, S., Fiore, A., Mele, A. & Toti, L. 1999.** Inactivation of hepatitis A virus in heat-treated mussels. *J. Appl. Microbiol.* 87 (6), 884-888.

**Cunliffe, H., Blackwell, J. & Walker, J. 1978.** A research note. persistence of foot-and-mouth disease virus in dried casein. *J. Food Prot.* 41, 706-707.

**Deboosere, N., Legeay, O., Caudrelier, Y. & Lange, M. 2004.** Modelling effect of physical and chemical parameters on heat inactivation kinetics of hepatitis A virus in a fruit model system. *Int. J. Food Microbiol.* 93 (1), 73-85.

**Dowell, S.F., Groves, C., Kirkland, K.B., Cicirello, H.G., Ando, T., Jin, Q., Gentsch, J.R., Monroe, S.S., Humphrey, C.D. & Slemp, C. 1995.** A multistate outbreak of oyster-associated gastroenteritis: implications for interstate tracing of contaminated shellfish. *J Infect Dis.* 171 (6), 1497-1503.

**Dubois, E., Hennechart, C., Deboosere, N., Merle, G., Legeay, O., Burger, C., Le Calve, M., Lombard, B., Ferre, V. & Traore, O. 2006.** Intra-laboratory validation of a concentration method adapted for the enumeration of infectious F-specific RNA coliphage, enterovirus, and hepatitis A virus from inoculated leaves of salad vegetables. *Int J Food Microbiol* 108 (2), 164-171.

**Duizer, E., Bijkerk, P., Rockx, B., De Groot, A., Twisk, F. & Koopmans, M. 2004.** Inactivation of Caliciviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (8), 4538-4543.

**Gulati, B.R., Allwood, P.B., Hedberg, C.W. & Goyal, S.M. 2001.** Efficacy of commonly used disinfectants for the inactivation of calicivirus on strawberry, lettuce, and food contact surface. *J. Food Prot.* 64, 1430-1434.

**Heidelbaugh, N.D. & Giron, D.J. 1969.** Effect of processing on recovery of polio virus from inoculated foods. *J. Food Sci.* 34, 239-241.

- Hejkal, T.W. & Gerba, C.P. 1981.** Uptake and survival of Enteric viruses in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* (1), 207-211.
- Herrmann, J.E. & Cliver, D.O. 1973.** Enterovirus persistence in sausage and ground beef. *J. Milk Food Technol.* 36 (8), 426-428.
- Kantor, M. & Potter, N. 1975.** Persistence of ECHOvirus and poliovirus in fermented sausages. Effects of sodium nitrite and processing variables. *J. Food Sci.* 40, 968-972.
- Khadre, M.A. & Yousef, A.E. 2002.** Susceptibility of human rotavirus to ozone, high pressure, and pulsed electric field. *J. Food Prot.* 65, 1441-1446.
- Linco, S.J. & Grohmann, G.S. 1980.** The Darwin outbreak of oyster-associated viral gastroenteritis. *Med. J. Aust.* 81 (5), 211-213.
- Lukasik, J., Bradley, M.L., Scott, T.M., Dea, M., Koo, A., Hsu, W.Y., Bartz, J.A. & Farrah, S.R. 2003.** Reduction of poliovirus 1, bacteriophages, *Salmonella montevideo*, and *Escherichia coli* O157:H7 on strawberries by physical and disinfectant washes. *J. Food Prot.* 66 (2), 188-193.
- Mallet, J.C., Beghian, L.E., Metcalf, T.G. & Taylor, J.A. 1991.** Potentiation of irradiation technology for improved shellfish sanitation. *J. Food safety* 11, 231-244.
- Mariam, T.W. & Cliver, D.O. 2000.** Hepatitis A virus control in strawberry products. *Dairy Food Environ. Sanit.* 20 (8), 612-616.
- Meng, Z.D., Birch, C., Heath, R. & Gust, I. 1987.** Physicochemical stability and inactivation of human and simian rotaviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 727-730.
- Millard, J., Appleton, H. & Parry, J.V. 1987.** Studies on heat inactivation of hepatitis A virus with special reference to shellfish. *Epidemiol. Infect.* 98 (3), 397-414.
- Oliveira, A.C., Ishimaru, D., Goncalves, R.B., Smith, T.J., Mason, P., Sa-Carvalho, D. & Silva, J.L. 1999.** Low temperature and pressure stability of picornaviruses : implications for virus uncoating. *Biophys. J.* 76, 1270-1279.
- Pirtle, E.C., Proescholdt, T.A. & Beran, G.W. 1997.** Trial of heat inactivation of selected viruses following irradiation. *J. Food Prot.* 60, 426-424.
- Pontes, L., Fornells, A., Giongo, V., Araujo, J.R. & Sepulveda, A. 1997.** Pressure inactivation of animal viruses : potential biotechnological applications. *High pressure research in the bioscience and biotechnology*. K. Heremans. Leuven, B, Leuven University Press, 91-94.
- Roberts, P. & Hopes, A. 2003.** Virus inactivation by intensity broad spectrum pulsed light. *J. Virol. Met.* 110, 61-65.
- Slomka, M.J. & Appleton, H. 1998.** Feline calicivirus as a model system for heat inactivation studies of small round structured viruses in shellfish. *Epidemiol. Infect.* 121, 401-407.
- Strazynski, M., Kramer, J. & Becker, B. 2002.** Thermal inactivation of poliovirus type 1 in water, milk and yoghurt. *Int. J. Food Microbiol.* 74 (1/2), 73-78.
- Strok, N. & Potter, N. 1972.** Survival of poliovirus and ECHOvirus during simulated commercial egg pasteurization treatments. *J. Milk Food Technol.* 35, 247-251.
- Sullivan, R., Scarpino, P.V., Fassolitis, A.C., Larkin, E.P. & Peeler, J.T. 1973.** Gamma radiation inactivation of coxsackievirus B-2. *Appl. Microbiol.* 26 (1), 14-17.
- Triemer, B. & Weinhold, E. 1981.** Tenazität von Newcastle-Disease-Virus in Mayonnaise als Modell der Untersuchung eines sekundär (exogen) mit Virus kontaminierten Lebensmittels. *Arch. Lebensmittelhygiene* 32, 76-77.
- Wilkinson, N., Kurdziel, A.S., Langton, S., Needs, E. & Cook, N. 2001.** Resistance of poliovirus to inactivation by high hydrostatic pressures. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2, 95-98.



**Question 6 : Quel est l'impact des mesures prises aux différentes étapes de production et de distribution d'eau des réseaux publics sur la maîtrise du danger viral ?**



## Question 6 : Quel est l'impact des mesures prises aux différentes étapes de production et de distribution d'eau des réseaux publics sur la maîtrise du danger viral ?

Coordinateurs de la question : M. Hartemann, M. Montiel  
Membres du sous-groupe : M. Carré, M. Gantzer, M. Vilaginès

### Question 6

#### Résumé de la Question 6

Le rapport propose un rappel descriptif des différentes étapes de la production et de la distribution d'eau destinée à la consommation humaine. Un état de la situation française fait apparaître que pour la majorité des installations (90 %), des traitements peu sophistiqués sont utilisés ; cependant ces installations ne concernent qu'un peu plus de 52 % du volume distribué. Le niveau de contamination virale des ressources brutes est directement lié à leur vulnérabilité et aux activités présentes sur le bassin versant. Un cadre réglementaire présenté dans la Question 5 permet de maîtriser la qualité des ressources en eau brute.

Le rapport se concentre ensuite sur l'efficacité des différentes étapes des procédés de traitement : (1) les traitements de rétention et (2) les traitements biocides. Chaque étape de traitement contribue en partie à l'élimination des virus dans l'eau ; il en résulte qu'**une procédure multi-barrières constitue la meilleure façon d'éliminer les virus**. L'usage combiné d'un indicateur bactérien et d'un indicateur phagique semble être un outil intéressant pour évaluer l'efficacité d'une filière de traitement.

- (1) Les traitements de rétention consistent à adsorber les virus sur des supports. Différents facteurs jouent un rôle important dans l'efficacité des traitements : la présence d'oxyde métallique, le point isoélectrique des particules virales et la taille des colloïdes liés aux virus. Les traitements classiques de coagulation, floculation permettent de neutraliser les particules colloïdes négatives en les transformant en agrégats ou éléments floculants puis de les éliminer par filtration. Les virus, très bien adsorbés sur les matières en suspension (notamment les argiles), sont rapidement éliminés par ce traitement. L'ensemble de ces étapes de clarification ne dépasse pas un abattement de 2 log. La pré-ozonation permet d'améliorer les résultats de l'étape de clarification. Pour les étapes de filtration qui suivent, les paramètres qui jouent un rôle primordial sont : le type de pré-traitement subi par l'eau, la vitesse de filtration et la granulométrie des milieux. La filtration lente a une efficacité de l'ordre de 2 log. Les membranes de microfiltration ne retiennent que les particules de plus de 0,1 micromètre et sont donc inefficaces sur les virus. Les membranes d'ultrafiltration, de nanofiltration et l'osmose inverse sont efficaces mais l'intégrité des membranes et l'étanchéité des joints sont primordiales et doivent être contrôlées.
- (2) L'efficacité des traitements biocides dépend de la concentration du désinfectant et du temps de contact (constante CT). Elle ne peut être évaluée qu'à partir de critères d'infectiosité et les résultats obtenus en laboratoire ou en essais pilotes – variables selon les conditions expérimentales – doivent être transposés aux installations industrielles avec précaution. L'ozone inactive efficacement les virus. Un résiduel de 0,4 mg/L d'ozone après 4 minutes de contact permet un abattement de 2 à 4 log. Les chloramines n'ont pas d'effet virucide alors que le chlore et le dioxyde de chlore sont de bons virucides mais leur action varie en fonction du pH. La comparaison des efficacités de l'ozone et du chlore pour inactiver les virus est en faveur de l'ozone. Comme c'est l'inverse pour les bactéries, les traitements proposés associent souvent ozone et chlore. Enfin, les rayonnements ultraviolets ont une action virucide. Une dose d'irradiation de 600 J/m<sup>2</sup> permet un abattement minimum de 4 log (sauf pour l'adénovirus qui nécessite 1 000 J/m<sup>2</sup>).

En France, 78,5 % des unités de distribution sont conformes au regard de leur qualité microbiologique telle qu'elle est évaluée par le contrôle sanitaire ; la population exposée au moins une fois par an à des eaux non conformes sur le plan microbiologique (au sens du code de la santé publique) est estimée à environ 5,8 % soit 3 millions de personnes. Les zones où les unités de distribution sont petites, morcelées (notamment en montagne) sont celles où les non-conformités microbiologiques sont les plus nombreuses. En France, l'impact sanitaire global lié à la qualité microbiologique de l'eau est actuellement mal évalué, en raison de la mauvaise connaissance du niveau de contamination des eaux par les virus et de l'absence d'investigation systématique des épidémies d'origine hydrique. L'amélioration de la situation repose sur la mise en place d'une meilleure connaissance épidémiologique, mais aussi sur une surveillance de la qualité de l'eau, et surtout sur des mesures portant sur la qualité de la ressource, sur le traitement, sur les réseaux de distribution d'eau et la mise en place d'une démarche globale d'évaluation et de gestion du risque de la ressource au robinet du consommateur.

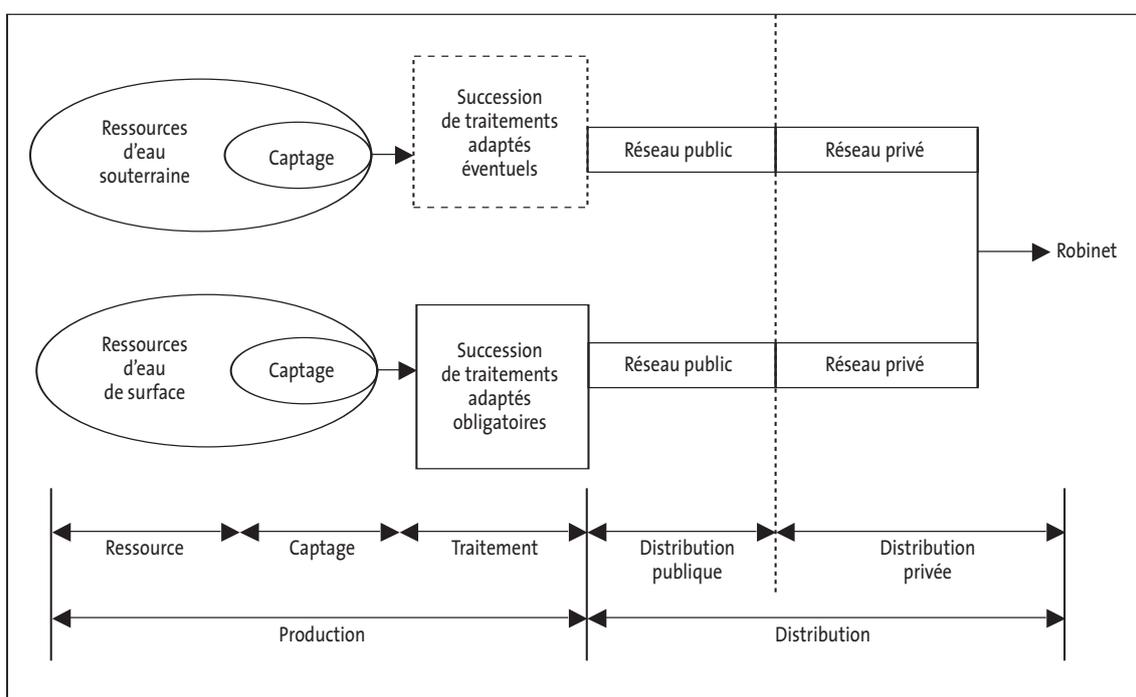
## A. Descriptif de l'état de la situation française

L'alimentation en eau par réseaux de distribution procède de plusieurs étapes (Figure 8) :

- la production qui comprend :
  - le captage de l'eau « brute » dans les milieux naturels que constituent les nappes souterraines et les ressources superficielles ;
  - en général un traitement de désinfection et éventuellement une succession de traitements visant à rendre l'eau « potable ». Le traitement doit être adapté aux caractéristiques de l'eau « brute » et notamment à ses évolutions possibles dans le temps. Il est obligatoire pour les eaux d'origine superficielle ;
- la distribution par des réseaux publics puis par des canalisations intérieures aux bâtiments pour arriver au robinet du consommateur.

### Question 6

Figure 8 : description des étapes de production et distribution de l'eau



### A.1 Descriptif des types de ressources et des niveaux de traitement de l'eau en France

(DGS 2005)

En France, l'alimentation en eau est assurée à partir de 29 300 captages dont 27 900 captages en eau souterraine (soit plus de 95 %) et 1 400 en eau superficielle. Toutefois, en quantité, les eaux souterraines ne représentent environ que 66 % de la production. Le nombre de captages est variable d'un département à l'autre (de quelques captages à 1 500). La production d'eau en France représente environ 6 milliards de m<sup>3</sup>/an d'eau dont 4 milliards en eau souterraine et 2 milliards en eau superficielle.

S'agissant des unités de distribution d'eau <sup>(38)</sup> (UDI) on recense 29 101 UDI dont 26 900 environ desservent de l'eau à des communes de moins de 500 habitants et 2 200 plus de 5 000 habitants. Ces 2 200 UDI représentent près de 70 % de la population. L'ensemble du système est géré directement par des communes ou des syndicats de communes qui peuvent transférer cette gestion à des sociétés privées (74 % en affermage et 24 % en régie directe).

(38) Une unité de distribution correspond à un réseau géré et exploité par une même structure et délivrant une eau de même qualité.

Le descriptif des traitements dans la base de données SISE-Eaux est fondé sur le classement de la directive européenne n° 75/440/CEE du 16 juin 1975 :

- Catégorie A1 : traitement physique (filtration) simple et désinfection ;
- Catégorie A2 : traitement normal physique, chimique et désinfection ;
- Catégorie A3 : traitement physique, chimique poussé, affinage et désinfection.

N caractérise la catégorie ne comportant pas de désinfection.

Les unités de traitement font plus généralement appel à des systèmes de traitement peu sophistiqués : ainsi les traitements les plus simples (A1, N) concernent près de 90 % des stations mais n'intéressent que 52,3 % des débits produits et dans ce cas il s'agit de captages d'eau souterraine.

5,5 % des installations (831) sont dépourvues de système de désinfection. L'absence de désinfection concerne cependant moins de 1 % des débits produits par des installations de traitement.

**Tableau 36 : nombre et débit des stations de traitement selon le type de traitement - situation en 2004**

Classe de débit des installations	Type de traitement*							
	A1		A2		A3		N	
	Nombre d'installations	Débit (Mm <sup>3</sup> /j)						
< 100	6 105	0,26	213	0,01	51	0,002	680	0,03
100 – 1 999	5 967	3,04	571	0,40	150	0,13	143	0,05
2 000 – 9 999	636	2,55	221	0,91	147	0,65	6	0,04
10 000 – 49 999	95	1,77	68	1,31	52	1,00	2	0,03
50 000 – 99 999	6	0,49	2	0,13	12	0,83	0	0
≥ 100 000	1	0,16	1	0,19	11	2,01	0	0
Total	12 810	8,27	1 076	2,94	423	4,63	831	0,14

Source : Ministère chargé de la santé – DDASS – SISE-Eaux (DGS 2005)

\* pour 107 installations d'un débit de 106 000 m<sup>3</sup>/j, cette information n'est pas disponible.

Les traitements appliqués aux eaux souterraines sont généralement simples. Les traitements plus complexes intéressent les eaux superficielles compte tenu de leur qualité plus ou moins dégradée.

**Tableau 37 : nombre et débit des stations de traitement selon le type de traitement et l'origine de l'eau traitée - Situation en 2004**

Origine de l'eau	Type de traitement*							
	A1		A2		A3		N	
	Nombre d'installations	Débit (Mm <sup>3</sup> /j)						
Eau Souterraine	11 528	7,16	526	0,82	148	1	788	0,12
Eau de surface	409	0,39	447	1,93	215	3,08	6	0,001
Autre	873	0,72	103	0,19	60	0,55	37	0,02
Total	12 810	8,27	1 076	2,94	423	4,63	831	0,14

Source : Ministère chargé de la santé – DDASS – SISE-Eaux ; (DGS 2005)

\* pour 107 installations d'un débit de 106 000 m<sup>3</sup>/j, cette information n'est pas disponible.

## A.2 Vulnérabilité des ressources en eau

Le niveau de contamination possible des eaux « brutes » en virus va notamment dépendre du type de ressource utilisée et de son niveau de protection.

La qualité des eaux de surface est largement influencée par les activités menées dans le bassin versant notamment par les rejets urbains qui sont la principale source de virus humains, ou agricoles qui peuvent apporter de nombreux virus animaux et/ou humains. La notion de vulnérabilité des ressources en eau est traitée plus en détail dans la question 4 : « Quels sont les risques sanitaires liés aux sources et réservoirs environnementaux de ces virus ? ».

Ainsi la qualité de la ressource en eau sur le plan virologique est largement fonction de sa protection par rapport aux sources de pollution et de la persistance des virus dans ces conditions environnementales puisque, bien évidemment, les virus pathogènes pour l'homme ne peuvent pas se multiplier dans le milieu hydrique. La proximité d'un rejet de station d'épuration ou des apports agricoles plus ou moins diffus sont, avec le débit du cours d'eau, les paramètres clés de l'importance de la contamination virale d'une eau superficielle. La situation est plus complexe dans le cas des eaux souterraines. En terrain karstique ou fissuré les pluies lessivent les sols et entraînent rapidement une contamination virale de la ressource en général corrélée avec l'augmentation de la turbidité de l'eau (Nebbache *et al.* 2001). Dans les autres cas la nappe est protégée et l'apport viral est fonction de l'épaisseur et de la nature de la zone non saturée. Sauf existence de chemins préférentiels, les particules virales sont retenues dans les premiers décimètres du sol, en raison d'interactions physico-chimiques (qui seront envisagées plus loin) et biologiques. Selon l'aptitude du virus à survivre dans cet environnement hostile et l'épaisseur de la couverture de la nappe, l'apport viral sera minime (nappe superficielle) ou nul (nappe profonde).

Peu de données sont disponibles dans la littérature qui renseignent sur les niveaux de contamination par les virus des milieux hydriques en France. Une revue de la littérature scientifique sur le sujet est présentée dans la question 4.

## A.3 Cadre réglementaire : protection des ressources et des captages

Parmi les outils destinés à assurer la qualité de l'eau distribuée figurent les périmètres de protection des captages.

Le code de la santé publique (Article L.1321-2) définit trois périmètres de protection :

- un périmètre de protection immédiate ;
- un périmètre de protection rapprochée ;
- le cas échéant, un périmètre de protection éloignée.

Sur un total de 35 559 captages, 16 950 (soit 49,4 % des captages qui représentent 56,9 % des débits) bénéficient actuellement d'une protection avec déclaration d'utilité publique (DUP)<sup>(39)</sup> (DGS, 2004).

La protection des ouvrages de captage passe par la mise en œuvre de 1 à 3 périmètres. Un périmètre unique (périmètre de protection immédiate) peut être suffisant pour les ouvrages captant une ressource naturellement protégée. Cela ne s'applique qu'aux eaux souterraines et il s'agit en l'occurrence de nappes captives pour lesquelles la pression s'oppose à la pénétration de contaminants, en particulier biologiques.

En général deux périmètres sont institués : le périmètre de protection immédiate et le périmètre de protection rapprochée. Le périmètre de protection immédiate est destiné à protéger le point de captage de la malveillance et des pollutions qui pourraient parvenir directement sur l'ouvrage par ruissellement par exemple. En eau souterraine, lors de la mise en place des périmètres, un diagnostic doit être porté sur l'état du captage (état du cuvelage pour les puits, cimentation à la périphérie du cuvelage ou de la tête de forage, présence ou non d'une dalle de propreté...). Si le vide qui existe entre le cuvelage ou le tubage et le terrain est correctement obturé et si le cuvelage ou le tubage ne sont pas eux-mêmes endommagés (dans le cas des puits il faut aussi que les ventilations soient en état afin de ne pas permettre l'entrée de petits animaux qui finissent au fond de l'ouvrage), l'eau captée en milieux poreux dans des aquifères recouverts d'un sol (ce qui exclut les terrains karstiques sensibles à toutes les contaminations) ne présentera pas de contamination microbiologique. Le périmètre de protection rapprochée qui permet d'éloigner du point de captage les activités polluantes (le stockage de déjections animales par exemple ou l'obligation du stockage sur aire étanche) peut aussi contribuer à limiter le risque de contamination.

(39) La protection administrative du captage n'est réellement acquise que lorsque l'arrêté préfectoral de déclaration d'utilité publique (DUP) est annexé au plan local d'urbanisme et que les servitudes qu'il instaure ont fait l'objet d'une inscription aux hypothèques. Il est à noter que la protection du captage n'est réellement acquise que lorsque les travaux et modifications d'activités dans les périmètres sont réellement mis en œuvre.

Les eaux souterraines karstiques sont affectées de crues de turbidité et les eaux de ruissellement qui s'infiltrent par les fractures et drains ouverts dans le calcaire entraînent parasites, bactéries et virus. Dans ce cas de figure les périmètres sont inopérants. C'est aussi le cas pour les prises d'eau de surface. Les périmètres ne sont définis que vis-à-vis de pollutions accidentelles et ponctuelles et reposent sur une stratégie permettant de protéger l'outil de production (station de potabilisation) en cas de pollution. Au-delà de la protection statique constituée par des périmètres (peu étendus au regard de l'étendue des bassins versants) établis sur un tronçon de berge, la protection des prises d'eau de surface passe par l'interruption du pompage et en conséquence la sollicitation d'interconnexions, de bassins de stockage, de ressource de substitution.

#### A.4 Fréquence et origine des non-conformités

Le ministère chargé de la santé a réalisé un bilan qualitatif et quantitatif sur les eaux destinées à la consommation humaine en France (DGS 2005). Les données présentées ci-après sont extraites de ce document dans lequel des informations complémentaires sont disponibles.

##### A.4.1 Non-conformités microbiologiques de l'eau distribuée

*Source : Ministère chargé de la santé - DDASS, DRASS - SISE-Eaux*

Des contrôles de qualité microbiologiques effectués en 2002 sur près de 25 000 unités de distribution alimentant 58 millions d'habitants, il ressort :

- en moyenne, 97,2 % des analyses et 93,9 % des prélèvements confirment l'absence de contamination microbienne ;
- le taux de conformité des UDI est de 78,5 % ;
- la population ayant potentiellement été exposée à des eaux au moins une fois non conformes est estimée à plus de 3 millions, soit 5,8 % de la population dont l'eau a été contrôlée.

*Remarque : la présence d'un seul germe témoin de contamination suffit à déclasser le prélèvement non conforme. Cependant, afin de tenir compte des aléas liés à l'échantillonnage et au contexte de la production d'eau, la conformité des eaux distribuées se fonde, dans le cadre du présent bilan, sur le respect, par les germes indicateurs, des limites de qualité microbiologiques pour 95 % des prélèvements réalisés annuellement.*

##### A.4.1.1 Influence de la taille des systèmes de distribution

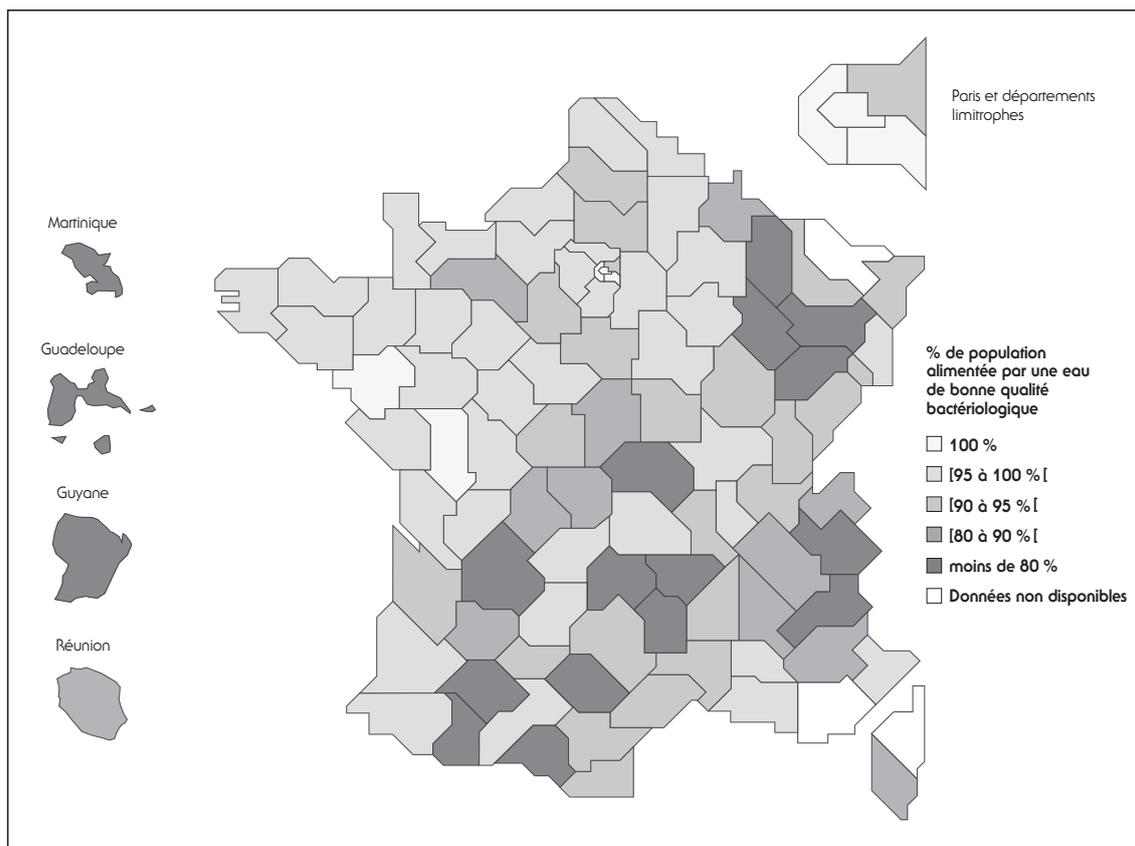
L'examen de la répartition des résultats montre un effet « taille des unités de distribution », la qualité s'améliorant lorsque la population desservie par les UDI augmente :

- 90 % des mesures sont conformes pour les UDI de moins de 500 habitants alors que pour les distributions les plus importantes (> 50 000 habitants), 99,8 % des résultats sont corrects ;
- de même, la proportion d'UDI conformes augmente avec la taille de l'UDI : le taux de conformité est de 96,3 % pour les UDI de plus de 10 000 habitants, et de 71,6 % pour les distributions de moins de 500 abonnés.

##### A.4.1.2 Répartition géographique

Les zones où les non-conformités microbiologiques sont plus fréquentes sont également celles où les structures de distribution sont les plus nombreuses et morcelées : en particulier dans les zones de montagne.

Figure 9 : qualité microbiologique des eaux distribuées par département - année 2002



Source : ministère chargé de la santé – DDASS – SISE-Eaux

#### A.4.2 Niveau de contamination par les virus

(Cf. Question 4)

Il n'y a pas à notre connaissance d'études donnant une cartographie de la contamination des eaux superficielles par les virus comme cela est disponible pour certains paramètres chimiques. Tout au plus dispose-t-on de quelques données fragmentaires au niveau de prises d'eau d'usine de grande capacité.

#### A.4.3 Dysfonctionnements majeurs entraînant une contamination microbiologique de l'eau

##### A.4.3.1 Épidémies eau/virus

Quatre épidémies recensées parmi les 9 d'origine hydrique (prouvée ou probable) et investiguées par l'Institut de Veille Sanitaire entre 2000 et 2006, impliquent des virus présents dans l'eau de distribution :

- lors des 2 épidémies (Gourdon, août 2000 et Isère, décembre 2002) les Rotavirus et Calicivirus ont respectivement été identifiés comme principaux pathogènes en cause, l'origine hydrique est prouvée (I sur l'échelle proposée par Blackburn *et al.* (2004)). Des dysfonctionnements importants dans la chaîne de production de la distribution d'eau ont été constatés ;
- lors de deux épidémies (Pont de Roide (25) en février 2004 et Arc 1800 (73) en février 2006) les Norovirus ont été identifiés comme principaux pathogènes en cause, l'origine hydrique est probable (III sur l'échelle proposée par Blackburn *et al.* (2004)). Pour l'épidémie de 2004, un retour d'eaux de la STEP dans le réseau de distribution est incriminé ; Pour l'épidémie de 2006, un épandage de fosse septique ou de neige artificielle contaminée et un défaut de chloration sont incriminés.

En dehors de ces phénomènes épidémiques assez bien identifiés, mais dont l'étiologie reste le plus souvent inconnue, car l'investigation et la recherche de virus ne sont pas faciles, il existe certainement une endémie de gastroentérites virales liées à une eau de distribution publique occasionnellement contaminée. Ceci a été démontré lors de l'étude cas-témoin de (Soule *et al.* 1999) à partir des enfants hospitalisés pour gastroentérite hivernale au CHU de Grenoble. Le risque de gastroentérite aiguë à rotavirus était significativement plus élevé pour les enfants habitant dans un foyer desservi par une eau de moyenne, médiocre ou mauvaise qualité bactériologique, qu'ils boivent ou non cette eau (o.r. = 2,7 ;  $p < 0,02$ ) (Soule *et al.* 1999).

#### A.4.3.2 Point sur les systèmes de surveillance actuels ou en cours de mise en œuvre

(communication personnelle P. Beaudou - InVS)

L'impact sanitaire global lié à la qualité microbiologique de l'eau n'est pas actuellement évaluable :

- il n'y a pas de système opérationnel dédié au repérage des cas sporadiques ;
- le repérage des épidémies et leur signalement sont médiocres et le taux d'exhaustivité du signalement est en conséquence très faible et inconnu.

Différents projets relatifs au risque infectieux lié à la consommation de l'eau distribuée, sont actuellement en cours afin de pouvoir améliorer le recensement et la gestion des risques endémique et épidémique d'origine hydrique en France. Ces projets sont conduits par l'Institut de veille sanitaire (InVS) et les Cellules Inter régionales d'épidémiologique (CIRE), il s'agit notamment des projets suivants :

- étude écologique temporelle multicentrique « Gastroentérites et turbidité de l'eau distribuée ». Ce projet vise à estimer le risque endémique de gastroentérites (GE) attribuable à l'eau distribuée en France en recourant à des indicateurs d'exposition tirés des données d'exploitation : turbidité, désinfectant résiduel... (InVS 2006). Il est à noter que cette étude ne comporte pas de volet microbiologique et que les étiologies (notamment virales) sont donc inconnues ;
- amélioration des investigations d'épidémies et d'accidents :
  - améliorer le repérage et la notification des épisodes épidémiques et des pollutions accidentelles des réseaux de distribution d'eau,
  - améliorer l'investigation épidémiologique et environnementale,
  - améliorer la connaissance des micro-organismes responsables de gastroentérites aiguës (GEA) dans le contexte français.

## B. Efficacité des procédés de traitement

Quel que soit le procédé de traitement étudié, la revue de la littérature montre des résultats d'efficacité (exprimés en log décimal d'abattement) très différents selon les publications. Ces différences s'expliquent par le fait que les essais peuvent avoir été réalisés sur une contamination virale artificielle, plutôt que sur des virus indigènes. L'expérience montre que les essais sur virus ajoutés conduisent à des résultats d'efficacité très largement meilleurs que ceux retrouvés sur virus indigènes. D'autre part, certaines publications récentes utilisent les techniques de biologie moléculaire pour quantifier les acides nucléiques viraux, ce qui n'est bien sûr pas comparable avec les techniques de comptage des virus par culture cellulaire qui nécessitent d'avoir un virus cytopathogène pour la révélation de son effet.

Il convient donc d'être très prudent dans le choix de l'abattement retenu pour qualifier une filière ou une étape de filière. En toute rigueur, il est à noter que l'efficacité des traitements biocides ne peut être évaluée qu'à partir des critères d'infectiosité.

Foliguet signale que les essais de laboratoire conduisent très souvent à de très bons résultats (Foliguet & Doncoeur 1975) mais que, dans la réalité il est possible de retrouver des virus dans les eaux clarifiées (Foliguet 1983). Joret *et al.* (1986) évaluaient la surestimation de l'élimination à 1 ou 2 log. Deux explications sont avancées pour expliquer les difficultés de passage du laboratoire ou du pilote à des installations industrielles.

- L'utilisation de souches cultivées et non représentatives de l'état réel des virus dans le milieu naturel est une des explications le plus souvent avancées (Chang *et al.* 1958, Robeck *et al.* 1962, Foliguet & Doncoeur 1975, Guy & Mc Iver 1977). Cela peut expliquer la très grande diversité des résultats publiés liés à la qualité des eaux et au mode d'utilisation des souches virales (Gilcreas & Kelly 1955, Berg *et al.* 1968, Guy & Mc Iver 1977, Dryden *et al.* 1979, Miyata 1983, Cavani *et al.* 1991, You *et al.* 2001a, You *et al.* 2001b).
- Les virus utilisés en laboratoire sont sous forme d'agrégats et donc plus facilement éliminés (Sharp 1966, Bitton & Mitchell 1974, Liew & Gerba 1980, Grant 1994). Pour y remédier, il a été proposé de casser au préalable ces agrégats par ultra-sons (Postlethwaite & Maitland 1960, Smith 1963, Galasso *et al.* 1964, Gantzer *et al.* 1994).

## Question 6

Par ailleurs, il est important de ne pas admettre une rigidité constante de la structure des virus, mais d'intégrer la mouvance relative de leur capsidie qui a été démontrée (Poliovirus type 1) par plusieurs pH isoélectriques et des variations des charges électrostatiques et hydrophobes. Il faut donc souligner que le comportement des virus est fonction de leur famille, genre, espèce, sérotype, et des composantes de la matrice dans laquelle ils évoluent (Mandel 1973, Vilagines *et al.* 1988).

Le choix des traitements est conditionné par les caractéristiques des eaux de la ressource utilisée. Différents types de traitements peuvent donc être employés qui font appel à deux types de phénomènes permettant soit l'enlèvement physique des virus, soit leur inactivation :

- soit des techniques de rétention ;
- soit des techniques de traitements biocides qui peuvent, dans certains cas, être précédées de traitement de rétention.

Chaque étape de traitement va contribuer plus ou moins à l'élimination des virus dans l'eau. Une approche multi-barrières constitue donc la meilleure façon d'éliminer les virus et les autres agents pathogènes circulant dans le milieu hydrique.

### B.1 Traitements de rétention

Lors de ces étapes de traitements de rétention, les phénomènes majeurs intervenant sont l'élimination physique et l'adsorption sur des supports. De manière générale, les paramètres influençant l'adsorption des virus sont les suivants :

- le point isoélectrique des particules virales joue un rôle important (Gerba *et al.* 1984) ;
- des études ont mis en évidence l'importance de la présence d'oxyde métallique sur l'inactivation des virus (Chu *et al.* 2001) notamment les oxydes de fer. Dans la zone insaturée, les virus sont inactivés à l'interface eau/air (Jin *et al.* 2000) ;
- la taille des colloïdes liés aux virus peut être un facteur primordial sur les migrations des virus (O'Melia *et al.* 1997). Les particules colloïdales ont des tailles de 1 nm à 1 µm. L'influence de leur taille joue un rôle essentiel sur les interactions particule/particule.

Il est à noter que l'utilisation de virus en culture pour les essais peut conduire à des résultats très divergents car les fortes concentrations de virus conduisent à des agrégats plus ou moins retenus lors de ces étapes.

#### B.1.1 Stockage de l'eau brute

##### B.1.1.1 Passage dans un bassin de stockage d'eau brute de 1 à 3 jours de temps de séjour

Très peu d'études portent sur l'élimination des virus lors du stockage des eaux, par contre, ces études ont été faites pour les eaux usées où l'on a comparé différentes étapes de traitement (Fleischer *et al.* 2000). Suivant les auteurs, la simple sédimentation conduit pour des virus ou les coliphages à des résultats de 0 % (Morris 1984, Rose *et al.* 1996) à 20 % (Irving & Smith 1981, Zaiss & Hennies 1988) d'élimination.

Pour le lagunage tertiaire, on a signalé deux log d'abattement sur les entérovirus (Morris 1984). Les systèmes de boues activées quant à eux, donnent des résultats qui varient suivant les auteurs : de 0 à 30 % (Morris 1984), de 28 à 93 % (Irving & Smith 1981), 73 % sur le bactériophage MS2 (Zaiss & Hennies 1988), et 98 % (Rose *et al.* 1996).

Compte tenu de la très grande diversité de ces résultats, et des grandes différences qui existent, de la quasi-absence d'étude fiable, le stockage de l'eau n'est pas considéré comme ayant une activité significative sur la contamination virale de l'eau.

##### B.1.1.2 Filtration sur berge

La filtration sur berge est une pratique qui conduit à la rétention des virus. Cette technique, très développée en Allemagne où les prélèvements d'eau de surface ne se font pas au fil de l'eau mais après filtration « naturelle », est utilisée aussi en France souvent dans un souci de réalimentation des captages en nappe alluviale. Il faut aussi rappeler que les nappes alluviales sont en général en liaison avec les cours d'eau, qui assurent une réalimentation naturelle. Dans ce cas l'eau fait aussi l'objet d'une filtration par la berge plus ou moins colmatée, mais cette filtration latérale n'est pas forcément comparable en efficacité vis-à-vis de l'élimination des virus avec la filtration verticale utilisée en réalimentation ou prétraitement de l'eau. De nombreux travaux ont été publiés sur les avantages de la filtration sur berge pour l'épuration des eaux au niveau des micro-organismes et des matières organiques (Sontheimer 1991, Schubert *et al.* 1992, Kuehn & Muller 2000, Irmscher & Teermann 2002). En France, les eaux captées dans les nappes alluviales sont concernées par ce type de traitement.

Le Tableau 38 renseigne sur les pourcentages d'analyses positives pour différents virus (Irmscher & Teermann 2002) après filtration sur berge. Les données présentées dans ce tableau sont des données de biologie moléculaire.

**Tableau 38 : taux de détection des virus dans les eaux brutes et les eaux filtrées**

	Eau brute	Eau filtrée sur berge
Astrovirus	Jamais détecté	Jamais détecté
Adénovirus	65 %	1 %
Entérovirus	32 %	2 %
Norovirus	8 %	Jamais détecté
Rotavirus	72 %	2 %

D'après Irmscher & Teermann 2002

Dans les terrains, les vitesses de filtration sont de l'ordre de 0,1 m/j soit 1  $\mu\text{m/s}$ , (par comparaison dans les filtres rapides, elles sont 1000 fois supérieures soit 100 m/j ou 1 mm/s) et l'efficacité de rétention est importante. Ainsi le traitement par le sol a notamment été utilisé pour l'épuration d'effluents secondaires (Yates & Gerba 1998). Il faut bien distinguer ce qui relève de l'infiltration à travers le sol constitué de matériaux fins voire très fins et de matière organique de la filtration dans la roche fut-elle meuble, ce qui peut expliquer des efficacités variables par ces types de traitement pour les sols reconstitués. Le pouvoir de coupure<sup>(40)</sup> n'est pas du même ordre. Les processus d'adsorption sont plus importants dans les sols que dans beaucoup de matériaux alluviaux sableux ou graveleux.

Des auteurs font état de rétentions de 93 % pour 1 m de sable très fin et de 76 % pour du sable fin. En passant d'un temps de filtration de 5 heures à 20 heures, la rétention passe de 70 % à 99 % pour le phage MS2 utilisé comme traceur. L'abattement obtenu est corrélé au temps de transfert de l'eau<sup>(41)</sup> (Gerba *et al.* 1991, Quanrud *et al.* 2003).

Les changements de charge électrique et les forces de liaison de rétention avec les particules du sol (Penrod *et al.* 1996, Ryan & Elimelech 1996) sont les facteurs principaux permettant la rétention des virus par le sol.

### B.1.1.3 Paramètres influençant l'efficacité

Hormis le point isoélectrique des particules virales, la présence d'oxyde métallique et la taille des colloïdes liés aux virus, les paramètres suivants peuvent avoir un impact sur la rétention ou l'inactivation des virus :

- la température est un facteur primordial à prendre en compte pour l'inactivation des virus (Hurst *et al.* 1980, Yates *et al.* 1985, Yates *et al.* 1987, Blanc & Nasser 1996) ;
- les micro-organismes du sol jouent un rôle essentiel sur la rétention des virus. Si l'on inhibe la biodégradation par ajout d'azide de sodium, les rendements d'épuration sont beaucoup plus faibles. Les rendements d'épuration sont directement liés à la formation d'une membrane biologique et de biofilms (Quanrud *et al.* 1996). Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer le rôle de l'activité biologique (Hurst 1988, Powelson & Gerba 1994a) du sol sur la rétention ou l'inactivation des virus :
  - les micro-organismes excrètent des polymères organiques qui bloquent les virus (Lipson & Stotsky 1985),
  - les micro-organismes utilisent les virus comme substrat.

Des comparaisons ont été faites sur la migration de trois particules : des virus de 15 à 20 nm, des bactéries de 500 nm et des kystes de protozoaires de 5 000 nm. Si l'on tient compte des différentes énergies mises en jeu : énergie de diffusion, de viscosité, de débit du liquide, on peut dire que dans les filtres rapides c'est l'énergie due au débit de l'eau qui domine et augmente donc avec la taille des particules. Dans le sol, ce sont plutôt les énergies de diffusion et la viscosité (température) qui régissent les migrations des colloïdes (force de Van der Waals<sup>(42)</sup>). Les colloïdes liés aux virus peuvent donc se lier aux argiles et matières humiques du sol (Stagg *et al.* 1977, Liew & Gerba 1980, Straub *et al.* 1992b, Gantzer *et al.* 1994). Des modèles ont été établis, cependant il reste de nombreuses incertitudes qui ont fait dire à de nombreux auteurs que les modèles publiés d'inactivation des virus n'étaient pas fiables et ne pouvaient être extrapolés à tous les cas (Yates 1995, Schijven & Hassanizadeh 2000).

(40) Pouvoir de rétention des particules.

(41) La même étude (Quanrud *et al.* 1996) a mis en évidence une remobilisation de MS2 par modification de la force ionique de l'eau (dilution par l'eau de ruissellement) (Gerba & Lance 1978).

(42) Une liaison de van der Waals est une interaction de faible intensité entre atomes, molécules, ou une molécule et un cristal.

## Question 6

- La filtration sur berge permet un abattement, corrélé au temps de transfert de l'eau, estimé en général à 3 log.
- Le point iso-électrique, la température, la présence d'oxydes métalliques, les micro-organismes du sol et la taille des colloïdes influencent l'abattement des virus, lors des filtrations par le sol, et on peut au minimum espérer une efficacité de 2 log.

Concernant les pré-traitements physiques, aucune publication ne signale un effet de ces étapes sur la rétention des virus ; aucune efficacité n'est donc attribuée à ce type de prétraitements.

### B.1.2 Traitement classique de coagulation, floculation, séparation, filtration

Cette étape permet de neutraliser les particules colloïdales négatives, de les transformer en agrégats ou en éléments floculants (ou « floccs ») puis de les éliminer. Les virus sont très bien adsorbés sur les matières en suspension (MES), notamment les argiles (Schiffenbauer & Stotsky 1982, Steven & Stotsky 1983, 1984), ce qui facilite leur élimination au cours de cette étape.

#### B.1.2.1 Effet des coagulants

L'adsorption des virus sur les particules de floc est un moyen rapide de retirer ces agents pathogènes (Gerba *et al.* 1984, Gupta & Chaudhuri 1995). La charge des particules virales joue un rôle très important (Gerba *et al.* 1984). Le pH isoélectrique est donc une donnée essentielle : pour MS2, le pH isoélectrique est de 3,9 (Gerba 1984), pour le Poliovirus de type I, le pH isoélectrique est de 4,5 et 7,8 (Mandel 1973, Gerba 1984). Avec des eaux à pH entre 7,5 et 8,1, le MS2 est fortement chargé négativement alors que pour le Poliovirus, les charges négatives sont plus faibles, ce qui pourra expliquer certaines différences de comportement. Ces différences sont probablement liées aux charges hydrophobes.

Des études en « jar-test »<sup>(43)</sup> avec des **coagulants minéraux** ont donné pour le virus de l'Hépatite A et le Poliovirus 88,4 % d'élimination et pour le bactériophage MS2 47 % d'élimination. La turbidité, quant à elle, n'est retenue qu'à 61 %.

Avec des **polyélectrolytes cationiques**, des taux d'abattement comparables proches de 98 % sont obtenus pour le virus de l'hépatite A, le poliovirus, le bactériophage MS2, et la turbidité (Nasser *et al.* 1995).

**Remarque** : Matsui *et al.* ont mis en évidence un effet d'inactivation des virus (Matsui *et al.* 2001) avec la coagulation par des sels d'aluminium, notamment lors de l'utilisation d'un pré-polymère d'aluminium (PACI). L'effet virucide augmente avec la dose de réactif. Les essais effectués avec le bactériophage (MS2) ont conduit à des abattements de 6 à 7,5 log. Le pH 6,8 conduit à 7,5 log, les résultats sont meilleurs qu'avec un pH de 7,5. Les auteurs attribuent 4 log d'abattement à l'inactivation par le coagulant, 0,5 log d'abattement à l'adsorption sur le floc et 3 log à la décantation filtration. Cependant, cette affirmation n'a pas été signalée par d'autres équipes de recherche.

#### B.1.2.2 Effets des différentes étapes de filtrations

Pour l'étape de **filtration** les paramètres qui jouent un rôle primordial sont : le type de pré-traitement subi par l'eau, la vitesse de filtration, la granulométrie des médias.

Pour la **filtration rapide**, il est signalé que la recirculation des eaux de lavage en tête de traitement n'est absolument pas recommandée si les eaux brutes peuvent contenir des virus.

Pour la **filtration sur sables recouverts d'oxydes métalliques**, des études ont mis en évidence un rôle de rétention des bactériophages MS2 fixés sur du sable recouvert d'oxyhydroxyde de fer (Murray & Laband 1979, Sobsey *et al.* 1980a, Blanc & Nasser 1996, Pieper *et al.* 1997, Ryan *et al.* 2002) ou de la magnétite (Atherton & Bell 1983a, b). L'hypothèse avancée est que la forte liaison virus-hydroxyde provoque l'inactivation du virus. C'est aussi une des hypothèses pour expliquer l'inactivation (adsorption irréversible) des virus par le sol.

(43) Essai en laboratoire de coagulation et de floculation d'eaux brutes.

### B.1.2.3 Les alternatives à cette étape de traitement

Si l'on ne s'intéresse maintenant qu'à la coagulation sur filtre ou la filtration directe sur terre de diatomée, l'US-EPA ne crédite ces 2 étapes que d'un abattement de 1 log (US EPA 1998).

Au final, l'abattement total lors de l'étape de clarification incluant la filtration ne dépasse pas 2 log (Joret *et al.* 1986, Gupta & Chaudhuri 1995, Rose *et al.* 1996), soit 3 à 5 log de moins que les résultats publiés auparavant (Foliguet & Doncoeur 1975, Dryden *et al.* 1979). Ces valeurs ont été retenues par l'US EPA (US EPA 1998).

- L'adsorption sur les particules de floc est un moyen rapide de retirer les virus (Gerba *et al.* 1984, Gupta & Chaudhuri 1995). Le pH isoélectrique est une donnée essentielle lors de l'étape de coagulation.
- Une inactivation des virus par des coagulants à base d'aluminium est rapportée par un groupe d'auteurs mais non signalée par d'autres équipes de recherche.
- Pour l'étape de filtration les paramètres qui jouent un rôle primordial sont : le type de pré-traitement subi par l'eau, la vitesse de filtration et la granulométrie des milieux.
- L'abattement total lors de l'étape de clarification incluant la filtration ne dépasse pas 2 log.

### B.1.2.4 Complément à l'étape de clarification : pré-ozonation

Le taux de traitement de 0,2 à 0,25 mg d'ozone par mg de COT est retenu. Lors de cette étape, l'absence de résiduel d'ozone, explique l'absence de formation de bromate mais aussi l'absence d'effet virucide. En effet, pour les poliovirus, rotavirus et parvovirus, le résiduel d'ozone joue un rôle important ; en deçà d'une dose seuil, aucune action désinfectante n'est constatée (Vandenbussche *et al.* 1994).

Par contre, la pré-ozonation permet d'améliorer les résultats de l'étape de clarification qui suit (Foliguet & Doncoeur 1975, Dryden *et al.* 1979). Aux États-Unis, où la pré-ozonation avec un résiduel d'ozone a été utilisée, les abattements obtenus sont équivalents (2,5 à 3 log) à ceux obtenus en post-ozonation classique avec le même résiduel (Ryder 2000).

La pré-ozonation permet d'améliorer les résultats de l'étape de clarification mais n'a pas d'effet virucide direct car l'ozone résiduel est absent.

### B.1.3 Filtration lente

La filtration lente est considérée comme une étape efficace pour la rétention des virus. L'US EPA lui attribue une élimination garantie de 2 log (US EPA 1998). La rétention des virus est très dépendante de la formation de la membrane biologique (Hurst 1988, Powelson & Gerba 1994a, Quanrud *et al.* 1996). C'est l'activité biologique qui régit l'abattement des virus (Hurst 1988, Powelson & Gerba 1994a).

La filtration lente a une efficacité de l'ordre de 2 log.

### B.1.4 Filtration sur membranes

Les filtrations membranaires font appel à différents types de membranes :

- les **membranes de microfiltration** ne retirent que des particules de taille  $\geq 0,1$  micron et ne sont donc pas adaptées à la rétention de tous les virus, sauf à utiliser des couplages : coagulation - microfiltration. Des études incluant prétraitement et membranes de microfiltration coagulation, à l'aide de prépolymères d'aluminium ont donné de très bons résultats supérieurs à 7 log (Matsui *et al.* 2003). Les virus sont retenus par le « cake d'hydroxyde »<sup>(44)</sup> en surface de la membrane (Jacangelo *et al.* 1995, Clesceri *et al.* 1998). D'autres auteurs ont attribué à la microfiltration des abattements de l'ordre de 2 log bien que la taille des pores soit 10 fois supérieure à celle des virus (Kolega *et al.* 1991, Coffey *et al.* 1993). L'explication la plus probable est que les virus étaient liés à des matières en suspension ou en agrégats ;
- l'**ultrafiltration** a donné de bons résultats puisqu'on a signalé jusqu'à 6 log d'abattement (Matsui *et al.* 2003).

Pour ces deux systèmes, le contrôle de l'intégrité des membranes est très important. Les moyens pouvant être utilisés sont soit le comptage de particules en continu, soit de façon séquentielle, l'injection d'air et la vérification de l'absence de bullage.

(44) Couche de surface d'hydroxyde.

## Question 6

Comme les moyens mis en œuvre ne peuvent détecter que des défauts supérieurs à 150 nm, les traitements membranaires ne peuvent être considérés comme des étapes de rétention fiables des virus, dans le temps, en conséquence elles doivent impérativement être complétées par une étape biocide.

- En ce qui concerne la **nanofiltration et l'osmose inverse**, en raison de la taille des pores, aucun micro-organisme ne devrait pouvoir les traverser (point de coupure de 1 nm pour des virus de taille 25 nm). Or, de nombreux auteurs ont signalé le passage de micro-organismes notamment de virus (Lozier 1994, Rose 1994, Adham 1996, Kamp 1996, Gagliardo *et al.* 1997, Colvin *et al.* 2000). Ceci s'explique sur la plan technologique par le fait que dans les systèmes de nanofiltration et d'osmose inverse, les membranes sont sous forme de feuilles enroulées avec des joints toriques « O-RING » (Gagliardo *et al.* 1997, Adham *et al.* 1998a, Adham *et al.* 1998b). Ainsi, une très faible partie de l'eau brute peut passer au niveau de ces joints et avec elle les virus (Jacangelo *et al.* 1995, Adham *et al.* 1998b).

Le contrôle de l'intégrité des membranes et de l'étanchéité des joints est donc primordial pour leur utilisation en rétention des virus. Comme pour la micro et l'ultra filtration ces étapes doivent être complétées par une étape de traitement biocide.

- Les membranes de microfiltration ne sont pas adaptées à la rétention des virus. Celles d'ultrafiltration ne sont efficaces que si l'on s'assure de l'intégrité des membranes (test en continu par comptage de particule ou test séquentiel de bullage).
- La nanofiltration et l'osmose inverse sont efficaces ; pour les membranes spiralées à joints toriques, il est impossible de s'assurer d'une étanchéité parfaite de ces joints.
- Ces traitements doivent être complétés par des étapes de traitement biocides.

### B.1.5 Traitements d'adsorption sur charbon actif

Le but des traitements d'affinage est essentiellement l'élimination des micropolluants organiques (Cookson 1967, Powell *et al.* 2000). Cependant, des études ont montré que le charbon actif pouvait adsorber les bactériophages (MS2), il a même été possible de calculer les paramètres des isothermes de Freundlich<sup>(45)</sup> (Powell *et al.* 2000).

L'US-EPA a signalé pour des filtrations à domicile sur des cartouches de charbon actif en grain (CAG) des éliminations de 3 à 4 log (US EPA 1989). Cependant, d'autres auteurs ont retrouvé des virus en sortie de filtre à CAG en usine (Rose *et al.* 1986). Le CAG ne doit donc être considéré que comme une étape complémentaire participant au dispositif des multi barrières.

Le charbon actif en grain (CAG) ne doit être considéré que comme une étape complémentaire participant au dispositif des multi barrières.

### B.2 Traitements biocides

L'efficacité d'un traitement chimique vis-à-vis de l'élimination des micro-organismes dépend principalement de la concentration [C] du désinfectant, et du temps [T] de contact. Pour un micro-organisme donné, le produit de ces deux valeurs est voisin d'une constante, exprimée en  $\text{mg.L}^{-1}.\text{min.} : [C] \times [T] = \text{constante}$ .

L'utilisation de virus en culture pour les essais permettant d'évaluer l'efficacité des traitements peut conduire à des résultats très divergents :

- les fortes concentrations de virus peuvent conduire à la formation d'agrégats, ce qui expliquerait leur résistance accrue aux oxydants (Floyd & Sharp 1978, Shaffer *et al.* 1980, Sharp & Leong 1980) ;
- de même, les conditions et la durée de stockage des cultures peuvent impacter sur le résultat obtenu. En général, plus longtemps les solutions sont conservées, plus elles sont résistantes aux traitements biocides. Plusieurs hypothèses ont été avancées :
  - par stockage à 4 ou 6° C, modification des protéines et perte des propriétés de se désagréger (Floyd & Sharp 1977, Grant 1994),
  - perte de la viabilité des virus les plus faibles et sélection de virus les plus résistants.

(45) Les isothermes de FREUNDLICH représentent la pente définissant la relation entre la quantité adsorbée sur un support par rapport à la concentration dans le liquide.

Il a pu être montré une variation d'un facteur 2 après 18 jours de stockage. Ce point est d'autant plus important que beaucoup d'auteurs ne précisent pas les conditions de stockage avant les essais. Les essais de (Wiedenmann *et al.* 1993) et (Oppenheimer *et al.* 1993) ont été effectués sans stockage des cultures, ce qui peut expliquer les très bons résultats obtenus. Il est donc indispensable de bien définir le protocole d'essais utilisé.

### B.2.1 Ozonation

Depuis très longtemps, l'ozone est connu pour son action virucide (Coin *et al.* 1964, Burlison *et al.* 1975, Berg *et al.* 1978, Block *et al.* 1981, Roy *et al.* 1981, Joret *et al.* 1982, Farooq & Akhlaque 1983, Vaughn *et al.* 1990, Finch & Fairbairn 1991, Powell *et al.* 2000). C'est le **résiduel d'ozone** après un temps de contact donné qui joue le rôle le plus important (Vandenbussche *et al.* 1994). Le mécanisme d'action est cependant mal connu (Evison 1981, Roy *et al.* 1981).

Comme pour l'action du **chlore** sur les bactéries, le principe de la constante CT a été adopté (Majumdar *et al.* 1973, Farooq & Chian 1976). Cependant, pour caractériser l'efficacité de l'**ozone** sur les virus (Jensen *et al.* 1980, Joret *et al.* 1982, Sharp 1982, Churn *et al.* 1984, Herbold *et al.* 1989, Helmer & Finch 1993, Kriemeyer 1994), la constante est du type  $C^xT^y$  où  $x$  et  $y$  sont différents de 1 (et  $x > y$ ). Ainsi, si la dose d'ozone change, les variations d'efficacité de la désinfection ne sont pas celles qui étaient prévisibles par la simple application de la règle du CT (Majumdar *et al.* 1973, Katzenelson *et al.* 1974, Dahl 1976, Katzenelson *et al.* 1979, Kim *et al.* 1980, Roy *et al.* 1981, Emerson *et al.* 1982, Churn *et al.* 1984, Harakeh & Butler 1985, Young & Sharp 1985, Finch & Fairbairn 1991). Il est généralement admis que la virucidie est obtenue pour 0,4 mg/L d'ozone pendant un temps de 4 minutes (abattement de 2 à 4 log).

L'interférence des colloïdes entourant les virus joue un rôle primordial. Ces colloïdes ont un rôle protecteur des virus vis-à-vis des agents extérieurs.

Beaucoup d'auteurs ont tout à fait ignoré cet effet (Moore *et al.* 1975, Sharp *et al.* 1975, 1976, Ryder 2000) et ont expliqué par exemple une perte d'efficacité du désinfectant liée à la présence de matières organiques, au titre trop élevé de virus utilisés lors des essais, ou encore à la modification de la force ionique ou à des effets protecteurs de la turbidité ou de l'agrégation (Sharp *et al.* 1976, Boardman & Sproul 1977, Stagg *et al.* 1977, Foster *et al.* 1980, Hejkal *et al.* 1981, Emerson *et al.* 1982, Payment *et al.* 1985a, Thurman & Gerba 1988, Sobsey 1989). La thèse de l'agrégation suppose que les virus libres soient beaucoup plus sensibles à de faibles doses d'oxydant que les virus agglomérés et que l'effet de désinfection soit uniquement dû à l'action oxydante de l'ozone sur les virus (Berg *et al.* 1967, Wei & Chang 1975, Sharp *et al.* 1976, Foster *et al.* 1980, Emerson *et al.* 1982, Churn *et al.* 1984, Thurman & Gerba 1988).

L'action de l'ozone est donc beaucoup plus complexe que ce qui pouvait être prévu (Jensen *et al.* 1980, Roy *et al.* 1982, Sharp 1982, Churn *et al.* 1984). C'est à partir de ces constatations que le rôle joué par les colloïdes sur la résistance des virus a été étudié de plus près. L'ozone altère les colloïdes associés aux virus : il est connu depuis longtemps que les virus testés s'adsorbent, ou sont adsorbés par les matières organiques (Moore *et al.* 1975, Sharp 1982, Ryder 2000). L'ozone réduit et élimine ces colloïdes (Galasso *et al.* 1962, Floyd & Sharp 1978, Hejkal *et al.* 1981, Emerson *et al.* 1982).

C'est la diffusion de l'ozone à travers la capsid du virus qui interfère sur le génome viral et non la réaction purement chimique sur le virus (Burlison *et al.* 1975, Roy *et al.* 1981). Des études similaires ont montré la même action sur les virus avec le chlore (Churn *et al.* 1984).

Des études comparées chlore/ozone ont montré que l'ozone était toujours plus efficace que le chlore d'au moins 1 log (Tyrrell *et al.* 1995). L'ozone est donc une bonne alternative au chlore pour l'élimination des virus (Hoff 1986, Hoff & Akin 1986, Vaughn *et al.* 1987, Finch & Fairbairn 1991). Par contre, vis-à-vis des bactéries, c'est le chlore qui est le plus efficace, c'est la raison pour laquelle des couplages ont été proposés : ozone puis chlore ou même ozone puis ultra-violet (Venosa *et al.* 1984). Actuellement, un résiduel de 0,4 ppm d'ozone après 4 min de contact réel qui permet d'obtenir des abattements de 2 à 4 log, représente les conditions classiques minimales de mise en œuvre du procédé.

- L'ozone est plus efficace que le chlore pour l'inactivation des virus.
- L'interférence des colloïdes entourant les virus joue un rôle primordial.
- Concernant l'impact de l'ozone, l'effet virucide augmente avec le couple CT (Concentration Temps) suivant une constante  $C^xT^y$ .
- Un résiduel de 0,4 ppm d'ozone après 4 min de contact réel permet d'obtenir des abattements de 2 à 4 log.
- Le bactériophage MS2 serait plus sensible à l'ozone que les classiques germes indicateurs de contamination fécale, mais de nombreuses publications vont dans le sens inverse pour les virus pathogènes pour l'homme.

### B.2.2 Chlore et dérivés chlorés (utilisés pour la désinfection finale) : chlore, bioxyde de chlore et chloramine

Les chloramines n'ont aucune action virucide ou très faible aux taux normalement utilisés pour le traitement des eaux (Havelaar & Nieuwstad 1985, Keswick *et al.* 1985, Sobsey 1989, Springthorpe *et al.* 2001). Pour les chloramines, l'US-EPA (1991) propose pour 2 log d'abattement à pH entre 8 et 9 des CT de respectivement : 768 à 3740 pour les poliovirus I et 3800 à 6475 pour les rotavirus.

Le chlore et le bioxyde de chlore sont considérés comme de bons virucides.

#### B.2.2.1 Mode d'action

Comme pour l'ozone, différents auteurs ont montré que c'était la diffusion du chlore à travers la capsidie qui contrôlait l'efficacité de la désinfection (Churn *et al.* 1984).

Deux phases sont observées lors de l'inactivation par le chlore, visibles par un changement de pente des courbes d'inactivation :

- une première pente élevée qui montre une meilleure résistance des virus. L'hypothèse qui paraît la plus probable est le fait que les matières organiques protègent les virus, vis-à-vis des oxydants (Hejkal *et al.* 1979, Hejkal *et al.* 1981, Sobsey *et al.* 1991, Narkis *et al.* 1995) ;
- une seconde partie de pente plus faible.

#### B.2.2.2 Paramètres influençant la désinfection

Les caractéristiques physico-chimiques de l'eau peuvent avoir un effet majeur sur la désinfection et l'élimination de tous les agents pathogènes dont les virus :

- impact de la **température** : en général, le taux d'élimination double ou triple pour une augmentation de 10°C en température. L'hiver, la désinfection est donc plus délicate (Springthorpe *et al.* 2001) ;
- le chlore tout particulièrement a aussi une action très **dépendante du pH**. Son pouvoir de désinfection diminue très fortement à pH alcalin. Le passage de pH 6 à 9 réduit l'efficacité du chlore d'un facteur d'au moins 3. Le bioxyde de chlore n'est pas affecté par les variations de pH ;
- avec le chlore, il a été montré qu'une **turbidité** de 10 NTU conduisait à un abattement 8 fois inférieur à ce que l'on aurait avec une turbidité < 0,5 NTU (Le Chevalier *et al.* 1981, Hoff 1986, Hoff & Akin 1986) ;
- la présence d'ammonium conduit à la formation de chloramines très peu virucides ;
- pour les chloramines, les CT sont environ 20 fois supérieurs à ceux nécessaires pour le chlore.

#### B.2.2.3 Évaluation de l'efficacité

Il est possible de prévoir l'effet de la désinfection en se basant sur la concentration en résiduel de désinfectant et en y associant d'autres paramètres : température, pH, temps de contact (AWWA 1999).

- Les chloramines n'ont pas d'effet virucide.
- Le chlore et le bioxyde de chlore sont de bons virucides.
- Des CT sont proposés, variables en fonction du pH et de la turbidité puisque les caractéristiques physico-chimiques de l'eau peuvent avoir un effet majeur sur la désinfection et l'élimination des virus.

### B.2.3 Comparaison chlore, bioxyde de chlore et chloramine

Le Tableau 39 donne pour le chlore, le bioxyde de chlore et l'ozone, les CT nécessaires pour obtenir un abattement de 2 log, tels qu'ils ont été déterminés au cours de différentes études. Pour les chloramines non citées dans ce tableau les teneurs nécessaires ne sont pas compatibles avec les résiduels acceptés pour l'eau potable, les CT sont environ 20 fois supérieurs à ceux du chlore.

**Tableau 39 : couples concentration-temps nécessaires pour l'obtention d'un abattement de 2 log à pH 6-7**

Virus	Cl <sub>2</sub> (pH 6-7)	ClO <sub>2</sub> (pH 6-7)	O <sub>3</sub> (pH 6-7)
Poliovirus	1,1-2,5	0,2-6,7	0,1-0,2
Rotavirus	0,01-0,05	0,2-2,1	0,006-0,06
	2,3*		
Bactériophage F2	0,08-0,18	-	-

Source : (Hoff & Akin 1986, US EPA 1991)

Remarque : le pH des eaux destinées à la consommation humaine peut varier dans une fourchette de 6,5 à 8,5.

\* Caballeros 2004

En ce qui concerne la température, pour 4 log d'abattement de virus de l'hépatite A à pH 6-9, les CT pour 5°C et 10°C sont donnés dans le Tableau 40. Ces valeurs uniques sont celles de la littérature scientifique retenues par l'US EPA comme valeurs minimales pour garantir ce niveau d'abattement.

**Tableau 40 : recommandation de l'US EPA concernant les couples concentration-temps nécessaires pour l'obtention d'un abattement de 4 log à pH 6-9 pour le VHA**

	Cl <sub>2</sub>	ClO <sub>2</sub>	O <sub>3</sub>
CT pour 5°C	8	34,4	1,2
CT pour 10°C	6	25,1	1,0

Source : (US EPA 1991)

Tous ces CT sont donnés comme minimaux, et il convient de souligner l'importance du contrôle hydraulique, notamment dans les bassins de chloration, afin de pouvoir assurer la désinfection pour l'ensemble de la masse d'eau sans cheminement préférentiel.

### B.2.4 Inactivation par les rayonnements UV

Avec la mise en évidence de l'action désinfectante des rayonnements ultraviolets vis-à-vis des *Cryptosporidium* (B1), ce mode de désinfection connaît aujourd'hui un regain d'intérêt (Chang *et al.* 1985, Arnold & Rainbow 1996, Meng & Gerba 1996, AWWA 1999, Clancy *et al.* 2000, US EPA 2000a, Cotton *et al.* 2001, Lee & Kim 2002).

L'efficacité d'inactivation par les ultraviolets dépend principalement de la dose d'ultraviolets, exprimée en J/m<sup>2</sup>, réellement reçue par l'ensemble de l'eau qui transite dans le réacteur.

Les doses pour obtenir un abattement de 3 log pour Échovirus I, Échovirus II, Coxsackievirus B<sub>3</sub> et B<sub>5</sub>, Poliovirus et Adénovirus type 2 sont respectivement de 250, 205, 245, 270, 230 et 1190 J/m<sup>2</sup> (Gerba *et al.* 2002a).

Les adénovirus humains sont considérés comme les virus les plus résistants aux rayonnements UV à 254 nm (Meng & Gerba 1996, Thurston-Enriquez *et al.* 2003).

Les doses d'irradiation nécessaires pour obtenir 4 log d'abattement varient de 220 à 2160 J/m<sup>2</sup> (US EPA 2003) :

- pour les rotavirus, les doses sont de 560 J/m<sup>2</sup> ;
- pour l'hépatite A, elles varient de 160 à 390 J/m<sup>2</sup>.

Des essais ont aussi été effectués avec des rayonnements plus puissants, notamment des électrons accélérés pour des doses de 116, 231, 463 GRAY, les abattements pour MS2 ont été respectivement de 3,96 ; 5,04 et 5,77 log (Slifko *et al.* 2001).

À noter que toutes les substances qui absorbent les rayonnements UV gênent la désinfection, notamment les Matières en suspension (MES) et les colloïdes.

Une dose d'irradiation de 600 J/m<sup>2</sup> permet un abattement minimum de 4 log (à l'exception des Adénovirus pour lesquels une dose de 1 000 J/m<sup>2</sup> est nécessaire).

À noter que la dose permettant un abattement de 4 log est supérieure à ce qui est actuellement préconisé par la circulaire DGS/PGE/1 D n° 52 du 19 janvier 1987 relative à la désinfection des eaux destinées à la consommation humaine par les rayons ultraviolets, qui préconise une dose d'irradiation de 250J/m<sup>2</sup>.

### B.3 Conclusion sur l'efficacité des procédés de traitement

## Question 6

Le Tableau 41 récapitule les abattements espérés pour les différentes étapes du traitement de l'eau. Il est très rare de connaître parfaitement la contamination virale initiale de l'eau brute et la démarche d'évaluation du risque pour le consommateur conduit à rechercher un niveau de contamination de l'eau distribuée très faible (de l'ordre d'une particule par mètre cube) non mesurable dans l'état actuel de la science. En conséquence il faut mettre en œuvre plusieurs étapes de traitement, dont les efficacités se cumulent : concept multibarrières.

**Tableau 41 : abattement des entérovirus lors des différentes étapes du traitement de l'eau**

Étapes	Abattement en log	Conditions sur la turbidité	Autres conditions nécessaires
Stockage d'eau brute	0		
Filtration sur berge	3	≤ 0,3 NFU	
Filtration lente	2		
Pré-traitement physique	0		
Pré-ozonation 0.25 mgO /mg COT	0		
Coagulation-floculation -décantation-filtration	2	≤ 0,3 NFU	
Pré-ozonation-Coagulation-floculation - décantation-filtration	2,5	≤ 0,3 NFU	
Adsorption CAG 2 <sup>e</sup> étage	1	/	
Ozonation 0.4 ppm après 4 min	4	≤ 0,3 NFU	
Chlore 0.5 ppm après 30 min	4	≤ 0,3 NFU	et pH ≤ 8
ClO <sub>2</sub> 0.25 ppm après 30 min	1	≤ 0,3 NFU	
NH <sub>2</sub> Cl	0	/	
UV 600 J/m <sup>2</sup> (Astrovirus 1 000 J/m <sup>2</sup> )	4	≤ 0,3 NFU	Absorbance UV < 95 %
MF 0,2 µm	2	≤ 0,3 NFU	
Coagulation + MF	7		
Ultrafiltration 100 000 Da	6		
Nanofiltration	2		prise en compte de 1 % de fuite au niveau des joints
Osmose inverse	2		prise en compte de 1 % de fuite au niveau des joints

Le contrôle de la turbidité permet de garantir les abattements précisés dans le Tableau 41. Il est à noter qu'il convient, pour ce paramètre, d'être plus sévère que le code de la santé publique qui préconise après l'étape de filtration une référence de qualité pour ce paramètre à 0,5 NFU<sup>(46)</sup>.

(46) La turbidité est souvent exprimée en NTU ou NFU. Le terme de NFU est apparu lorsque la méthode de détermination a changé et que la mesure n'a pas été faite avec de la lumière blanche polychromatique mais avec une lumière monochromatique à 860 nm. Souvent, il est utilisé encore NTU alors que la mesure est effectuée en lumière monochromatique, il serait bon lorsqu'on utilise le terme NTU (Nephelometric Turbidity Unit) de préciser la longueur d'onde de mesure. Normalement pour NFU, il n'y a pas de confusion possible : lumière à 860 nm (Nephelometric Formazine Unit).

Ce concept de multibarrière ne peut s'appliquer aux petites installations de traitement de l'eau, par manque de moyens financiers et humains. En conséquence, une attention toute particulière doit être portée au choix de la ressource et à sa protection.

La mise en œuvre sur le terrain des différents procédés de traitement s'accompagne systématiquement de périodes de défaillances. D'où l'importance d'identifier les points critiques et d'appliquer une démarche qualité adaptée (type HACCP). On peut citer par exemple la recirculation des premières eaux après une phase de lavage des filtres sur sable.

#### B.4 Les indicateurs d'efficacité de traitement

Devant les difficultés posées par la recherche systématique de l'ensemble des virus entériques pathogènes pour l'homme dans les eaux (cf. Question 3), il peut être fait appel à des indicateurs d'efficacité de la réduction du nombre de virus par les traitements de potabilisation de l'eau. L'utilisation des phages ARN F-spécifiques comme indicateurs d'efficacité de traitement a été très étudiée :

- La communauté scientifique a souvent comparé l'élimination des virus entériques à celle du bactériophage MS2, il s'avère que MS2 peut être un bon indicateur d'efficacité de rétention des virus testés notamment après coagulation, floculation, séparation, filtration (Havelaar *et al.* 1984, Rao *et al.* 1988, Nasser *et al.* 1995).
- Concernant la rétention sur charbon actif en grain l'abattement dépend fortement du type de virus et même de la souche utilisée (Havelaar *et al.* 1984, Rao *et al.* 1988, Anonymous 1991, Nasser *et al.* 1995). Comme le bactériophage MS2 est moins retenu par le charbon que les *Poliovirus*, *Echovirus* et *Coxsackievirus*, il donne donc une bonne sécurité comme indicateur de rétention des *entérovirus* (Powell *et al.* 2000).
- Le bactériophage MS2 a été proposé comme indicateur de résistance aux oxydants chlorés (Hajenian & Butler 1980, Harakeh & Butler 1984, Havelaar & Nieuwstad 1985, Havelaar 1987, Tyrrell *et al.* 1995). Le MS2 est plus résistant que le poliovirus au chlore combiné<sup>(47)</sup> (Havelaar & Nieuwstad 1985, Sobsey *et al.* 1988).
- Concernant l'étape de désinfection par les ultraviolets, MS2 peut être utilisé comme indicateur d'efficacité de traitement virucide. Il est considéré comme plus résistant que les virus pathogènes pour l'homme (Vaughn *et al.* 1990, Nieuwstad *et al.* 1991). Il faut pour 2 log d'abattement, 400 J/m<sup>2</sup>. À cette dose, on obtient un meilleur abattement pour *Cryptosporidium*, ce qui a renforcé l'utilisation de ce **phage MS2 comme indicateur de bonne désinfection** (Adams 1959, Havelaar *et al.* 1990, Wilson *et al.* 1992, Chen *et al.* 1993, Chesler & Jacangelo 1993, Mackey 2000b).

Abattement obtenu avec une irradiation pour les bactériophages MS2 de 1 000 J/m <sup>2</sup>	Source
4,6	(Havelaar <i>et al.</i> 1990)
2,3	(Wilson <i>et al.</i> 1992)
5,4	(Wiedenmann <i>et al.</i> 1993)
5,5	(Oppenheimer <i>et al.</i> 1993)

Des études ont, cependant, attiré l'attention sur les biais possibles dans les études d'inactivation faites à partir de culture de bactériophage MS2 (Jolis 2002). En effet, le temps de stockage de culture avant les essais ainsi que la température de stockage peuvent modifier de façon significative les résultats obtenus. Ces phénomènes peuvent expliquer des résultats publiés divergents (Qualls & Johnson 1983).

- Concernant la filtration sur berge, le bactériophage MS2 est considéré comme un bon indicateur représentatif de la rétention des virus pathogènes pour l'homme par filtration sur berge.
- Concernant la filtration membranaire : comme les bactériophages MS2 ont une taille et une forme tout à fait comparables à un certain nombre de virus pathogènes pour l'homme détectés dans le milieu hydrique (25 nm) (Colvin *et al.* 2000), certains auteurs ont utilisé des microbilles de polystyrène fluorescentes de 24 +/- 5 nm et la rhodamine WT de masse 496 dalton (Kitis *et al.* 2003) afin de contrôler l'efficacité de rétention. Les MS2, les billes de polystyrène et la rhodamine WT sont de bons moyens de contrôle du risque de passage de virus. Les billes de polystyrène étaient d'un coût très élevé : l'US EPA considère que MS2 et la rhodamine WT sont de bons indicateurs d'intégrité des membranes d'osmose inverse.

(47) L'utilisation du chlore combiné comme désinfectant n'est pas autorisée en France (traverse les membranes de dialyses).

## Question 6

Pour les traitements de rétention et les traitements biocides, MS2 est un bon indicateur d'efficacité de traitement. Cependant, le niveau d'abattement des MS2 ajoutés à l'eau à traiter est plus élevé de 2 à 3 log que le niveau d'abattement des MS2 présents naturellement dans l'eau brute.

*Remarque : le bactériophage MS2 est un bon indicateur d'efficacité de traitement qui est facile d'utilisation et fréquemment cité dans la littérature sur le sujet. Cependant le MS2 peut être titré sur deux types de bactéries comme les WG49 dont la résistance à ce bactériophage est extrêmement variable. Les résultats obtenus peuvent être très différents suivant les expérimentateurs.*

*Les résultats obtenus suite à des études menées sur des pilotes ont montré que le comportement varie considérablement suivant la composition de l'eau.*

**Conclusion :** la quantification des phages ARN F-spécifiques semble constituer un paramètre intéressant en tant qu'indicateur d'efficacité de traitement des eaux. Brion a proposé le suivi des MS2 comme indicateur d'efficacité de la réduction du nombre de virus humain ; il est suivi en ce sens par d'autres auteurs (Berg et al. 1978, Anonymous 1991).

### C. Conclusion

Bien que le risque d'infection virale liée à l'eau semble faible, l'absence de quantification de ce risque est en elle-même une limite importante dans le cadre d'une politique de santé publique. Les épidémies sont rares et n'ont touché en France que des populations limitées (à l'inverse de ce qui a pu être constaté dans des pays émergents, comme une épidémie d'hépatite virale A en Chine), parce qu'elles semblent liées à des dysfonctionnements majeurs (absence momentanée de traitement entraînant la distribution d'eau brute, introduction d'eaux usées dans le réseau, etc.). Le risque endémique est non quantifié, mais semble très en deçà de la proportion de 35 % des gastroentérites évoquée par Payment dans une grande ville canadienne où le traitement de l'eau se limitait surtout à une chloration dont on connaît les limites (Payment et al. 1991b).

Ainsi l'amélioration de la situation repose sur la mise en place d'une meilleure connaissance épidémiologique évoquée dans la partie A de cette question, mais aussi sur une surveillance de la qualité de l'eau, qui ne pourra cependant, en raison des limites actuelles de l'analyse virologique, assurer la sécurité des consommateurs, et surtout sur des mesures portant sur la qualité de la ressource, sur le traitement et la mise en place d'une démarche qualité.

#### C.1 Surveillance de la qualité de l'eau au point d'usage

Les nouvelles dispositions réglementaires introduites dans le code de la santé publique et relatives au contrôle et à la surveillance de la qualité des eaux ont conduit à préciser la notion de suivi sanitaire des eaux destinées à la consommation humaine.

Ce suivi sanitaire se compose d'une part du contrôle sanitaire effectué par les Directions départementales des affaires sanitaires et sociales (DDASS) et d'autre part de la surveillance réalisée par les personnes responsables de la production ou de la distribution de l'eau (PRPDE) (article R. 1321-23).

Dans le cadre du contrôle sanitaire il n'est pas prévu d'analyse virologique, qui n'est pas justifiable en raison d'une part de l'absence de méthode validée au niveau européen. D'autre part, la réalisation d'une telle surveillance au robinet du consommateur avec les techniques de détection actuellement utilisées n'est pas envisageable, les volumes ou le nombre d'échantillons à analyser étant trop élevés si l'on souhaite détecter des virus à des concentrations suffisamment faibles (cf. Question 9).

Il semble plus pertinent dans un premier temps de se focaliser sur la qualité virologique des ressources en eaux brutes et sur la capacité des traitements existants qui conduisent à un abattement de la concentration en virus.

#### C.2 Mesures portant sur la qualité de la ressource

La recherche de données sur la fréquence et le niveau de contamination des ressources en eau par les virus montre que peu de données sont actuellement disponibles. Ainsi, il semble pertinent de favoriser la réalisation d'études spécifiques permettant d'avoir un aperçu de la situation française et en tout état de cause, en amont de l'exploitation de nouvelles ressources en eau potable et en situations météorologiques contrastées, d'évaluer la fréquence et le niveau de contamination par les virus afin de pouvoir mettre en œuvre un traitement de potabilisation adapté. En l'absence d'indicateurs pertinents, ces études pourront se focaliser dans un premier temps sur les norovirus, les VHA et les rotavirus.

L'ensemble des mesures sur le bassin versant, participant à une meilleure qualité microbiologique de l'eau, sont à favoriser afin de limiter les apports en virus dans l'eau de la ressource.

### C.3 Mesures portant sur le traitement

En fonction de la qualité de la ressource il est indispensable de choisir une filière dont le niveau d'abattement garantit un niveau de contamination virale de l'eau distribuée non susceptible de dépasser le niveau de risque acceptable pour la population. Cependant, au niveau français, le niveau de risque acceptable n'est pas officiellement fixé. Par référence on peut s'inspirer de la proposition faite aux États-Unis de considérer qu'une eau de qualité microbiologique est satisfaisante si le risque d'infection est inférieur à  $10^{-4}$  par an et par micro-organisme.

Le niveau de contamination en virus des ressources en eau est généralement mal connu, ce qui conduit à devoir prendre une marge de sécurité importante quant au niveau d'efficacité du traitement.

Il n'y a pas actuellement de paramètre indicateur microbiologique et de méthodes normalisées permettant de tester *in situ* l'efficacité anti-virale des traitements. Néanmoins, pour les ressources en eau brute subissant de fréquentes contaminations en agents microbiologiques il est recommandé de prévoir des filières multibarrières, associées à une démarche qualité, qui vont participer à une meilleure sécurité sanitaire de l'eau distribuée. En effet, les différentes étapes de traitement de l'eau permettent un abattement de la concentration en virus (cf. Tableau 41 B.3).

### C.4 Mesures portant sur le réseau

Un **retour d'eau** correspond à une entrée d'eau à partir d'un point de distribution. L'eau circule alors en sens inverse dans le réseau. Les retours d'eau peuvent avoir deux origines :

- la dépression qui se passe lorsque le réseau est à une pression inférieure à la pression atmosphérique. Dans ce cas, si un robinet ouvert est en contact avec une eau polluée, celle-ci est aspirée dans le réseau de distribution ;
- la contre-pression qui se passe lorsque deux réseaux de qualités d'eau différentes sont en interconnexion et que le réseau pollué est à une pression supérieure à celle de l'eau potable. Il y a alors refoulement.

Différents moyens de prévention peuvent être mis en œuvre pour remédier à ces situations :

- l'installation de systèmes ne permettant à l'eau d'aller que dans un seul sens. Ce sont par ordre croissant de sécurité : les clapets anti-retour, les dis-connecteurs, les dis-connecteurs avec mise à l'atmosphère ;
- le fait d'éviter toute interconnexion entre des réseaux de qualité différente. Ce point est très important aujourd'hui car il est souvent recommandé pour économiser de l'eau utilisée à domicile d'utiliser deux sources d'eau :
  - une eau potable pour les besoins alimentaires,
  - une eau récupérée pour les autres besoins : eau de pluie, eaux grises retraitées ;
- les bornes d'incendie pour des raisons de sécurité ne peuvent avoir de système de disconnexion. Il est donc impératif que pour les usages autres que ceux de l'extinction des incendies, les systèmes de branchement incluent ces sécurités.

Lors des **travaux de réparation ou d'entretien**, des règles de prévention doivent être mises en place. Le ministère de la Santé et des Solidarités a édité un guide en ce sens, à destination des gestionnaires de réseau de distribution. Ce document a depuis été actualisé par le CSTB, l'ASTEE (ex AGHTM), le CRECEP, avec le soutien de la DGS (CSTB 2003 et 2005).

La vérification de l'efficacité des moyens de prévention et des désinfections avant remise en eau est de la responsabilité de la PRPDE. Le gestionnaire du réseau doit systématiquement en informer la DDASS.

### C.5 « Water safety plan » - OMS

L'OMS, dans ses dernières recommandations relatives à la qualité de l'eau de boisson (WHO, 2004), souligne la nécessité d'une démarche globale d'évaluation et de gestion du risque de la ressource au robinet du consommateur (Water safety plan). Cette démarche repose sur l'identification, la maîtrise et la surveillance des points critiques qui contribuent à la sécurisation de la qualité de l'eau, selon une approche multi-barrières conduisant à la mise en œuvre de plusieurs « verrous de sécurité » pour la production et la distribution d'eau : protection des ressources, traitements adaptés, produits et procédés autorisés, sécurisation des réseaux de distribution, suivi sanitaire.

Cette approche globale de la ressource au robinet, qui existe ainsi déjà partiellement dans le dispositif français devrait être pleinement intégrée au niveau communautaire lors de la prochaine révision de la directive 98/83/CE.

La mise en place d'une telle approche permettra notamment via l'étude des dangers, une meilleure prise en compte du risque viral par les personnes chargées de la distribution d'eau.

### Question 6

- Anonymous 1991.** Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water research* 25 (5), 529-545.
- Adams, M.H. 1959.** Bacteriophages. Interscience publishers: New York.
- Adham, S.S. 1996.** Removal of microorganisms by an advanced water repurification system proc. Am Water Works Ass WQTC. Boston, Mass.
- Adham, S.S., Gagliardo, P.F., Smith, D., Gramith, K. & Trussell, R.R. 1998a.** Monitoring of reverse osmosis for virus injection. AWWA Water Quality Technology Conference. San Diego, CA.
- Adham, S.S., Trussell, R.S., Gagliardo, P.F. & Trussell, R.R. 1998b.** Rejection of MS-2 virus by RO membranes. *J Am Water Works Ass* 90 (9), 130-135.
- Arnold, W.R. & Rainbow, A.J. 1996.** Host cell reactivation of irradiated adenovirus in UV-sensitive chinese hamster ovary cell mutants. *Mutagenesis* 11 (1), 89-94.
- Atherton, J.G. & Bell, S.S. 1983a.** Adsorption of viruses on magnetic particles-I. Adsorption of MS2 bacteriophages and the effect of cations, clay and polyelectrolyte. *Water research* 17 (8), 943-948.
- Atherton, J.G. & Bell, S.S. 1983b.** Adsorption of viruses on magnetic particles-II. Degradation of MS2 bacteriophages by adsorption to magnetite. *Water research* 17 (8), 949-953.
- AWWA, (ed) 1999.** *Water quality and treatment : a handbook of community water supplies*. New York, McGraw-Hill Inc.,
- Berg, G., Clark, R.M., Berman, D. & Chang, S.L. 1967.** Aberrations in survival curves. In *Transmission of viruses by water route*. Berg, G. (ed). New York.
- Berg, G., Dean, R.B. & Dahling, D. 1968.** Removal of poliovirus 1 from secondary effluents by lime flocculation and rapid sand filtration. *J Am Water Works Ass* 60, 193-198.
- Berg, G., Dahling, D., Brown, G.A. & Berman, D. 1978.** Validity of fecal coliforms, total coliforms, and fecal streptococci as indicators of viruses in chlorinated primary sewage effluents. *Appl. Environ. Microbiol.* 36 (6), 880.
- Bitton, G. & Mitchell, R. 1974.** Effect of colloids on the survival of bacteriophages in seawater. *Water research* 8 (4), 227-229.
- Blanc, R. & Nasser, A. 1996.** Effect of effluent quality and temperature on the persistence of viruses in soil. *Water Sci Technol* 33 (10-11), 237-242.
- Blackburn, B.G., Craun, G.F., Yoder, J.S., Hill, V., Calderon, R.L., Chen, N., Lee, S.H., Levy, D.A. & Beach, M.J. 2004.** Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with drinking water--United States, 2001-2002. *MMWR Surveill Summ* 53 (8), 23-45.
- Block, J.C., Richard, Y., Joret, J.C., Hartemann, P. & Foliguet, J.M. 1981.** Désinfection des eaux par l'ozone. *Eaux Ind.* 58, 69-76.
- Boardman, G.D. & Sproul, O.J. 1977.** Protection of viruses during disinfection by adsorption to particulate matter. *J. Water Pollut. Control Fed* 49, 1857-1861.
- Burleson, G.R., Murray, T.M. & Pollard, M. 1975.** Inactivation of viruses and bacteria by ozone, with and without sonication. *Appl. Environ. Microbiol.* 29, 340-344.
- Cavani, F., Trifiro, F. & Vaccari, A.A. 1991.** Hydralcite-type anionic clays: preparation, properties and applications. *Catal. Today* 11, 173-301.
- Chang, J.C., Ossoff, S.F., Lobe, D.C., Dorfman, M.H., Dumais, C.M., Qualls, R.G. & Johnson, J.D. 1985.** UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (6), 1361-1365.

- Chang, S.L., Stevenson, R.E., Bryant, A.R., Woodward, R.L. & Kabler, P.W. 1958.** Removal of coxsackie and bacterial viruses in water by flocculation 2. Removal of coxsackie and bacterial viruses and the native bacteria in raw Ohio river water by flocculation with aluminium sulfate and ferric chloride. *Am. J. Public Health* 48, 159-169.
- Chen, C., Nur, R., Stahl, J.F., Horvath, R.W. & Kuo, J.F. 1993.** UV inactivation of bacteria and viruses in tertiary effluent. Water Environment Federation Speciality Conference. New Jersey. 23-25 mai.
- Chesler, P.G. & Jacangelo, J.G. 1993.** Comparaison of MS2 bacteriophages inactivation by UV radiation and combined chlorine disinfection. Proceedins of the 66th annual water environment federation technical exposition and conference. Anaheim, California; 3 et 7 octobre.
- Chu, Y., Jin, Y., Flury, M. & Yates, M.V. 2001.** Mechanisms of virus removal during transport in unsaturated porous media. *Water Resour Res* 37, 253-263.
- Churn, C.C., Boardman, G.D. & Bates, R.C. 1984.** The inactivation kinetics of H-1 parvovirus by chlorine. *Water research* 18, 195-203.
- Clancy, J.L., Bukhari, Z., Hargy, T.H., Bolton, J.R., Dussert, B.W. & Marshall, M.M. 2000.** Using UV to inactivate *Cryptosporidium*. *J Am Water Works Ass* 90 (9), 97-104.
- Clesceri, L.S., Greenberg, A.E. & Eaton, A.D. 1998.** *Standards methods for the examination of water and wastewater*. Washington DC, USA p.
- Coffey, B.M., Stewart, M.H., Wattier, K.L. & Wale, R.T. 1993.** Evaluation of microfiltration for metropolitan's small domestic water systems. Proc. membrane technology Conference.
- Coin, L., Hannoun, C. & Gomella, C. 1964.** Inactivation par l'ozone du virus de la poliomyélite présent dans les eaux. *Presse Méd.* 72, 2145.
- Colvin, C.K., Acker, C.L., Marinas, B.J. & Lozier, J.C. 2000.** Microbial removal by NF/RO. Proc. of annual Am Water Works Ass Conference. Denver, CO.
- Cookson, J.T. 1967.** Adsorption of viruses on activated carbon : Adsorption of *Escherichia coli* bacteriophage T4 on activated carbon as a diffusion-limited process. *Environ. Sci. Technol.* 1, 157-160.
- Cotton, C.A., Linden, K.G., Schmelling, D.C., Bell, C. & Landis, H. 2001.** The development of the UV Dose Tables for LT2ESWTR Implementation. First International Congress on Ultraviolet Technologies. Washington D.C.
- CSTB 2003.** réseaux d'eau destinée à la consommation humaine à l'intérieur des bâtiments - partie 1 guide technique de conception et de mise en oeuvre.
- Dahl, E. 1976.** Physicochemical aspects of disinfection of water by means of ultrasound and ozone. *Wat. Res.* 10 (8), 677-684.
- DGS 2005.** L'eau potable en France 2002-2004. Ministère de la Santé et des Solidarités : DGS - DRASS - DDASS. 47 p.
- Dryden, F.D., Chen, C.L. & Selna, M.W. 1979.** Virus removal in advanced wastewater treatment systems. *J. Wat. Pollut. Control Fed.* 51, 2098-2109.
- Emerson, M.A., Sproul, O.J. & Buck, C.E. 1982.** Ozone inactivation of cell-associated viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 603-608.
- Evison, L.M. 1981.** Disinfection of effluents using ozone. In *Viruses and Wastewater Treatment*. Goddard, M. & Butler, M. (eds). New York, Pergamon press., pp. 175-178.
- Farooq, S. & Chian, E.S.K. 1976.** Discussion : Inactivation of poliovirus in water by ozonation. *J. Water Pollut. Control Fed* 48, 593-598.
- Farooq, S. & Akhlaque, S. 1983.** Comparative response of mixed cultures of bacteria and virus to ozonation. *Water Res* 17 (7), 809-812.
- Finch, G.R. & Fairbairn, N. 1991.** Comparative inactivation of poliovirus Type 3 and MS 2 coliphage in demand-free phosphate buffer using ozone. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3121-3126.

## Question 6

**Fleischer, J., Schlafmann, K., Otchwemah, R. & Botzenhart, K. 2000.** Elimination of enteroviruses, other enteric viruses, F specific coliphages, somatic coliphages and E. Coli in sewage treatment plant of southern germany. *J. Water Supply Res. Technol.* AQUA 49.3 (3), 127-138.

**Floyd, R. & Sharp, D.G. 1977.** Aggregation of Poliovirus and Reovirus by Dilution Water. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 159-167.

**Floyd, R. & Sharp, D.G. 1978.** Viral aggregation : quantitation and kinetics of poliovirus and reovirus. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 1079-1083.

**Foliguet, J.M. & Doncoeur, F. 1975.** Élimination des entérovirus au cours du traitement des eaux d'alimentation par coagulation-floculation-filtration. *Water Res.* 9 (11), 953-961.

**Foliguet, J.M. 1983.** Virus et eaux - évolution des idées. Questions en suspens. *Techn. Sci. Munic. Eau* 78, 3-9.

**Foster, D.M., Emerson, M.A. & Buck, C.E. 1980.** Ozone inactivation of cell and fecal-associated viruses and bacteria. *Journal WPCF* 52, 2174-2184.

**Gagliardo, P.F., Adham, S.S., Trussel, R.R. & Olivieri, A.W. 1997.** Membranes as an alternative to disinfection. Proc. of Annual Am Water Works Ass Conference. Atlanta, GA.

**Galasso, G.J., Sharp, J. & Sharp, D.G. 1962.** Virus particle aggregation and the plaque-forming unit. *J. Immunol.* 88, 339-347.

**Galasso, G.J., Sharp, D.G. & Sharp, J. 1964.** The Influence of Degree of Aggregation and Virus Quality on the Plaque Titer of Aggregated Vaccinia Virus. *J. Immunol.* 92, 870.

**Gantzer, C., Quignon, F. & Schwartzbrod, L. 1994.** Poliovirus-1 adsorption onto and desorption from montmorillonite in seawater. Survival of the adsorbed virus. *Environ. Technol.* 15 (3), 271-278.

**Gerba, C.P. & Lance, J.C. 1978.** Poliovirus removal from primary and secondary sewage effluent by soil filtration. *Appl Environ Microbiol* 36 (2), 247-251.

**Gerba, C.P. 1984.** Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. *Adv Appl Microbiol* 30, 133-168.

**Gerba, C.P., Marzouk, Y., Manor, Y., Ideloitch, E. & Vaughn, J.M. 1984.** Virus removal during land application of wastewater - A comparison of three projects. In *Future of reuse*. Vol. 3. Am Water Works Ass Res. Foundation (ed). Denver, pp. 1518-1529.

**Gerba, C.P., Powelson, D.K., Yahy, M.T., Wilson, D.K. & Amy, G.L. 1991.** Fates of viruses in treated effluent during soil aquifer treatment designed for wastewater reclamation and reuse. *Water Sci Technol* 24, 95-102.

**Gerba, C.P., Gramos, D.M. & Nwachuku, N. 2002.** Comparative inactivation of enterovirus and adenovirus by UV light. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (10), 5167-5169.

**Gilcreas, F.W. & Kelly, S.M. 1955.** Relation of coliform-organism test to enteric virus pollution. *J Am Water Works Assoc* 47, 693.

**Grant, S.B. 1994.** Virus Coagulation Aqueous Environments. *Environ. Sci. Technol.* 28, 928-933.

**Gupta, A. & Chaudhuri, M. 1995.** Enteric virus removal/inactivation by coal-based media. *Water Res.* 29, 511-516.

**Guy, M.D. & Mc Iver, J.D. 1977.** The removal of virus by a pilot treatment plant. *Wat. Res.* 11, 421-428.

**Hajenian, H.G. & Butler, M. 1980.** Inactivation of viruses in municipal effluent by chlorine. *J. Hyg. Camb.*, 8463-8469.

**Harakeh, M. & Butler, M. 1984.** Inactivation of human rotavirus SA11 and other enteric viruses in effluent by disinfectants. *J. Hyg. Camb.* 93, 157-163.

**Harakeh, M. & Butler, M. 1985.** Factors influencing the ozone inactivation of enteric viruses in effluent. *Ozone Sci. Eng.* 6, 235-243.

**Havelaar, A.H., Hogeboom, W.M. & Pot, R. 1984.** F Specific RNA bacteriophages in sewage : methodology and occurrence. *Wat. Sci. Technol.* 17 (4-5), 645-655.

**Havelaar, A.H. & Nieuwstad, T.J. 1985.** Bacteriophages and fecal bacteria as indicators of chlorination efficiency of biologically treated wastewater. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 571084-571088.

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

**Havelaar, A.H., Meulemans, C.C.E., Pot-Hogeboom, W.M. & Koster, J. 1990.** Biological Calibration of Monochromatic Ultraviolet Sources Using F-Specific Bacteriophage MS2. *Water Res.* 24, 1387-1393.

**Hejkal, T.E., Wellings, F.M., Larock, P.A. & Lewis, A.L. 1979.** Survival of poliovirus within organic solids during chlorination. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 114-118.

**Hejkal, T.W., Wellings, F.M., Lewis, A.L. & Larock, P.A. 1981.** Distribution of viruses associated with particles in wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 628-634.

**Helmer, R.D. & Finch, G.R. 1993.** Use of MS2 coliphage as a surrogate for enteric viruses in surface waters disinfected with ozone. *Ozone Sci. Eng.* (15).

**Herbold, K., Flehmig, B. & Botzenhart, K. 1989.** Comparison of ozone inactivation in flowing water of hepatitis A virus, poliovirus I, and indicator organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2949-2953.

**Hoff, J.C. 1986.** Inactivation of Microbial Agents by Chemical Disinfectants. USEPA, p.

**Hoff, J.C. & Akin, E.W. 1986.** Microbial resistance to disinfectants: mechanisms and significance. *Environ Health Perspect* 69, 7-13.

**Hurst, C.J., Gerba, C.P. & Cech, I. 1980.** Effects of environmental variables and soil characteristics on virus survival in soil. *Appl Environ Microbiol* 40 (6), 1067-1079.

**Hurst, C.J. 1988.** Influence of aerobic microorganisms upon virus survival in soil. *Can J. Microbiol* 34, 696-699.

**Irmscher, R. & Teermann, I. 2002a.** Riverbank filtration for drinking water supply. A Prover method, Perfect to face to day's challenges. *Water Sci. Technol : Water Supply* 2 (5-6), 1-8.

**Irmscher, R. & Teermann, I. 2002b.** Riverbank filtration for drinking water supply. A Prover method, Perfect to face to day's challenges. *Stadtwerke Dusseldorf AG (D)*.

**InVS. 2006.** Détection précoce automatisée des épidémies de gastro-entérites d'origine hydrique à partir des données de vente ou de remboursement des médicaments, Étude de faisabilité : choix des données sanitaires et des départements pilotes. Ed. InVS. 40p.

**Irving, L.G. & Smith, F.A. 1981.** One year survey of enteroviruses, adenoviruses, and reoviruses isolated from effluent at an activated-sludge purification plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 41 41, 51-59.

**Jacangelo, J., Adham, S.S. & Laine, J.M. 1995.** Mechanism of Cryptosporidium Giardia and MS2 virus removal by MF and U. *J Am Water Works Ass* 87 (9), 107-121.

**Jensen, H., Thomas, K. & Sharp, D.G. 1980.** Inactivation of coxsackievirus B3 and B5 in water by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* 40, 633-640.

**Jin, Y., Chu, Y.J. & Li, Y.S. 2000.** Virus removal and transport in saturated and unsaturated sand columns. *J Contam Hydrol* 43, 11-118.

**Jolis, D. 2002.** The effect of storage and lag time on MS2 Bacteriophage susceptibility to UV radiation. *Water Environ. Res.* 74 (6), 516-520.

**Joret, J.C., Block, J.C., Hartemann, P. & Richard, Y. 1982.** Wastewater disinfection : elimination of fecal bacteria and enteric viruses by ozone. *Ozone Sci. Eng.* 4, 91-99.

**Joret, J.C., Hassen, A., Bourbigot, M.M., Agbalika, F., Hartemann, P. & Folliguet, J.M. 1986.** Inactivation des virus dans l'eau sur une filière de production à ozonation étagée. *Water Res.* 20 (7), 871-876.

**Kamp, P.C. 1996.** Combined use of ultrafiltration and reverse osmosis for direct treatment of surface water. 10 Mylheimer Wassertechnischen Seminar. Universität-GH Duisburg, Germany.

**Katzenelson, E., Kletter, B. & Shuval, H.I. 1974.** Inactivation kinetics of viruses and bacteria in water by use of ozone. *J Am Water Works Ass* 66 (725-729).

## Question 6

- Katzenelson, E., Koerner, G., Biedermann, N., Peleg, M. & Shuval, H.I. 1979.** Measurement of the inactivation kinetics of poliovirus by ozone in a fast-flow mixer. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 715-724.
- Keswick, B.H., Satterwhite, T.K., Johnson, P.C., Dupont, H.L., Secor, S.L., Bitsura, J.A., G.W., G. & Hoff, J.C. 1985.** Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 261-264.
- Kim, C.K., Gentile, D.M. & Sproul, O.J. 1980.** Mechanism of ozone inactivation of bacteriophage f2. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 210-218.
- Kitis, M., Lozier, J.C., Kim, J.H. & Marifias, B.J. 2003.** Evaluation of biologic and no biologic methods for assessing virus removal by and integrity of high pressure membrane systems. *Water Sci. Technol : Water Supply* 3 (5), 81-92.
- Kolega, M., Grohmann, G.S., Chiew, R.F. & Day, A.W. 1991.** Disinfection and clarification of treated sewage by advanced microfiltration. *Applied and Environmental Microbiology* 27 (7-9), 1609-1618.
- Kritemeyer, S. 1994.** Virologische Untersuchungen zur kombinierten UV-Ozon Behandlung biologisch vorgereinigten Abwässers unter Berücksichtigung des Schwebstoffgehaltes. Hohenheim, University Hohenheim, pp. 29-49.
- Kuehn, W. & Muller, U. 2000.** Riverbank filtration an overview. *J Am Water Works Ass*, 60-69.
- Le Chevalier, M.W., Evans, T.M. & Seidler, R.J. 1981.** Effect of turbidity on chlorination efficiency and bacterial persistence in drinking water. *Appl. Environ Microbiol.* 42 (1), 159-167.
- Lee, S.H. & Kim, S.J. 2002.** Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. *Water Res.* 36 (1), 248-256.
- Liew, P.F. & Gerba, C.P. 1980.** Thermostabilization of enteroviruses by estuarine sediment. *Applied and Environmental Microbiology* 40, 305-308.
- Lipson, S.M. & Stotsky, G. 1985.** Effect of bacteria on the inactivation and adsorption on clay minerals of reovirus. *Can J. Microbiol.* 31, 730-735.
- Lozier, J.C. 1994.** Meeting stringent surface water discharge requirements for reclamation water with membrane processes. ASCE Natl. Conf. on Envir. Engrg., Boulder, Colo.
- Mackey, E.D. 2000.** UV disinfection systems for the inactivation of Cryptosporidium - evaluating practical implementation issues. Am Water Works Ass Ann. Conf. Denver.
- Majumdar, S.B., Cekler, W.H. & Sroul, O.J. 1973.** Inactivation of poliovirus in water by ozonation. *Journal WPCF* 45, 2433-2443.
- Mandel, B. 1973.** An analysis of the physical and chemical factors involved in the reactivation of neutralized poliovirus by the method of freezing and thawing. *Virology* 51 (2), 358-369.
- Matsui, Y., Matsushita, T., Imai, Y., Sakuma, S. & Inoue, T. 2001.** Virucidal activity of coagulant PACl and alum. IWA 2nd World Water Congress. Berlin.
- Matsui, Y., Matsushita, T., Inoue, T., Yamamoto, M., Hayashi, Y., Yonekawa, H. & Tsutsumi, Y. 2003.** Virus removal by ceramic membrane microfiltration with coagulation pretreatment. *Water Sci. Technol : Water Supply* 3 (5), 93-96.
- Meng, Q.S. & Gerba, C.P. 1996.** Comparative inactivation of enteric adenovirus, poliovirus, and coliphages by ultraviolet irradiation. *Wat. Res.* 30, 2665-2668.
- Miyata, S. 1983.** Anion-exchange properties of hydrotalcite-like compounds. *Clays Clay Miner* 31, 305-311.
- Moore, B.E., Sagik, B.P. & Malina, J.F. 1975.** Viral association with suspended solids. *Wat. Res.* 9, 197-203.
- Morris, R. 1984.** Reduction of naturally occurring enteroviruses by wastewater treatment processes. *J Hyg. Camb* 92, 97-103.
- Murray, J.P. & Laband, S.J. 1979.** Degradation of poliovirus by adsorption on inorganic surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 37 (3), 480-486.

- Narkis, N., Armon, R., Offer, R., Orshansky, F. & Friedland, E. 1995.** Effect of suspended solids on wastewater disinfection efficiency by chlorine dioxide. *Water Res.* 29, 227-236.
- Nasser, A., Weinberg, D., Dinooor, N., Fattal, B. & Adin 1995.** Removal of hepatitis A virus (HAV), poliovirus and MS-2 coliphage by coagulation and high rate filtration. *Water Sci Technol* 31 (5-6), 63-68.
- Nebbache, S., Feeny, V., Poudevigne, I. & Alard, D. 2001.** Turbidity and nitrate transfer in karstic aquifers in rural areas : the Brionne Basin case-study. *J Environ Manage* 62 (4), 389-398.
- Nieuwstad, T.J., Havelaar, A.H. & Van Olphen, M. 1991.** Hydraulic and Microbial Characterization of Reactors for Ultraviolet Disinfection of Secondary Wastewater Effluent. *Water Res.* 25, 775-783.
- O'Melia, C.R., Hahn, M.W. & Chen, C.T. 1997.** Some effect of particule size in separation processes involving colloids. *Water Sci Technol* 36 (4), 119-123.
- Oppenheimer, J.A., Laine, J.M., Jacangelo, J.G., Bhamrah, A. & Hoagland, J.E. 1993.** Chlorine and UV disinfection of tertiary effluent : a comparative study of bacterial and viral inactivation and effluent by-products. 66th Annual Water Environment Federation Technical Exposition and Conference. Anaheim, California., Oct 3-7.
- Payment, P., Tremblay, M. & Trudel, M. 1985.** Relative resistance to chlorine of poliovirus and coxsackievirus isolates from environmental sources and drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 981-983.
- Payment, P., Richardson, L., Siemiatycki, J., Dewar, R., Edwardes, M. & Franco, E. 1991.** A randomized trial to evaluate the risk of gastrointestinal disease due to the consumption of drinking water meeting currently accepted microbiological standards. *Am. J. Public Health* (81), 703-708.
- Penrod, S.L., Olson, T.M. & Grant, S.B. 1996.** Deposition kinetics of two viruses in packed beds of quartz granular media. *Langmuir* 12, 5576-5587.
- Pieper, A.P., Ryan, J.N., Harvey, R.W., Amy, G.L., Illangasekare, T.H. & Metge, D.W. 1997.** Transport and Recovery of Bacteriophage PRD1 in a Sand and Gravel Aquifer: Effect of Sewage-Derived Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.* 31 (4), 1163-1170.
- Postlethwaite, R. & Maitland, H.B. 1960.** The eclipse phase of vaccinia virus growing in chick embryo cell monolayers and some technical procedures which affect its demonstration. *J Hyg (Lond)* 58, 133-145.
- Powell, T., Brion, G.M., Jagtoyen, M. & Derbyshire, F. 2000.** Investigating the effect of carbon shape on virus adsorption. *Environ. Sci. Technol.* 34, 2779-2783.
- Powelson, D.K. & Gerba, C.P. 1994.** Virus removal from sewage effluents during saturated and unsaturated flow through soil columns. *Water Res* 28 (10), 175-181.
- Qualls, R.G. & Johnson, J.D. 1983.** Bioassay and Dose Measurement in UV Disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 872-877.
- Quanrud, D.M., Arnold, R.G., Wilson, L.G., Gordon, H., Graham, D. & Amy, G.L. 1996.** Fate of organics during column studies of soil aquifer treatment. *J. Environ. Eng. Div. Am. Soc. Civil Eng* 133 (4), 314-321.
- Quanrud, D.M., Carroll, S.M., Gerba, C.P. & Arnold, R.G. 2003.** Virus Removal during simulated soil aquifer treatment. *Water Res* 37, 753-762.
- Rao, V.C., Symons, J.M., Ling, A., Wang, P., Metcalf, T.G., Hoff, J.C. & Melnick, J.L. 1988.** Removal of Hepatitis A Virus and Rotavirus by drinking water treatment. *J Am Water Works Ass*, 59-67.
- Robeck, G.G., Clarke, N.A. & Dostal, K.A. 1962.** Effectiveness of water treatment processes in virus removal. *J Am Water Works Ass* 54, 1275-1292.
- Rose, J. 1994.** Risk Assessment of Parasites and Bacteria in Reclaimed Water. Am Water Works Ass - WEF Water Reuse Symposium. Dallas, Texas.
- Rose, J.B., Gerba, C.P., Singh, S.N., Toranzos, G.A. & Keswick, B.J. 1986.** Isolating viruses from finished water. *J Am Water Works Ass* 78 (1), 56-61.
- Rose, J.B., Dickson, L.J., Farrah, S.R. & Carnahan, R.P. 1996.** Removal of pathogenic and indicator microorganisms by a full-scale water reclamation facility. *Water Res.* 30, 2785-2787.

## Question 6

- Roy, D., Engelbrecht, R.S., Wong, P.K.Y. & Chian, E.S.K. 1981.** Mechanism of enteroviral inactivation by ozone. *Appl Environ Microbiol* 41 (3), 718-723.
- Roy, D., Chian, E.S.K. & Engelbrecht, R.S. 1982.** Mathematical model for enterovirus inactivation by ozone. *Water Res.* 16, 667-673.
- Ryan, J.N. & Elimelech, M. 1996.** Colloid mobilization and transport in groundwater. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Aspects* 107, 1-56.
- Ryan, J.N., Harvey, R.W., Metge, D.W., Elimelech, M., Navigato, T. & Pieper, A.P. 2002.** Field and laboratory investigations of inactivation of viruses (PRD1 and MS2) attached to iron oxide coated quartz sand. *Environ. Sci. Technol.* 36, 2403-2413.
- Ryder, R.A. 2000.** Preozone pre treatment and post ozone disinfection at toxins Air Force Base Water Treatment Plant. *IWA*, S.6.20-S.26.41.
- Schiffenbauer, M. & Stotsky, G. 1982.** Adsorption of coliphages T1 and T7 to host and non-host microbes and to clay minerals. *Curr. Microbiol.* 43, 590-596.
- Schijven, J.F. & Hassanizadeh, S.M. 2000.** Removal of virus by soil passage : Overview of modeling processes and parameters. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 30, 49-127.
- Schubert, J., Liebich, D., Domnick, B., Engels, C. & Tacke, T. 1992.** Sicherheit der Trinkwassergewinnung aus Uferfiltrat bei Stossbelastungen. Teilprojeket 3 : Stadtwerke Dusseldorf AG,. Abshclubericht, BMBF - Verdundvorhaben 02 - WT 88141, Germany.
- Shaffer, P.T.B., Metcalf, T.G. & Sproul, O.J. 1980.** Chlorine resistance of poliovirus isolants recovered from drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 40 (6), 1115-1121.
- Sharp, D.G. 1966.** *In transmission of viruses by the water route (BERG G., ed.)*. New York, Wiley. 193-217 p.
- Sharp, D.G., Floyd, R. & Johnson, J.D. 1975.** Nature of the surviving plaque-forming unit of reovirus in water containing bromine. *Appl. Microbiol.* 29, 94-101.
- Sharp, D.G., Floyd, R. & Johnson, J.D. 1976.** Initial fast reaction of bromine on reovirus in turbulent flowing water. *Applied and Environmental Microbiology* 31, 173-181.
- Sharp, D.G. & Leong, J. 1980.** Inactivation of poliovirus I (Brunhilde) single particles by chlorine in water. *Applied and Environmental Microbiology* 40, 381-385.
- Sharp, D.G. 1982.** Virion aggregation and disinfection of water by chlorine and bromine-No. EPA 600/52-82-022. Res. Dvlpmt. Rprt. EPA. Cincinnati, USA.
- Slifko, T.R., Cooper, W.H., Pflieger, S., Pribil, W., Sommer, R. & Rose, J.B. 2001.** Effect of ionizing radiation on waterborne pathogens and alternate indicators : cryptosporidium parvum, klebsiella terrigena and MS-2 and PRD-1. Water Works Ass Congress. Berlin. 15/19 October.
- Smith, K.O. 1963.** Physical and biological observations on herpesvirus. *J. Bacteriol* 63, 999.
- Sobsey, M.D., Dean, C.H., Knuckles, M.E. & Wagner, R.A. 1980.** Interactions and survival of enteric viruses in soil materials. *Appl Environ Microbiol* 40 (1), 92-101.
- Sobsey, M.D., Fuji, T. & Shields, P.A. 1988.** Inactivation of hepatitis A virus and model viruses in water by free chlorine and monochloramine. *Water Sci. Technol.* 20, 385-391.
- Sobsey, M.D. 1989.** Inactivation of health-related microorganisms in water by disinfection processes. *Wat. Sci. Technol.* 21, 179-195.
- Sobsey, M.D., Fuji, T. & Hall, R.M. 1991.** Inactivation of cell-associated and dispersed hepatitis A virus in water. *J. Am. Water Works Assoc.* 11, 64-67.
- Sontheimer, H. 1991.** Trinkwasser aus dem Rhein ? Academia Verlag p.
- Soule, H., Gratacap-Cavallier, B., Genoulaz, O., Potelon, J.L., François, P., Zmirou, D. & Seigneurin, J.M. 1999.** Rôle de l'eau d'alimentation dans la transmission des rotavirus : une étude cas-témoins en Isère. *Med. Mal. Inf.* (29), 13-18.

- Springthorpe, S., Sander, M., Nolan, K. & Sattar, S.A. 2001.** Comparison of static and dynamic disinfection models for bacteria and viruses in water of varying quality. *Water Sci. Technol.* 43 (12), 147-154.
- Stagg, C.H., Wallis, C. & Ward, C.H. 1977.** Inactivation of clay-associated bacteriophage MS-2 by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 385-391.
- Steven, M.L. & Stotsky, G. 1983.** Adsorption of reovirus to clay minerals : Effects of cation-exchange capacity, cation saturation and surface area. *Applied and Environmental Microbiology* 46, 673-682.
- Steven, M.L. & Stotsky, G. 1984.** Infectivity of reovirus adsorbed to homoionic and mixed-cation clays. *Wat. Res.* 19 (2), 227-234.
- Straub, T.M., Pepper, I.L. & Gerba, C.P. 1992.** Persistence of Viruses in Desert Soils Amended with Anaerobically Digested Sewage Sludge. *Appl Environ Microbiol* 58 (2), 636-641.
- Thurman, R.B. & Gerba, C.P. 1988.** Molecular mechanisms of viral inactivation by water disinfectants. *Adv. Appl. Microbiol.* 33, 75-105.
- Thurston-Enriquez, J.A., Haas, C.N., Jacangelo, J., Riley, K. & Gerba, C.P. 2003.** Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation. *Appl Environ Microbiol* 69 (1), 577-582.
- Tyrrell, S.A., Rippey, S.R. & Watkins, W.D. 1995.** Inactivation of bacterial and viral indicators in secondary sewage effluents, using chlorine and ozone. *Wat. Res.* 29 (11), 2483-2490.
- US EPA 1989.** Part V, Environmental Protection Agency, 40 CFR Parts 141 and 142. National Primary Drinking Water Regulations : Filtration, disinfection, turbidity, giardia lamblia, viruses, Legionella, and heterotrophic bacteria, Final rule. *Federal Register* 54, 27485-27541.
- US EPA 1991.** *Guidance manual for compliance with the Filtration and Disinfection Requirements for Public Water Systems using Surface Water Sources.* Washington, DC p.
- US EPA 1998.** Part V, Environmental Protection Agency, 40 CFR parts 141 and 142. National Primary Drinking Water Regulations : Interim Enhanced Surface Water Treatment : Finals rule. *Federal Register* 63 (241), 69477-69521.
- US EPA 2000.** Part II, Environmental Protection Agency 40 CFR parts 141 and 142. National Primary Drinking Water Regulations : Ground Water Rule ; Proposed Rule. *Federal Register* 65 (91), 30193-30274.
- US EPA 2003.** Ultraviolet disinfection guidance manual - DRAFT 815-D-03-007. United States Environmental Protection Agency. 478 p.
- Vandenbussche, G., Wustemann, U. & Kietemeyer, S. 1994.** Ozone disinfection dynamics of enteric viruses provide evidence that infection to reduction is triggered by alteration to viral colloidal properties. *Microbiol. Res.* 149, 1-20.
- Vaughn, J.M., Chen, Y.S., Lindburg, K. & Morales, D. 1987.** Inactivation of human and simian rotavirus by ozone. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2218-2221.
- Vaughn, J.M., Chen, Y.S., Novotny, J.F. & Strout, D. 1990.** Effects of ozone treatment on the infectivity of hepatitis A virus. *Can J. Microbiol.* 36 (557-560).
- Venosa, A.D., Petradek, A.C., Brown, D., Sparks, H.L. & Allen, D.M. 1984.** Disinfection of secondary effluent with ozone UV. *J. Wat. Pollut. Control Fed.* 56, 137-142.
- Vilagines, P., Sarrette, B. & Vilagines, R. 1988.** Détection en continu du poliovirus dans des eaux de distribution publique. *C.R. Acad. Sci. Paris* 307 (série III), 171-176.
- Wei, J.H. & Chang, S.L. 1975.** A multi-poisson distribution model for treating disinfection data. In *Disinfection : Water and Waste Water.* Johnson, J.D. (ed), Ann Arbor Science, Ann Arbor.
- WHO 2004.** *Guidelines for Drinking-water Quality - Volume 1 -Recommendations.* Geneva, World Health Organization 2004. 515 p.
- Wiedenmann, A., Fischer, B., Straub, U., Wang, C.H., Flehmig, B. & Schoenen, D. 1993.** Disinfection of Hepatitis A Virus and MS2 Coliphage in Water by Ultraviolet Irradiation : Comparison of UV-Susceptibility. *Water Sci. Technol.* 27 (3-4), 335-338.

## Question 6

**Wilson, B.R., Roessler, P.F., Van Dellen, E., Abbaaszadegan, M. & Gerba, C.P. 1992.** Coliphage MS2 as a UV Water Disinfection Efficacy Test Surrogate for Bacterial and Viral Pathogens. Water Tehcnology Conference. Toronto, Ontario, Canada.

**Yates, M.V., Gerba, C.P. & Kelley, L.M. 1985.** Virus persistence in groundwater. *Appl Environ Microbiol* 49 (4), 778-781.

**Yates, M.V., Yates, S.R., Wagner, J. & Gerba, C.P. 1987.** Modeling virus survival and transport in the subsurface. *J Contaminant Hydrol* 1, 29-345.

**Yates, M.V. 1995.** Field evaluation of the GWDR's natural disinfection criteria. *J Am Water Works Ass* 87, 76-85.

**Yates, M.V. & Gerba, C.P. 1998.** Microbial considerations in wastewater reclamation and reuse. In *Wastewater reclamation and reuse*. Asano, T. (ed), Lancaster PA : Technomic Publishers, pp. 437-488.

**You, Y.W., Vance, G.F. & Zhao, H.T. 2001a.** Selenium sorption on Mg-Al and Zn-Al layered double hydroxides. *Appl. Clay Sci.* 20, 13-25.

**You, Y.W., Zhao, H.T. & Vance, G.F. 2001b.** Removal of arsenite from aqueous solution by anionic clays. *Environ. Technol.* 22, 1447-1457.

**Young, D.E. & Sharp, D.G. 1985.** Virion conformational forms and the complex inactivation kinetics of echovirus by chlorine in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 359-364.

**Zaiss, U. & Hennies, H.H. 1988.** Quantitative studies of the elimination of coliphages and other fecal indicators during wastewater treatment. *Zentrbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B* 186 (5-6), 512-525.

**Question 7 : Quels systèmes de détection de situation d'alerte existent et quelles investigations en situation d'alerte ?**



## Question 7 : Quels systèmes de détection de situation d'alerte existent et quelles investigations en situation d'alerte ?

Coordinateur de la question : Mme De Valk  
Membres du sous-groupe : M. Dubois, Mme Le Guyader

### Question 7

#### Résumé de la Question 7

L'alerte correspond à toute information faisant état d'une possible menace pour la santé publique pouvant nécessiter une réponse ou une action de la part des destinataires, avec un degré d'urgence éventuellement précisé. La notification des phénomènes anormaux conduisant à l'alerte est d'origine variée : déclaration obligatoire, réseau de surveillance acteurs de la santé ou autres personnes (élus, particuliers, etc.).

L'alerte donnée, les investigations épidémiologiques comprennent une phase descriptive qui permet de générer des hypothèses sur la source de l'épidémie qui seront testées par une enquête analytique de type cas-témoin.

Les investigations virologiques sont à réaliser de façon concomitante aux investigations bactériologiques et parasitologiques. Elles devraient reposer sur un réseau de laboratoires impliqués en santé humaine, hygiène des aliments et hygiène de l'eau. Ceci souligne la nécessité d'une structuration, sous forme de réseau, des laboratoires impliqués dans la détection des virus et d'autres microorganismes dans les matrices alimentaires et l'eau. A cette fin, il est important de disposer de laboratoires de référence, notamment pour les principales catégories de matrices alimentaires concernées (coquillages, eau, végétaux).

Si l'alerte provient de la détection d'un ou plusieurs agents viraux dans l'eau de consommation ou sur un aliment, la première étape de l'investigation a pour objectif de déterminer si la contamination détectée est à l'origine d'un excès de cas de pathologies. La suite des investigations épidémiologiques est celle décrite précédemment.

Les investigations environnementales ont pour objectif d'identifier les causes de la contamination de l'eau ou de l'aliment afin de prendre les mesures pour mettre fin à l'épisode en cours. L'enquête recherchera l'origine des produits, une éventuelle contamination à la production ou lors d'un stockage, lors de la manipulation de l'aliment par une personne excrétrice du virus.

La nature des mesures de contrôles et de prévention et leur mise en œuvre sont déterminées en fonction des résultats des investigations ; elles doivent être adaptées aux situations locales et décidées en concertation avec les partenaires concernés.

Une réponse rapide et efficace à une situation épidémique d'origine hydrique nécessiterait de développer au niveau départemental un partenariat à compétences multiples.

Les conditions de retour à la normale sont à déterminer pour chaque situation. Une surveillance renforcée doit être maintenue lors de la réouverture d'un système de distribution d'eau ou la remise sur le marché des aliments.

#### A. L'alerte : définitions

##### A.1 Alerte

Toute information faisant état d'une possible menace pour la santé publique pouvant nécessiter une réponse ou une action de la part des destinataires avec un degré d'urgence éventuellement précisé.

##### A.2 Distinction entre « signal » et « alerte »

Dans un objectif de gestion et de hiérarchisation de l'information disponible, il est nécessaire de distinguer le « signal » de l'« alerte ».

- Un signal est une information qui peut révéler une situation d'alerte mais dont le niveau de précision est insuffisant pour porter un jugement sur la réalité de la menace. Un signal nécessite d'être validé, confirmé,

complété ou simplement noté lors d'une phase exploratoire. Suite à cette phase exploratoire le signal pourra être transformé en alerte, donner lieu à une surveillance pour détecter d'autres signaux similaires, être simplement noté ou être infirmé car il correspond à un « faux positif ». Le passage du signal à l'alerte nécessite un jugement qui est porté sur des faits documentés après une phase d'expertise.

- L'alerte correspond à une situation pour laquelle un jugement a été porté, suite à une expertise sur le fait qu'elle menace potentiellement la santé publique.
- Il est possible de passer directement à l'alerte si le signal est suffisamment explicite (exemple : franchissement d'un seuil épidémique d'un système de surveillance, signalement d'une épidémie de cas confirmés d'une maladie infectieuse...).

### A.3 Autres termes

- Agrégat ou « cluster » : regroupement spatio-temporel de cas d'une maladie sans que l'on puisse juger du caractère anormal par rapport à l'incidence moyenne.
- Cas groupés ou « éclosion » : regroupement spatio-temporel de cas d'une maladie ou syndrome jugé comme supérieur à ce que l'on attend (outbreak des anglo-saxons).
- Épidémie : il s'agit d'une situation de cas groupés d'une ampleur plus importante (touchant par exemple une région ou l'ensemble du territoire).
- Toxi-Infection Alimentaire Collective : la survenue d'au moins deux cas groupés, présentant une symptomatologie similaire, en général digestive, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire (y compris hydrique).

Pour les virus transmissibles à l'homme par l'ingestion d'eau ou d'aliments, les signaux pris en compte dans le processus de mise en alerte peuvent correspondre à une situation d'exposition à un agent (mise en évidence de virus dans une matrice alimentaire ou une eau de consommation) ou de survenue de cas (constatation d'un excès de cas de pathologie attribuée à un même agent causal identifié, d'un excès de cas présentant une symptomatologie similaire sans agent causal identifié, ou d'événements de santé inhabituels comme par exemple une létalité élevée, des formes cliniques inhabituelles, des souches inhabituelles, etc.).

## B. Détection de l'alerte

### B.1 Détection de cas groupés/épidémies

Les sources de signaux « sanitaires » sont multiples, provenant soit de systèmes de surveillance ou d'alerte existants soit de « notifications spontanées » de phénomènes considérés comme anormaux par les personnes à l'origine du signalement. Il peut s'agir d'une pathologie, le plus souvent de gastroentérite aiguë ou d'un autre phénomène potentiellement indicateur d'une pathologie, comme une augmentation de l'absentéisme (en milieu scolaire ou professionnel ou autre) ou de la consommation d'un certain type de médicaments (comme les anti-diarrhéiques).

#### B.1.1 Systèmes de surveillance

##### B.1.1.1 Déclaration obligatoire

- La déclaration obligatoire des TIAC permet d'identifier, entre autres, des cas groupés de pathologies dues aux virus transmis par l'eau et les denrées alimentaires. Toute TIAC doit faire l'objet d'une déclaration à la Direction départementale des affaires sanitaires et sociales (DDASS) ou à la Direction départementale des services vétérinaires (DDSV) du département de survenue qui sont en charge de leur investigation (Décret n°99-363,1999). Cette déclaration est obligatoire pour tout médecin ou biologiste qui en a constaté l'existence, pour le principal occupant, chef de famille ou d'établissement, des locaux où se trouvent les malades.
- Le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France a émis un avis favorable pour la mise à déclaration obligatoire (DO) de l'hépatite A lors de sa session du 26 novembre 2004. Depuis le 10 novembre 2005, l'hépatite A aiguë est incluse dans la liste des maladies à déclaration obligatoire (Décret n°2005-1395 du 10 novembre 2005). Cette DO est effectuée par les médecins ou les biologistes qui ont connaissance du cas. Elle a, entre autres, pour objectif de détecter les cas groupés à l'échelon départemental afin de prendre les mesures de contrôle adaptées. Le critère de notification est « la présence d'IgM anti-VHA dans le sérum ».

### B.1.1.2 Centres nationaux de référence (CNR)

Trois CNR contribuent à la surveillance épidémiologique des virus entériques à transmission alimentaire ou hydrique : le CNR des virus entériques, le CNR des entérovirus, le CNR des hépatites à transmission entérique (virus des hépatites A et E) (<http://www.invs.sante.fr/display/?doc=surveillance/cnr/index.htm>). Actuellement, parmi les infections dues aux différents virus transmis par l'eau et les denrées alimentaires, seules les infections à entérovirus font l'objet d'une surveillance spécifique, basée sur un réseau de laboratoires de virologie coordonné par l'Institut de veille sanitaire (InVS) en collaboration avec le Centre national de référence des entérovirus. Les CNR des hépatites A et E, et des virus entériques, ont essentiellement un rôle d'expertise, et assurent l'identification et le typage des souches. Ils peuvent jouer un rôle d'alerte, en signalant des phénomènes anormaux qu'ils constatent ou qui leur sont signalés (cas groupés, etc.) et contribuent à l'investigation des épidémies.

Les signaux générés par ces systèmes sont notifiés à l'InVS qui les investigate en collaboration avec les DDASS et Cellules inter-régionales d'épidémiologie (Cire) concernés.

Ces systèmes qui recensent des cas confirmés sont très spécifiques mais peu sensibles et peu réactifs. Ils sont peu sensibles car les cas « confirmés » ne représentent qu'une faible partie, variable suivant l'agent pathogène, des cas infectés et malades dans la population générale. Ils sont peu réactifs car il existe un délai souvent important entre la survenue de l'événement contaminant (au niveau du réseau d'eau, de l'aliment) et la détection de l'excès de cas. Ce délai est constitué de délais successifs : durée d'incubation de la maladie, délai de recours aux soins et de demande d'analyse, délai d'analyse, délai d'acheminement des échantillons vers les CNR, délai d'analyse au CNR, et délai nécessaire à l'identification d'un excès de cas ou d'un dépassement d'un seuil.

### B.1.1.3 Réseau Sentinelles

Le Réseau Sentinelles est composé d'environ 1200 médecins généralistes sentinelles répartis sur l'ensemble du territoire métropolitain. Il est développé depuis 1984 au sein de l'unité 444 de l'Inserm, dans le cadre d'une convention associant la Direction Générale de la Santé et l'Institut de Veille Sanitaire. Ce réseau surveille plusieurs maladies infectieuses et syndromes : grippe clinique, rougeole, oreillons, varicelle, hépatites A et B, urétrites masculines, diarrhées aiguës. Une diarrhée aiguë y est définie comme une diarrhée (au moins 3 selles liquides ou molles par jour) récente (datant de moins de 14 jours) motivant la consultation. Une hépatite A est définie par la présence d'anticorps IgM anti-VHA. Entre 200 et 400 médecins généralistes sentinelles, volontaires et bénévoles, répartis sur le territoire français, participent aux activités de surveillance continue du Réseau Sentinelles. Ils communiquent chaque semaine le nombre de cas diagnostiqués ainsi que des informations médicales (signes cliniques, examens complémentaires, etc.) et administratives (sexe, âge, lieu de résidence, etc.) pour chaque patient atteint d'une des maladies surveillées. Des incidences départementales, régionales et nationales au cours d'une unité de temps (semaine, mois, trimestre, année) sont estimées par extrapolation pour les différentes pathologies étudiées. Ce système permet d'étudier les tendances spatio-temporelles de ces maladies (Flahault *et al.* 2000). Cependant, il ne permet pas, à cause de la faible densité des correspondants, de détecter des cas groupés ou des épidémies localisées. De même, en raison de cette faible exhaustivité et de l'absence de diagnostic étiologique des gastroentérites, il ne permet pas de détecter des cas groupés liés à un pathogène spécifique.

### B.1.1.4 Réseau de surveillance basé sur les services d'urgences

L'InVS coordonne, depuis juillet 2004, un réseau de surveillance basé sur les services d'urgences d'établissements hospitaliers volontaires et informatisés répartis sur tout le territoire. L'objectif de ce système de surveillance est d'analyser le recours aux services d'urgences, sur un plan quantitatif (nombre de patients) et qualitatif (cause médicale du recours selon les codes CIM10, âge des patients, etc.) et de détecter ainsi précocement des « phénomènes inhabituels ». Il permet de suivre les tendances temporelles des pathologies surveillées dont les gastroentérites aiguës. Les données recueillies sont extraites automatiquement, et transmises quotidiennement à l'InVS où elles sont analysées. A la date de novembre 2006, 46 services d'urgence (couvrant 10 % des passages quotidiens aux urgences en France) y participent, mais ce nombre est susceptible d'augmenter rapidement.

Ce système, très réactif, n'est pas conçu pour détecter des épidémies très localisées, comme les épidémies d'origine hydrique. Toutefois, il peut éventuellement contribuer à détecter une épidémie de gastroentérites d'origine hydrique si le secteur géographique concerné est desservi par un des services d'urgence participant (variable en fonction des habitudes de recours aux soins, médecins généralistes ou urgences en 1<sup>er</sup> recours, de la gravité des symptômes).

### B.1.2 Notifications spontanées

La détection des cas groupés et d'épidémies nécessite la collaboration des médecins, des biologistes ou des pharmaciens qui notifient rapidement à la DDASS de leur département les cas groupés d'une pathologie similaire (gastroentérite, hépatite ou autre pathologie) qu'ils identifient.

Ces notifications spontanées (non encadrées par des systèmes de surveillance pré-établis) correspondent à des événements considérés comme anormaux par les personnes à l'origine du signalement. Elles peuvent être :

- de différentes natures : excès de cas de GEA ou d'hépatite dans la population générale, absentéisme scolaire anormalement élevé, augmentation de ventes d'anti-diarrhéiques, etc. ;
- d'origine variée : acteurs du système de soins (médecins libéraux ou hospitaliers, biologistes pharmaciens, etc.) ou non (particuliers, élus, etc.) ;
- et adressées à différentes structures : DDASS mais aussi mairies, exploitants des réseaux de distribution.

Du fait de sa diversité et de sa souplesse, cette modalité de signalement est potentiellement sensible et précoce pour détecter notamment des épidémies d'origine hydrique. Elle sera d'autant plus performante que les acteurs du signalement seront informés de l'intérêt de celui-ci et de ses modalités.

### B.2 Détection de la présence virale dans l'eau de consommation ou les denrées alimentaires

Devant l'absence de recherche réglementaire spécifique des agents viraux dans l'eau et les aliments, la détection de présence virale est relativement rare. Les signaux indiquant la possibilité de contamination virale sont le plus souvent aspécifiques : critères microbiologiques non conformes, mais aussi, pour l'eau, la survenue d'un accident d'exploitation, les plaintes de la population (turbidité, qualité gustative). Le rôle de ces signaux aspécifiques pour détecter des situations d'alerte est à analyser en fonction de la situation locale. Par exemple, l'intrusion massive d'eau usée dans le réseau d'eau potable sera le plus souvent considérée comme une alerte. Par contre, une panne de chloration, incident souvent banal, est à analyser en fonction de sa durée et de la qualité microbiologique de l'eau à traiter. La spécification des critères d'alerte concernant l'eau de distribution devrait se faire localement même si une trame générique peut être proposée. Ce travail pourrait faire partie de la démarche d'évaluation des risques (techniques HACCP, AMDEC...) que doivent entreprendre les producteurs pour chaque installation de production ou d'adduction d'eau potable. Un guide de détection et d'investigation d'épidémie d'origine infectieuse liée à l'eau de distribution, est actuellement en cours de rédaction par un groupe de travail coordonné par l'InVS, et propose une conduite à tenir pour la détection et l'investigation de ces signaux.

Avec le développement des techniques pour la détection des virus dans l'eau et dans les denrées alimentaires, et notamment des techniques moléculaires de RT-PCR et de PCR, il est probable que la recherche de virus, notamment dans des aliments, soit plus fréquemment réalisée et que la détection devienne plus fréquente. Toutefois, la détection isolée de génome dans une de ces matrices peut être un signal mais n'indique pas de situation d'alerte car elle ne permet pas de témoigner du caractère infectieux du virus mis en évidence. Ces recherches jouent donc un faible rôle dans la détection de situations d'alerte, et nécessite, pour leur interprétation, des investigations environnementales, microbiologiques et épidémiologiques (cf. logigramme, Question 3).

## C. Méthodologies d'investigation

L'investigation des épidémies a un double objectif :

- celui d'identifier rapidement le ou les agents causaux, l'origine et la source de l'épidémie et de proposer des mesures de contrôle et de prévention adaptées pour enrayer sa progression ;
- celui d'améliorer les connaissances épidémiologiques. En effet, les investigations d'épidémies contribuent à mieux connaître les caractéristiques clinico-épidémiologiques des infections en cause, les relations entre d'éventuels hôtes, le ou les agents causaux et l'environnement, les facteurs de risque et à déterminer les doses infectantes. Ces informations contribuent à l'estimation quantitative du risque et à orienter les mesures de prévention pour éviter l'apparition de nouveaux épisodes.

L'investigation des cas groupés et des épidémies comporte classiquement trois composantes : (i) une investigation épidémiologique qui permet d'identifier la source et le véhicule de l'épidémie, (ii) une investigation environnementale orientée par les résultats de l'investigation épidémiologique qui permet d'identifier l'origine de la contamination de la source de l'épidémie et (iii) une investigation microbiologique (recherche de l'agent en cause chez les patients et dans la source ou le véhicule suspecté, identification moléculaire et comparaison des souches isolées chez l'homme et dans la source hydrique, environnementale ou alimentaire).

## C.1 Investigation épidémiologique

### C.1.1 Détection d'un excès de cas d'une même pathologie

L'investigation épidémiologique comporte les étapes habituelles suivantes :

- affirmation de l'épisode épidémique qui consiste à vérifier que l'excès de cas détecté est réel ;
- confirmation ou détermination de l'agent pathogène en cause. Dans le cas d'épidémies de gastroentérite d'étiologie non identifiée, une recherche des agents pathogènes viraux, bactériens et parasitaires est réalisée sur un échantillon de selles de patients ;
- définition et recensement des cas dans une zone géographique et une période de temps déterminée, auprès des médecins de ville et hospitaliers ou de la population considérée comme potentiellement exposée ;
- enquête exploratoire auprès des cas identifiés recueillant à l'aide d'un questionnaire standardisé les expositions à risque au cours de la période d'exposition supposée (déterminée en fonction des dates de survenue des cas et de la durée d'incubation de la maladie en cause) visant à rechercher une exposition commune aux cas ;
- organisation des données en termes de temps, de lieu et de caractéristiques individuelles.

Cette première phase descriptive permet de générer des hypothèses sur la source de l'épidémie. Ces hypothèses sont ensuite testées à l'aide d'enquêtes analytiques de type :

- **cas-témoin** : comparaison d'un groupe de cas (malades) et de témoins (non malades) en ce qui concerne l'exposition à un facteur de risque donné (par exemple eau de distribution) ;
- ou **cohorte** : comparaison de la proportion de malades parmi les personnes exposées à un facteur de risque donné, à la proportion de malades parmi les non-exposées.

Dans les deux types d'étude, des personnes malades et non malades sont interrogées à l'aide d'un questionnaire standardisé orienté par les résultats de l'enquête exploratoire, sur les expositions à risque au cours de la période d'exposition. Ces investigations sont habituellement réalisées par les médecins inspecteurs de santé publique des DDASS avec l'appui si nécessaire des épidémiologistes des Cire ou de l'InVS. Pour les TIAC, un guide d'investigation détaillé et un logiciel pour l'investigation et la gestion sont à la disposition des investigateurs (logiciel WinTIAC version 1.6, 2004). La révision du guide et le développement d'une version 2 de WinTIAC seront réalisés au cours de l'année 2007. Le guide pour la détection et l'investigation d'épidémie d'origine infectieuse liée à l'eau de distribution, actuellement en cours de rédaction, détaille les différentes étapes de la détection et des investigations. Pour l'hépatite A, un groupe de travail coordonné par l'InVS révisera, en 2007, le guide d'investigation de 1996. (Begue *et al.* 1996).

### C.1.2 Mise en évidence d'un ou plusieurs agents viraux dans de l'eau de consommation ou sur un aliment

Dans cette situation, la première étape a pour objectif de déterminer si la contamination détectée est à l'origine d'un excès de cas de pathologie causée par le(s) agents identifié(s) (cas à définir au préalable, le plus souvent en situation exploratoire, il peut s'agir de recenser les cas de gastroentérites, d'hépatite, etc.) dans la population exposée. Elle consiste à recenser les cas auprès des médecins libéraux et hospitaliers suivant la même méthodologie que celle décrite précédemment. La période et la zone géographique de recherche sont déterminées par la connaissance du circuit de distribution de l'eau ou de l'aliment contaminé et de la période supposée de contamination. Si un excès de cas est détecté, les étapes ultérieures sont celles de l'investigation épidémiologique décrites précédemment. Le diagnostic devra être confirmé en recueillant les résultats des examens déjà réalisés et en demandant aux médecins de faire pratiquer des examens pour les patients consultant pour la pathologie concernée (gastroentérite, hépatite, etc.). S'il s'agit d'une contamination de l'eau de distribution, les analyses chez les patients doivent rechercher les principaux agents bactériens, viraux et parasitaires car les précédentes épidémies survenues en France liées à la consommation d'eau de distribution étaient dues à plusieurs agents pathogènes d'origine fécale (Gofti-Laroche et Schmitt 2004 ; Cournot *et al.* 2000 ; Di Palma *et al.* 2001) .

## C.2 Investigation environnementale

L'investigation environnementale a pour objectifs d'identifier les causes de la contamination de l'eau ou de l'aliment et de prendre les mesures spécifiquement adaptées pour mettre fin à l'épisode en cours et éviter l'apparition de nouveaux épisodes. En cas d'épidémie liée à la consommation d'eau de distribution, elle comporte :

- un recueil d'information sur le captage et le circuit de distribution de la zone de distribution : description de la ressource et du captage ; méthodes de traitement de l'eau ; zone de distribution et taille de la population

## Question 7

concernée ; identification d'anomalies chroniques ou récentes au niveau du captage, du traitement de la distribution (par exemple constatation d'une turbidité importante); existence de changements récents dans le captage ou le traitement ; analyse des plaintes recensées auprès de la Mairie, des producteurs ou de la DDASS, historique des analyses : indicateurs fécaux, turbidité, dosages de chlore résiduel ; comportement hydraulique du réseau de distribution (est-il possible que de l'eau contaminée soit encore dans le système de distribution ?) ;

- des prélèvements pour la recherche des micro-organismes à différents niveaux : ressource, étapes de traitement et eau produite ; ces prélèvements doivent faire l'objet d'une analyse bactériologique, virologique et parasitologique pour identifier des contaminations multiples ;
- une recherche des facteurs de risque de contamination selon les résultats des investigations précédemment décrites avec par exemple :
  - un recueil d'information sur l'environnement du captage : nature des sols, présence de troupeaux, avec réalisation de prélèvements environnementaux ou chez les animaux,
  - une étude de pluviométrie.

Ces investigations sont habituellement réalisées par le producteur d'eau en collaboration avec les services « Santé-Environnement » des DDASS.

En cas d'épidémie liée à la consommation d'un aliment ou d'eau embouteillée, l'enquête vise d'abord à retracer l'origine du produit et les lieux de production et d'éventuels lieux de stockage et/ou transformation. La suite de l'enquête sera orientée par l'agent et l'aliment en cause. Par exemple, en cas d'hépatite A liée à la consommation d'huîtres, l'enquête étudiera surtout les possibles sources de contamination dans les lieux de production et de stockage des huîtres. En cas de TIAC à Norovirus ou au virus de l'hépatite A, l'enquête investiguera non seulement l'origine des produits et une éventuelle contamination à la production ou lors du transport ou stockage, mais également la possibilité d'une contamination lors de la manipulation de l'aliment par une personne excrétrice du virus.

## D. Laboratoires impliqués

### D.1 Pour les analyses dans l'eau de distribution

On distingue :

- les laboratoires agréés par le Ministre chargé de la Santé au titre du contrôle des eaux, tels que définis à l'article R.1321-21 du Code de la santé publique (CSP) ;
- les laboratoires réalisant les analyses de surveillance des eaux destinées à la consommation humaine en vue :
  - de substituer des analyses du contrôle sanitaire par des analyses de surveillance pour les eaux fournies par un réseau de distribution,
  - de compléter les analyses du contrôle sanitaire pour les eaux mises en bouteilles ou en conteneurs ;
- les laboratoires sous astreinte de fonctionnement du réseau national pilote de laboratoires chargés des analyses de la qualité des eaux spécialisés dans la recherche des agents de la menace terroriste, qui sont chargés d'intervenir en cas d'alerte, quelle que soit l'origine de la pollution, accidentelle ou volontaire. Ces laboratoires sont chargés d'effectuer les prélèvements et les analyses, en dehors des heures habituelles de fonctionnement des laboratoires agréés pour le contrôle sanitaire des eaux ou pendant les heures ouvrables en complément de ces derniers s'ils ne possèdent pas les compétences et/ou les équipements nécessaires ;
- les laboratoires n'entrant pas dans le cadre des définitions ci-dessus mais dont les compétences et la qualification reconnues les ont amenés à se voir confier des analyses microbiologiques dans le cadre d'études ou de surveillance pour des paramètres qui ne figurent pas dans l'arrêté du 11 janvier 2007.

### D.2 Pour les analyses sur les denrées alimentaires

Les voies différentes de contamination des matrices alimentaires par des virus entériques humains et la complexité des méthodes de recherche virale conduisent à distinguer deux groupes de denrées : les coquillages d'une part, et les denrées végétales et autres denrées d'autre part.

Les coquillages sont susceptibles d'être contaminés au moment de leur culture ou de leur stockage dans le milieu marin naturel exposé aux pollutions fécales (cf. **Question 4**). Les virus sont alors présents à l'intérieur des organes digestifs des mollusques et impliquent pour leur recherche des techniques de broyage, d'élution, de purification et de concentration virale (cf. **Question 3**).

Les denrées végétales et les autres matrices, telles que les produits traiteurs, sont contaminées en surface soit par manipulation lorsque des personnes infectées ne respectent pas les mesures d'hygiène, soit par l'utilisation d'eau souillée (cf. **Question 4**). Les méthodes d'analyse virologique ne recourent pas au broyage mais à des lavages suivis de concentrations (cf. **Question 3**).

Ces protocoles de traitement des échantillons se distinguent également de ceux décrits pour l'eau de boisson, basés sur d'importantes phases de concentration des virus en suspension (cf. **Question 3**).

Aujourd'hui, les protocoles de détection des virus dans les aliments font encore l'objet de travaux de recherche afin de proposer à la normalisation, des méthodes robustes et répondant aux exigences de sensibilité, spécificité, reproductibilité, répétabilité. Les techniques de biologie moléculaire associées aux processus d'analyse évoluent elles aussi. Il n'existe donc pas encore de laboratoire de première intention (c'est-à-dire susceptible d'effectuer des analyses en routine) mais uniquement des équipes de scientifiques qui ont acquis une expertise dans le cadre de projets de développements méthodologiques ou d'études environnementales financés par les ministères en charges de la recherche, de la santé et de l'agriculture (Tableau 42).

**Tableau 42 : liste des principales équipes françaises ayant développé une expertise en virologie des aliments sur la base de leur implication dans des projets de recherche, et ayant participé à des expertises lors de situations d'alertes sanitaires au cours de la période 1998-2005**

Établissement ou Instituts	Statut	Matrice alimentaire	Principaux projets associés
ADRIA Normandie	Centre technique Agroalimentaire Association loi 1901	Tout aliment (eau, coquillages, fruits et légumes)	ACTIA RA 05.7
Afssa Maisons-Alfort	Établissement public administratif	Eau, fruits et légumes	Aliments-qualité-sécurité (R01/04 et R98/18) CEN/TC275/WG6/TAG4 ACTIA RA 05.7
CHU de Nantes	Établissement public de santé	Fruits, salades	Aliments-qualité-sécurité (R01/04 et R00/05)
Faculté de Médecine et Pharmacie de Clermont-Ferrand	Établissement public d'enseignement supérieur	Toutes matrices alimentaires	Aliments-qualité-sécurité (R01/04 et R98/18)
IFREMER Nantes	Établissement public d'Intérêt Commercial	Coquillages	Virus Safe seafood (6ème PCRD) Event (6 <sup>e</sup> PCRD) CEN/TC275/WG6/TAG4
Institut Pasteur de Lille	Fondation reconnue d'utilité publique	Tout aliment (eau, coquillages, fruits et légumes)	Aliments-qualité-sécurité (R01/04 et R00/05) ACTIA RA 05.7
Centre Européen d'Expertise et de Recherche sur les agents Microbiens (CEERAM), Nantes	SAS	Tout aliment (eau, fruits et légumes, coquillages)	CEN/TC275/WG6/TAG4
Laboratoire de chimie, physique et microbiologie pour l'environnement de Nancy UMR 7564 CNRS – UHP Nancy - Faculté de pharmacie	Établissement public	Eau, fruits	ACTIA RA 05.7 VIROBATHE 6 <sup>e</sup> PCRD

Les établissements de statut privé sont généralement associés, par les professionnels, à des autocontrôles ou à l'évaluation spécifique des processus industriels de production. Les conflits d'intérêts forment parfois une entrave aux collaborations avec le secteur public. Toutefois, l'exploitation de centres d'intérêts communs bénéficie généralement aux deux parties et mérite donc d'être stimulée par le renouvellement d'appels à projets de recherche transversale.

## Question 7

Les établissements de statut public sont sollicités par les pouvoirs publics afin de contribuer aux investigations virologiques sur des denrées impliquées dans des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) ou suite à des alertes nationales voire européennes. Le mandat de l'IFREMER, nommé Laboratoire national de référence (LNR) pour l'étude des bactéries et des virus dans les coquillages, élargit son champ d'implication. Il serait cependant nécessaire qu'un autre établissement puisse ainsi être reconnu dans le domaine des denrées végétales et des plats traiteurs. Ceci légitimerait et stimulerait les actions de diffusion méthodologique, de production de réactifs de référence, de réalisation d'essais inter-laboratoires, de contre-expertises analytiques et de production d'avis sur des plans de contrôle ou de surveillance. Autant de missions normalement assumées par un laboratoire de référence.

Dans les situations de TIAC, les symptômes évoqués par les malades ne permettent pas toujours d'orienter clairement l'origine étiologique de troubles digestifs. D'autres pathogènes (bactéries ou parasites) et des contaminants (toxines bactériennes, phycotoxines diarrhéiques) peuvent également provoquer des syndromes proches de ceux créés par les virus entériques. De plus, lors d'une alerte sanitaire, associée à une dégradation globale de la qualité sanitaire (pollution fécale), différents pathogènes peuvent être véhiculés par l'alimentation. Il est donc fondamental que les autorités sanitaires reçoivent des données issues des laboratoires experts en virologie mais aussi en bactériologie, parasitologie, toxicologie... La notion d'un laboratoire coordinateur pour chaque catégorie de matrices alimentaires, mais aussi pour l'eau qui peut également être vectrice de différents contaminants, prend alors toute son importance. Ces laboratoires associés à la coordination doivent avoir acquis une connaissance suffisamment transversale, tant sur les dangers que sur la filière alimentaire, afin de produire aux autorités des synthèses descriptives des phénomènes de contamination et ainsi contribuer à une appréciation précise du risque sanitaire.

L'expertise scientifique et l'appui technique exercé par les laboratoires experts s'appuient sur des collaborations entretenues avec les Centres nationaux de référence (CNR) qui sont, dans le domaine de la santé, le pendant des LNR du secteur de l'alimentation. Les CNR comme les laboratoires médicaux rencontrent aussi des difficultés méthodologiques et développent des bases de données sur les agents pathogènes en circulation dans la population humaine. Les échanges sont donc profitables aux entités travaillant sur les mêmes pathogènes. De plus, l'harmonisation des protocoles de caractérisation des virus (ou de tout autre pathogène) entre les laboratoires chargés des aliments ou de l'eau et ceux chargés des prélèvements cliniques, facilite la confrontation des résultats et, dans certains cas, confirme sur le plan microbiologique les résultats d'enquêtes épidémiologiques. Les données environnementales acquises par l'étude des aliments étayent également les hypothèses d'une émergence de nouveaux dangers. Une harmonisation entre laboratoires européens, voire internationaux, présente enfin des avantages similaires mais étend, hors des frontières, la vision de l'écologie des virus entériques humains.

### E. Mesures de contrôles et de prévention

La nature des mesures de contrôles et de prévention et le moment de leur mise en œuvre sont déterminés en fonction des résultats des investigations et doivent être adaptés à la situation locale et décidés dans la mesure du possible en collaboration entre les différents partenaires concernés. Différents types de mesures complémentaires sont envisageables : s'il s'agit d'une contamination de l'eau de distribution : information de la population exposée sur le risque lié à la consommation d'eau et sur les mesures de prévention individuelles, mesures au niveau de la distribution et du captage (prélèvements d'échantillons, analyses), intervention sur les installations (purge du réseau, modification de traitements), alerte des utilisateurs spécifiques (dialyse, production de produits alimentaires ou pharmaceutiques). S'il s'agit d'une contamination d'une denrée alimentaire ou d'eau embouteillée : retrait du produit concerné, et le cas échéant rappel du produit avec information de la population exposée sur le risque lié à la consommation de l'aliment concerné et sur les éventuelles mesures de prévention individuelles (exemple traitement thermique-cuisson de l'aliment), mesures au niveau de la production en fonction de l'enquête environnementale.

Au cours de ces dernières années, des pôles de compétence de sécurité alimentaire départementaux qui réunissent les représentants de la DDCCRF, la DDSV et la DDASS se sont mis en place. Au sein de ces pôles les circuits d'information et d'alerte entre ces différents représentants ont été déterminés et les différentes tâches d'investigation, de mesures de contrôle et de prévention ont été réparties.

L'investigation des épidémies françaises récentes a montré que la réponse rapide et efficace à une situation de contamination avérée du réseau d'eau de distribution publique ou d'épidémies de gastroentérites d'origine hydrique nécessiterait de développer au niveau départemental un partenariat à compétences multiples. Ceci passe dans un premier temps par l'identification de l'ensemble des partenaires intervenant à différents niveaux : production, distribution de l'eau, alerte, investigation épidémiologique, analyses microbiologiques et para-

sitologiques (au niveau des selles, de l'eau, de l'environnement), gestion, etc. Une équipe multidisciplinaire (producteurs, distributeurs d'eau, médecins libéraux et hospitaliers, médecins inspecteurs de santé publique (MISP), CIRE, ingénieurs sanitaires (IGS) de la DDASS, microbiologistes, gestionnaires, etc.) pourrait ensuite être constituée. Elle aurait pour missions : (i) de déterminer un protocole adapté aux situations locales précisant les modalités de notification de contamination ou d'excès de cas ; (ii) d'informer la population ; (iii) de coordonner les investigations, les mesures de contrôle et de prévention ; (iv) de décider de la reprise de la distribution en conditions normales.

## **F. Conditions du retour à la normale**

## **Question 7**

Il n'existe pas, à ce jour, d'indicateur direct et spécifique permettant d'attester de façon opérationnelle de l'absence de risque d'infection par virus entérique d'un aliment ou de l'eau de distribution.

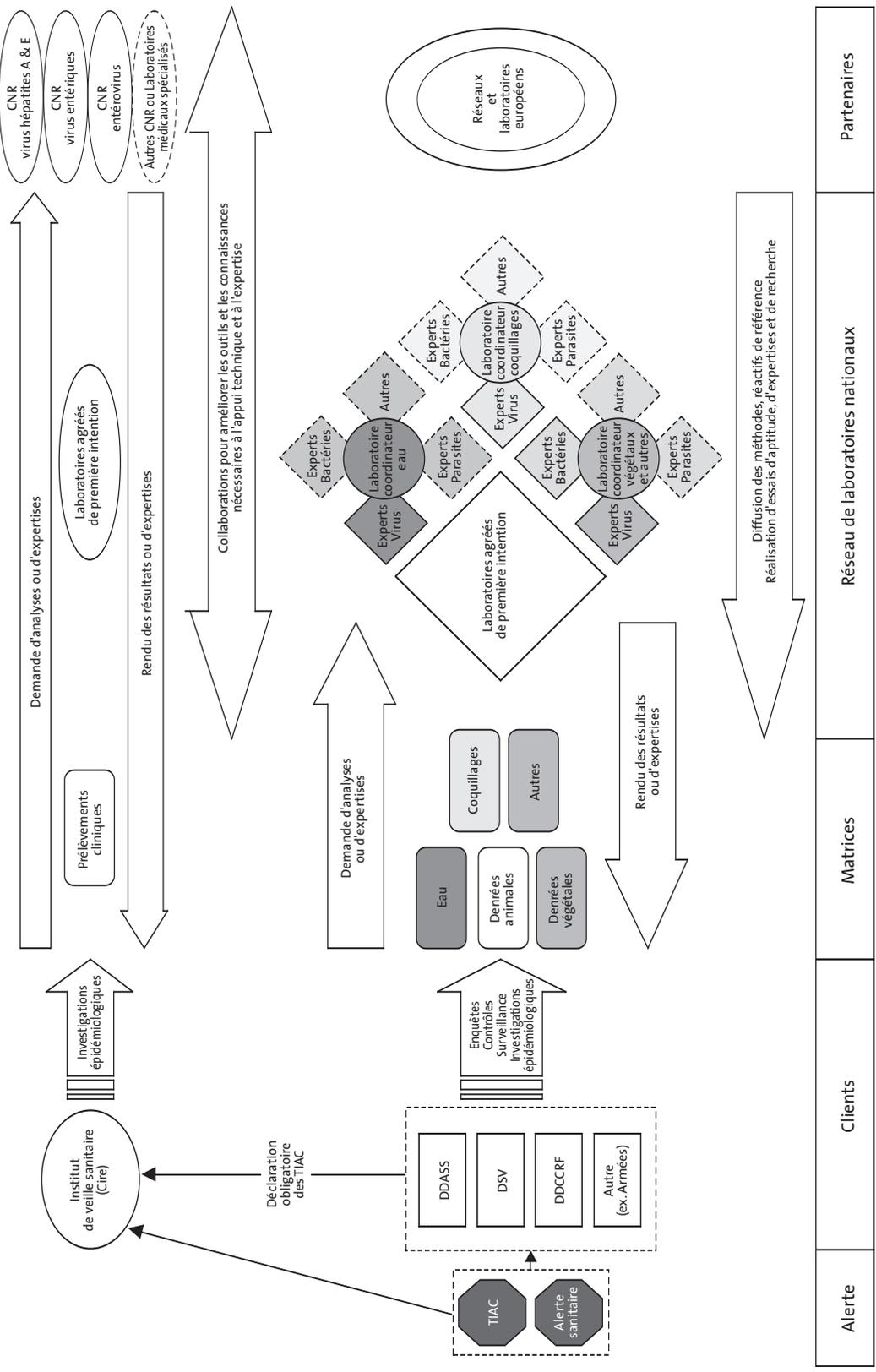
Il convient de déterminer les conditions du retour à la normale dans chaque situation. Pour ce faire, il devrait être tenu compte du fait que :

- la ou les causes de la contamination ont été identifiées, et éliminées ;
- des mesures de contrôle appropriées ont été mises en place ;
- des résultats des analyses effectuées et de la mise en œuvre effective des mesures techniques décidées.

Une surveillance renforcée, permettant la détection précoce de la survenue d'éventuels cas humains, doit être maintenue lors de la réouverture d'un système de distribution d'eau ou la remise sur le marché d'aliments à l'origine de la survenue de cas humain. En outre, des indicateurs de l'efficacité des mesures de contrôle mises en place (chloration, mesures d'hygiène...) doivent être suivis.

**Question 7**

**Figure 10 : réseau de laboratoires d'analyse virologique des aliments et de l'eau**



NB : clients = demandeurs

## G. Conclusions

Le groupe de travail recommande la prise en compte du risque viral devant toute infection digestive collective d'origine alimentaire ou hydrique, prouvée ou suspectée. Ceci doit déboucher systématiquement sur la recherche des virus d'intérêt dans les selles ou autres liquides biologiques humains, et dans l'aliment ou l'eau suspecté(e). En effet, la détection du virus dans ces prélèvements peut être le seul critère permettant d'affirmer l'étiologie virale de l'épidémie.

La recherche du virus dans les aliments et l'eau doit être réalisée précocement ; pour cela, elle doit reposer sur un réseau de laboratoires experts pour l'analyse virologique dans les aliments et l'eau. Ce réseau doit être coordonné par un laboratoire de référence pour chaque matrice alimentaire d'importance ainsi que pour l'eau.

Une réponse rapide à une situation épidémique d'origine hydrique et alimentaire nécessite au niveau départemental un partenariat à compétences multiples. Cette équipe multidisciplinaire (pôle de compétence de sécurité alimentaire pour l'investigation des TIAC) ayant pour missions : (1) de déterminer un protocole adapté aux situations locales précisant les modalités de notification de contamination ou d'excès de cas ; (2) d'informer la population ; (3) de coordonner les investigations et les mesures de contrôle et de prévention ; (4) de fixer les conditions du retour à la normale et décider de la reprise de la distribution. Le groupe souligne que la transmission d'informations vers les populations concernées lors de tels épisodes est essentielle.

## Question 7

### Question 7

**Décret n°99-363 du 6 mai 1999** fixant la liste des maladies faisant l'objet d'une transmission obligatoire de données individuelles à l'autorité sanitaire et modifiant le code de la santé publique (troisième partie : Décrets).

**Décret n°2005-1395 du 10 novembre 2005** modifiant la liste des maladies faisant l'objet d'une transmission obligatoire de données individuelles à l'autorité sanitaire ; J.O. n° 263 du 11 novembre 2005 page 17704.

**Flahault A, Massari V, Valleron A, Garcia A, Dorléans Y. 2000.** Sentinelles, surveillance épidémiologique du Réseau Sentinelles. Janvier-décembre 2000 Rapport INSERM. 75p.

**Haus R, Delarocque-Astagneau E, Valenciano M, Vaillant V. 2002.** Cas d'hépatite A en collectivité signalés aux Ddass, bilan des investigations et des recommandations. BEH 2000 : 49 : 245-246.

**Cordeiro E, Delarocque-Astagneau E, Vaillant V. 2003.** Évaluation du système de surveillance pilote de l'hépatite A, France 2001. Institut de Veille Sanitaire, octobre 2003, 1-46.

**Cournot M, Hemery Ch, Gallay A. 2000.** Épidémie de gastro-entérites à germes multiples liée à la consommation de l'eau de distribution, Gourdon, Lot, août-septembre 2000. Institut de Veille Sanitaire, juin 2001 : 1-46.

**Di Palma M, Carbonel S, Beaudreau P, Checlair E, Gallay A. 2003.** Épidémie de gastro-entérite à *Cryptosporidium*, Dracy-le Fort, Saône et Loire, septembre 2001. Institut de Veille sanitaire, juin 2003 : 1-72.

**Gofti-Laroche L, Schmitt M. 2004.** Épidémie de gastro-entérites liée à la pollution du réseau de distribution d'eau potable de la commune de Divonne-les-Bains, Ain (01), Août-Septembre 2003. Cire Rhône – Alpes - Auvergne, 2004, p1-48.

**Logiciel WinTIAC version 1.5. 2004.** Application d'analyse et de gestion des maladies d'origine alimentaire. Institut de veille Sanitaire.

**Institut de Veille sanitaire. 2006.** Guide pour la détection et l'investigation d'épidémie d'origine infectieuses liées à l'eau de distribution. Guide en cours de rédaction.

**Begue P, Bernuau J, Couroucé A-M, Desenclos J-C, Cabo B, Goudeau A, Julien A-M, Tirard V. 1996.** La prévention de la transmission du virus de l'hépatite A en situation épidémique. BEH 1996 50:219-225.

**Question 8 : Quels sont les résultats de l'analyse des publications dans le domaine de l'appréciation quantitative des risques alimentaires liés aux virus ?**



## Question 8 : Quels sont les résultats de l'analyse des publications dans le domaine de l'appréciation quantitative des risques alimentaires liés aux virus ?

Responsable du sous-groupe : Mme Thébault  
Membre du sous-groupe : Mme De Valk

### Question 8

#### Résumé de la Question 8

L'analyse des publications dans le domaine de l'appréciation quantitative des risques (AQR) répond à différents objectifs. Le premier est d'évaluer la fiabilité et la robustesse des résultats obtenus par ces approches, notamment au regard des hypothèses formulées et qui servent parfois de normes sur le plan international. Le second objectif est d'identifier les données qui ont été utilisées par ces approches AQR et les facteurs qui ont été pris en considération ou non. Le troisième objectif est un objectif prospectif : à quels exemples de questions de gestion du risque les approches AQR virus/aliments peuvent-elles répondre, quel contexte faut-il définir (population étudiée, virus), comment pourrait être construit un modèle d'AQR satisfaisant sur le plan méthodologique, sur quel indicateur sanitaire, quelles seraient les données disponibles en France et lesquelles font le plus défaut ? Le plan de l'analyse suit la démarche classique de l'approche quantitative des risques en microbiologie des aliments. L'évaluation de l'exposition montre que le principal défaut des approches AQR dans le domaine viral est lié au manque de données quantitatives sur la contamination de l'eau ou des aliments par les virus concernés, à savoir les calicivirus, les virus des hépatites, rotavirus, adénovirus... La contamination est alors extrapolée à partir de virus cultivables (entérovirus ou indicateurs bactériens), parfois à l'aide de ratios qui ne sont pas scientifiquement justifiés. Les étapes suivantes, concernant la survie ou l'efficacité de traitements sont aussi, le plus souvent, abordées par extrapolation. Le traitement effectué par les consommateurs n'est, quant à lui, jamais pris en compte, probablement car il est mal évalué. La consommation est prise en compte selon une valeur moyenne ou extrême, selon les approches. À ce propos, il faut noter l'existence de données de consommation françaises qui permettraient de mieux estimer une consommation de la population générale avec la prise en compte de sa variabilité. La caractérisation des dangers montre aussi des limites : afin de mener une approche la plus sécuritaire possible, la relation dose-infection de rotavirus est le plus souvent extrapolée à tous les virus transmissibles par voie alimentaire, avec une simplification de la relation mathématique qui n'est pas réellement satisfaisante (cf. Question 9). La relation dose-infection sur les autres principaux virus d'intérêt, à savoir les calicivirus et les virus des hépatites n'est pas actuellement disponible. Il faudra, de toute façon, envisager de mieux valoriser ou de compléter les résultats d'études épidémiologiques en vue d'apporter les données permettant de valider ou de construire des modèles de relation dose-infection, dose-maladie, dose-mortalité, sur la population générale ou pour des populations plus sensibles. La part attribuable aux aliments et la part attribuable à la transmission inter-humaine peuvent être étudiées par l'investigation épidémiologique, qui peut apporter des éléments à la modélisation. Suivant les méthodes et les critères, on peut noter que la part attribuable aux aliments pour un même virus peut être très différente (ex : norovirus), ce qui pose problème. De nouvelles approches d'AQR permettront de voir l'effet immédiat de la contamination des aliments, mais aussi de comptabiliser les cas liés à une transmission secondaire inter-humaine. On aurait alors les moyens de mieux appréhender l'impact sanitaire d'une contamination alimentaire par ces virus. De nouveaux indicateurs sanitaires sont définis par l'OMS, prenant en compte la sévérité et la durée des symptômes (DALY) ; là encore, les données françaises, qui ne sont pas actuellement disponibles, pourraient valider ou non les valeurs choisies sur le plan international pour tel ou tel virus responsable de gastroentérites. La caractérisation des risques est menée de façon simplifiée, par des approches déterministes, ne permettant pas la mise en évidence de la variabilité ni de l'incertitude. Il n'y a pas non plus d'analyse de sensibilité mise en place ni de réelle validation des modèles existants. Les questions de gestion auxquelles pourraient répondre les approches AQR sont cependant nombreuses, et peuvent être classées par type d'aliment, à savoir eau de distribution, coquillages et végétaux maraîchers (VHE n'est pas envisagé) et en fonction du stade de « la vie du produit ». En effet, il n'est pas possible d'agir sur les consommateurs, sauf en les sensibilisant davantage à l'hygiène et à la préparation des aliments, ou par la vaccination, ce qui ne sera pas abordé ici.

Il est envisageable d'améliorer les modèles d'AQR existants, pour des couples virus/aliments à condition de définir les types de résultats réellement fiables et exploitables pour la gestion du risque.

## A. Aspects généraux

### A.1 Rappels sur l'appréciation quantitative des risques

La démarche proposée vise à analyser les différentes publications portant sur l'appréciation quantitative du risque viral lié à l'alimentation. Cette étude fera appel à un certain nombre de notions qui sont rappelées ci-dessous et qui permettront, dans une certaine mesure, d'évaluer de façon globale dans les différentes publications l'état actuel de la démarche d'évaluation des risques dans le domaine viral/alimentaire.

Le risque est défini comme « une fonction de la probabilité de survenue d'un effet néfaste sur la santé et de la gravité de cet effet résultant de la présence d'un ou de plusieurs dangers dans un aliment » (FAO/OMS 1995, Desenclos 1996).

L'évaluation ou l'appréciation quantitative des risques (AQR) comprend 4 étapes (adaptation au contexte microbiologique/alimentaire) :

- l'identification des dangers (hazard identification) : *identification des agents biologiques pouvant générer des effets néfastes sur la santé et associés à une denrée alimentaire ou groupe de denrées alimentaires à partir de données épidémiologiques, expérimentales ou de surveillance des aliments ;*
- l'estimation de l'exposition (exposure assessment) : *évaluation quantitative de la probabilité d'ingestion d'une certaine quantité d'agents biologiques néfastes via l'alimentation ;*
- la caractérisation des dangers (hazard characterisation) : *évaluation quantitative des effets néfastes sur la santé associés à l'ingestion d'un certain nombre d'agents biologiques ingérés ;*
- la caractérisation des risques (risk characterization) : *évaluation quantitative du risque sanitaire associé à la consommation d'un aliment ou groupe d'aliment, vis-à-vis d'un agent microbiologique, et de l'incertitude y afférente.*

L'identification des dangers ne sera pas abordée dans cette question, dans la mesure où cet élément est déjà abordé dans d'autres parties du rapport. Par contre l'analyse des publications existantes d'AQR dans le domaine viral abordera successivement les trois derniers éléments de l'évaluation quantitative des risques.

L'appréciation quantitative du risque permet d'aboutir, par une approche faisant appel aux probabilités, à une estimation quantifiée du risque, permettant une aide à la décision ou à la gestion de ce risque. On distingue classiquement suivant l'approche et le résultat final, deux types d'évaluations quantitatives de risque (Haas *et al.* 1999).

Le premier type se caractérise par une approche **déterministe**, le résultat obtenu est **ponctuel**, c'est-à-dire qu'à partir d'une valeur moyenne ou extrême on aboutit à une valeur ou à une estimation ponctuelle du risque (**point estimate of risk**) (Haas *et al.* 1999).

Le deuxième type d'AQR fait intervenir une approche **stochastique**, ou probabiliste. Cette méthode fait intervenir des distributions de probabilités de valeurs, et non une valeur en particulier. Le résultat s'exprimera alors sous la forme de distributions et/ou d'intervalles de confiance et/ou de crédibilité des valeurs recherchées (**interval estimates of risk**) (Haas *et al.* 1999). Le résultat est le plus souvent obtenu par simulations de Monte Carlo. Parmi ce second type d'AQR on distingue des AQR **de premier ordre et du second ordre** (Vose 2000).

Pour comprendre la notion de premier et de second ordre, il faut aborder la notion de variabilité et d'incertitude, déjà défini dans le rapport *Cryptosporidium* (Afssa 2002).

De façon générale la **notion de variabilité** d'un paramètre s'applique à la variation naturelle d'un phénomène biologique observé, par exemple la diversité de réponse dans une population donnée, comme par exemple une variabilité de consommation d'un aliment d'un jour à l'autre ou d'un individu à l'autre. Cette variabilité ne pourrait pas être réduite par une autre expérience dans les mêmes conditions ni par un apport d'information (Rai *et al.* 1996, Haas *et al.* 1999, Vose 2000) . Cette variabilité s'exprime par un intervalle de confiance. Elle va cependant dépendre de la population étudiée.

La **notion d'incertitude** est liée à une insuffisance d'information, par exemple quand un paramètre nécessaire à la modélisation n'a pu être estimé qu'indirectement, ou à partir d'un faible nombre de valeurs, comme par exemple les performances d'une technique d'analyse. L'incertitude peut être réduite par tout nouvel apport d'information. L'incertitude se traduit par un intervalle de crédibilité (Vose 2000).

Les AQR **de premier ordre** peuvent faire intervenir dans le résultat la variabilité et l'incertitude des paramètres, mais ne séparent pas variabilité et incertitude dans la présentation du résultat final (Vose 2000). Les AQR **de**

**second ordre** font intervenir la variabilité et l'incertitude qui se rattachent aux paramètres, et montrent à l'aide de distributions de probabilités séparées les effets de la variabilité et de l'incertitude sur le résultat final (Nauta 2000, Vose 2000, Pouillot *et al.* 2003).

L'**analyse de sensibilité** est parfois incluse dans l'analyse de risque. Elle permet de comparer les variables et les paramètres qui ont le plus d'impact sur la variabilité et/ou l'incertitude du résultat final (Vose 2000). Elle permet d'apprécier l'effet attendu, par exemple du gain des connaissances en vue de diminuer l'incertitude sur un paramètre (Vose 2000). Elle permet de repérer des variables qui ont peu d'impact sur le résultat, et d'évaluer éventuellement s'il est pertinent de rajouter ou non de la complexité au modèle (Frey & Sumeet 2002). Cette approche, si elle est possible, permet de hiérarchiser les besoins en terme de recherches et d'études. Cela suppose cependant une estimation « réaliste et précise » de l'incertitude sur les paramètres estimés.

La **validation** d'un modèle repose sur la comparaison entre données observées et prédites par un modèle. Il est nécessaire de confronter le plus possible certaines parties ou certains modules de la modélisation à des données observées (Haas *et al.* 1999). Cela permet de valider ou d'améliorer le modèle le cas échéant. Par exemple, il est possible d'améliorer les connaissances sur les relations dose-réponse par confrontation avec des données épidémiologiques (Gofti-Laroche 2001). Il est parfois possible de confronter les résultats d'une évaluation de risque obtenus avec des données observées quand le résultat s'exprime, par exemple, sur un nombre de nouveaux cas de maladie, par an, sur une population définie (Eisenberg *et al.* 2004).

Il faut aussi rappeler que les résultats d'une évaluation quantitative de risque sont obtenus dans un contexte bien précisé, sur des données particulières obtenues à un certain moment, d'une certaine manière, à un certain endroit, sur un nombre de données limité, à partir d'un certain nombre d'hypothèses qui simplifient forcément la réalité (Haas *et al.* 1999). Ce constat limite l'**extrapolation** des résultats et il n'est pas étonnant d'aboutir parfois à un écart relatif avec l'observation (Haas *et al.* 1999, OMS-OCDE 2003), et de ce fait le résultat est parfois plutôt exprimé dans l'idée d'un ordre de grandeur (Pettersson & Ashbolt 2001, OMS 2003, OMS-OCDE 2003).

L'observation, ou l'estimation épidémiologique, par exemple d'un certain nombre de cas de malades, dans une population, par an, n'est pas d'ailleurs, elle non plus, exempte de biais potentiels. Mais dans ce contexte, et comme pour les autres types de modélisation de phénomènes biologiques, il est important de souligner que les résultats issus d'une évaluation de risque devraient, quand cela est possible, être confirmés ou validés tout ou partie par d'autres sources d'informations, notamment épidémiologiques (Haas *et al.* 1999, OMS-OCDE 2003, Giovannini *et al.* 2004).

Enfin il ne faut pas négliger un autre aspect important des approches AQR. En tant que modélisation probabiliste c'est aussi un **outil de compréhension et de conceptualisation** (Afssa 2004) du risque, et donc aussi un outil de recherche, et d'orientation de celle-ci, tout autant qu'un outil de prévision et d'aide à la décision.

## A.2 Origine et nature des publications

Les publications retenues pour cette analyse concernent les articles qui traitent de l'évaluation quantitative des risques sanitaires liés à la consommation de produits contaminés par des virus. Dans chaque article on va donc disposer d'informations sur les différentes étapes caractérisant une évaluation quantitative des risques : **identification du danger, caractérisation du danger, appréciation quantitative de l'exposition, caractérisation du risque.**

Les publications qui sont analysées ici sont issues de publications scientifiques internationales, venant des revues comme Risk Analysis, Journal of Food protection, Water Research, Water Science Technology, de trois rapports de synthèse internationaux de l'OMS et de différents rapports nationaux (Comité-Santé 2003), voire de parties d'ouvrages (Maul 1991, Haas *et al.* 1999).

## A.3 Objectifs des publications

L'objectif de ces publications est assez diversifié. Il s'agit le plus souvent d'apporter une aide à la prise de décision sur la fixation de seuils tolérables dans l'alimentation et/ou sur l'efficacité attendue des traitements sur la désinfection (Regli *et al.* 1991, WHO 2004). L'objectif peut aussi être l'évaluation de l'importance sanitaire d'un virus (rotavirus et adénovirus) parmi d'autres risques microbiologiques, sur une même matrice (Rose & Sobsey 1993, Crabtree 1997) ou l'appréciation de l'efficacité d'un système de surveillance mis en place (Ranta *et al.* 2001).

Dans les trois précédents objectifs, l'évaluation quantitative des risques est considérée de façon classique comme un outil d'aide à la décision, permettant d'argumenter une mesure de gestion d'application immédiate. La partie conceptualisation du risque est plus ou moins complexe, et plus ou moins bien abordée suivant les études. Cet aspect ressort particulièrement dans la publication sur Poliovirus (Ranta *et al.* 2001), où le modèle analyse le lien

entre différents scénarios d'endémies et d'épidémies dans les populations humaines et l'efficacité du système de contrôle dans les eaux de stations d'épuration, ainsi que dans les publications traitant de la transmission secondaire inter-humaine d'Eisenberg *et al.* (2004, 2005).

#### A.4 Objet des publications

L'approche quantitative implique que la modélisation soit une approximation raisonnable du phénomène étudié, comme pour une approche qualitative, mais aussi que les différentes estimations du modèle reposent sur des données exactes (non biaisées, représentatives du phénomène à expliquer) et suffisamment précises (en quantité suffisante) par rapport à l'information recherchée. Vraisemblablement ce faible nombre de données fiables explique le faible nombre de publications rencontrées dans le domaine de la virologie alimentaire.

Ainsi malgré la diversité des matrices et des virus, on ne dispose que d'un nombre restreint de publications récentes et de couples aliment/virus analysés. Les voies d'expositions concernées sont **l'eau de distribution et de baignade** (quatre publications principales et des rapports), **les coquillages** (deux publications principales), **les salades, carottes, radis** (deux publications principales). Le principal aliment considéré est l'eau de boisson (nombre de publications le plus important). C'est en effet un aliment qui peut concerner un grand nombre de consommateurs, et parmi ceux-ci un nombre croissant de personnes appartenant à des groupes à risque, particulièrement fragiles (Gofti *et al.* 1999). La question sous-jacente est de savoir si le traitement de l'eau est suffisant pour garantir une relative sécurité des consommateurs. Les publications les plus récentes dans le domaine virologique concernent la qualité des eaux d'irrigation et des boues d'épandage pour les cultures vivrières.

Les virus concernés sont principalement les **Rotavirus**, qui servent de référence dans les AQR concernant le virus (on verra pourquoi dans le paragraphe consacré aux relations dose-réponse), et dans une moindre mesure les **Poliovirus**, les **Adénovirus**, les **virus de l'Hépatite A et E**. En fait les Rotavirus sont rarement étudiés pour eux-mêmes, mais extrapolés de façon générale aux virus responsables de gastroentérites.

Tableau 43 : AQR sur virus par voie orale et principales publications de référence

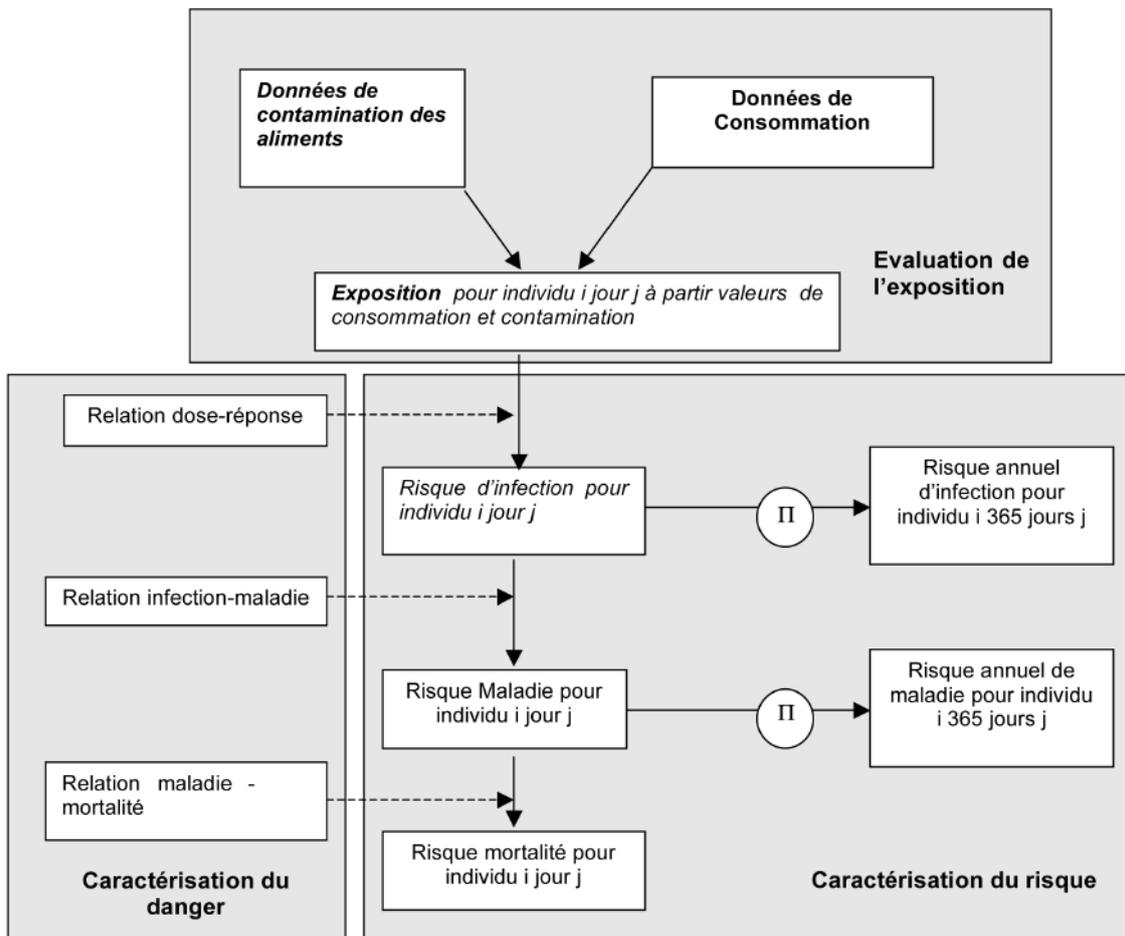
	Eau de distribution	Eau de baignade	Ingestion terre, aérosols	Coquillages	Salades	Radis, Carottes	Concombres
<b>Rotavirus (souvent en tant que référence pour entérovirus)</b>	(Regli <i>et al.</i> 1991, Haas <i>et al.</i> 1993, Gerba <i>et al.</i> 1996b, Gofti-Laroche 2001, WHO 2004)		(Eisenberg <i>et al.</i> 2004)	(Rose & Sobsey 1993)	(Pettersson <i>et al.</i> 2001a) pour entérovirus (Shuval & Fattal 2003)	(Gale 2005)	(Shuval & Fattal 2003)
<b>Poliovirus</b>	(Ranta <i>et al.</i> 2001)						
<b>Adénovirus</b>	(Crabtree 1997)						
<b>Hépatite A</b>				(Rose & Sobsey 1993, Shuval & Fattal 2003)	(WHO 2004)		
<b>Hépatite E</b>				(Shuval & Fattal 2003)			
<b>Coxsackievirus A21</b>			(Brooks <i>et al.</i> 2005)				
<b>Non précisé</b>		(Schernewski & Julich 2001)					

## A.5 Méthodologie utilisée dans les évaluations de risques publiées

La démarche générale développée dans les différents articles AQR virus/aliments et le découpage des différents modules sont rappelés dans le schéma ci-après. Les données de contamination et de consommation permettent d'obtenir une dose moyenne ingérée (ou de calculer l'exposition). Dans la plupart des articles (Regli *et al.* 1991, Rose & Sobsey 1993, Gerba *et al.* 1996a, Crabtree 1997, Shuval & Fattal 2003) cette dose est prise en compte dans une relation dose-réponse pour calculer une probabilité d'infection quotidienne  $P_i$  à partir d'une contamination et d'une consommation données. Le risque quotidien de maladies (ou autre effet sanitaire) est obtenu par multiplication de probabilités. Le risque annuel est obtenu dans ces différents articles par l'équation suivante :  $P(\text{annuel})=1-(1-P_i)^{365}$ . Ceci suppose que le risque est indépendant entre chaque jour avec une distribution de probabilité identique.

### Question 8

Figure 11 : schéma conceptuel des principales évaluations de risques sanitaires publiées dans le domaine alimentaire/viral



Globalement les analyses de risque quantitatives publiées raisonnent sur le risque individuel. Ce risque est modulé selon le type de virus et les caractéristiques des personnes.

La population ciblée par l'AQR est plus ou moins précise, par rapport à une population générale. Mais dans certaines AQR publiées, on distingue des facteurs comme l'âge, le statut immunitaire, la région d'origine. Une personne âgée ou immunodéprimée n'a pas le même risque d'infection, ni la même sévérité de symptômes vis-à-vis d'un certain nombre d'agents infectieux qu'un jeune adulte ou un enfant (Gerba *et al.* 1996a). Les AQR distinguent aussi dans certains cas (approches globales à l'échelle mondiale) la probabilité de l'infection et les conséquences de celles-ci entre les pays développés ou en voie de développement (Gerba *et al.* 1996a, Crabtree 1997, Shuval & Fattal 2003).

## B. Évaluation de l'exposition

### B.1 Données de contamination des aliments et de l'eau de boisson

#### B.1.1 Dans le domaine de l'eau

Les données qui ont servi à estimer le niveau de contamination des aliments viennent soit de données observées, soit sont déduites d'indicateurs, soit ont été formulées comme hypothèse. Dans l'évaluation quantitative des risques sur rotavirus (Gerba *et al.* 1996a), le niveau de contamination de l'eau du robinet a été évalué à partir de deux approches, l'une à partir de données observées dans de l'eau de surface, l'autre à partir de données observées dans de l'eau distribuée.

#### Question 8

Les données publiées sur l'occurrence des rotavirus dans l'eau de surface au niveau mondial, venant aussi bien du Brésil que de l'Afrique du Sud ou du Canada, ont été utilisées pour estimer une valeur maximale dans l'eau de surface servant à l'eau de distribution, soit 40,8 virus/litres, et en considérant une efficacité de traitement de 99,99 % (4 log), ce qui donne une concentration dans l'eau du robinet de 0,004 virus infectieux/L. Les performances ou la comparabilité des outils de détection ne sont pas pris en compte. Cette valeur avait été obtenue au Canada, sur du virus SA-11, détectable par culture cellulaire et ce résultat extrapolé aux Rotavirus, même moins ou non cultivables. Cette approche est considérée comme la plus facile à mettre en œuvre (Dufour *et al.* 2003).

Une valeur publiée de concentration maximale en rotavirus obtenue dans l'eau de boisson entre différents pays a été retenue pour une deuxième simulation. La valeur de 100 virus/L utilisée par Gerba avait été obtenue à Mexico, suite à un accident de traitement de l'eau (Gerba *et al.* 1996b).

(Haas *et al.* 1993) utilise pour son approche AQR, le double d'une concentration moyenne en entérovirus mesurée dans l'eau distribuée dans la région de Montréal (Payment *et al.* 1985). La valeur utilisée pour la simulation de (Haas *et al.* 1993) était de 0,0012 virus/L. La valeur en entérovirus a été extrapolée aux rotavirus, sans justification particulière.

- dans l'évaluation quantitative des risques de (Regli *et al.* 1991) et de l'OMS (WHO 2004), la démarche appliquée visait à l'estimation d'une concentration à atteindre dans l'eau de boisson pour avoir un risque annuel de malades ou d'infections à rotavirus acceptable. Le niveau de contamination a donc été formulé par hypothèse. Cependant des valeurs sont données de l'ordre de 0,01 à 10 000 entérovirus/100 litres d'eau de surface impliquant un niveau de d'abattement de 4 à 9 log (Regli *et al.* 1991) ;
- dans une publication sur adénovirus, les concentrations choisies sont de 1UI/litre et d'1UI/100 litres, ce qui correspondrait au niveau de concentration des entérovirus détectés dans l'eau de boisson (Crabtree 1997). L'auteur estime que cette extrapolation à partir de « virus indicateurs » n'est pas forcément sécuritaire, compte tenu de la résistance particulière des Adénovirus à certains traitements (UV, température). Pour l'eau de baignade, l'auteur considère une concentration de 0,118 à 12,8 MPN/100 litres, valeur observée d'Adénovirus (méthode non indiquée) et publiée au cours d'un programme de surveillance dans la baie de Mamala.

De façon générale c'est la contamination de la ressource en eau avant traitement, et des hypothèses sur l'efficacité de traitement qui sont prises en compte dans l'estimation de la contamination. La contamination est en général extrapolée à partir d'indicateurs. La variabilité de la contamination au cours du temps et de l'espace, la variabilité et/ou l'incertitude sur l'efficacité de traitement ne sont pas prises en compte. Les aspects liés aux performances des techniques de détection sont pris en compte dans la publication traitant de la surveillance du poliovirus dans les stations d'épuration.

#### B.1.2 Contamination dans les stations d'épuration

- Analyse de la publication de (Ranta *et al.* 2001)

L'article prend en considération trois scénarios différents de circulation virale dans les populations humaines. Trois modèles de dynamiques de maladies (endémie, épidémie plus ou moins forte) sont appliqués en vue d'obtenir le taux de personnes infectées dans une grande population. Sur une population donnée, en fonction des différents scénarios, il est possible d'estimer la quantité de virus émise par cette population, et d'estimer le moment de son apparition dans la station d'épuration après l'arrivée du virus dans la population. Le paramètre de délai a pu être estimé grâce à une étude comparant l'arrivée d'un vaccin Polio par voie orale et la détection du virus dans les effluents liquides d'une station d'épuration. La concentration finale en virus tient compte des pertes de virus par l'action du temps et de différents facteurs environnementaux et du volume des effluents de la population (facteur de dilution). L'estimation de ce volume d'effluent tient compte de l'eau consommée par habitant et de l'eau de pluie. Une valeur moyenne de ce volume a été finalement retenue. La concentration

de virus n'est pas constante au cours du temps, et est différente en fonction des différents scénarios de dynamiques de maladie. Il ne s'agit cependant pas de données observées.

### B.1.3 Dans le domaine de la production conchylicole

#### • Analyse de la publication de (Rose & Sobsey 1993)

L'estimation de la contamination virale différencie les zones fermées (baies avec un taux de renouvellement de la masse d'eau peu élevée) et les zones en mer ouvertes, avec une plus grande contamination des zones fermées. Les concentrations en entérovirus, par culture cellulaire, étaient comprises entre 0,2 et 224 PFU/100g avec entre 28 et 63 % d'échantillons positifs dans les zones fermées, et dans les zones ouvertes les concentrations étaient comprises entre 0,3 et 200 PFU/100g avec 9 à 40 % d'échantillons positifs.

La valeur de concentration virale retenue pour l'AQR sur les coquillages est la moyenne arithmétique de quelques zones marines des États-Unis autorisées à la conchyliculture, tenant compte des résultats négatifs obtenus, soit une valeur de 0,2 (résultat obtenu sur les huîtres dans le Mississippi) à 31 PFU/100g de chair de mollusque (résultat obtenu dans l'État de New York sur les huîtres), tous types de virus confondus, à savoir Échovirus type 1, 7, 20, 23, 24 et 27, poliovirus 1 et 2, et des entérovirus non identifiés. Ces valeurs ont été obtenues sur 58 prélèvements au total, en mélangeant les résultats obtenus sur palourdes et huîtres, sans préciser les zones ouvertes et fermées, sans préciser la stratégie d'échantillonnage, notamment la fréquence ou les dates de prélèvements. Finalement c'est la valeur moyenne de 6 PFU/100g qui a servi de référence pour l'estimation du risque d'infection pour tous les virus présents dans les coquillages, notamment le VHA.

#### • Analyse de la publication de (Shuval 2003)

Dans cette publication l'AQR reprend l'estimation de (Rose & Sobsey 1993) pour estimer le risque d'infection par VHA ou VHE. Au cours d'un repas comprenant des coquillages, le risque d'infection est la moitié de celui défini par Rose, en sachant que la quantité de nourriture estimée par Shuval est plus importante que celle définie par (Rose & Sobsey 1993).

### B.1.4 Contamination des salades ou produits végétaux contaminés par irrigation ou épandages

#### • Analyse de la publication de (Pettersen *et al.* 2001b)

Les résultats d'analyses portant sur des concentrations en entérovirus sur des eaux traitées de Californie (99 données positives dont 27 % de résultats négatifs ramenés à la limite de détection) ont été utilisés pour estimer la distribution de probabilité des entérovirus. Deux lois de distribution ont été ajustées aux données observées. Dans ce cas précis, le choix entre ces deux distributions ne semblait pas avoir de conséquences notables sur le résultat de l'estimation du risque. Tous les organismes contenus dans le volume d'eau d'irrigation se retrouvent sur un certain poids de feuille à savoir 10,8 mL/100g de laitue. L'auteur en déduit une concentration en virus/g de salade ;

#### • Analyse des publications de (Shuval *et al.* 1997, Shuval & Fattal 2003)

Il s'agit d'une démarche visant à évaluer des concentrations acceptables d'indicateurs dans l'eau d'irrigation, à savoir des Coliformes thermotolérants fécaux. À partir d'un risque annuel d'infection acceptable de  $10^{-4}$  défini par (Regli *et al.* 1991), en supposant un ratio de  $1/10^5$  entre virus et indicateurs (Shwartzbrod, rapport OMS 1995), la concentration maximale acceptable dans l'eau d'irrigation des salades est de moins de 1 000 coliformes fécaux/100 mL (Shuval *et al.* 1997). En 2003, dans une autre étude, en cas d'irrigation avec de l'eau usée non traitée, l'auteur estime une concentration fécale dans l'eau de  $10^7/100$  mL, et en cas d'irrigation avec de l'eau en accord avec les recommandations de l'OMS, une concentration dans l'eau de  $10^3$  coliformes/100 mL. À partir du ratio  $1/10^5$ , d'une réduction de 3 logs du nombre de virus (survie à la surface des végétaux) les auteurs estiment la contamination des laitues et des concombres. En cas d'irrigation avec de l'eau usée non traitée, un concombre sur 10 000 et une feuille de salade sur 1 000 seraient contaminés par un virus infectieux (Shuval & Fattal 2003) ;

#### • Analyse de la publication de (Gale 2005)

L'approche de Gale vise à comprendre le risque sanitaire posé par l'épandage de boues d'épuration traitées et non traitées sur des cultures susceptibles d'être contaminées par de la terre (radis, carottes). La contamination des effluents non traités en micro-organismes est estimée à 105 000 MPN/kg de poids sec ou  $1,05 \cdot 10^8$  tds<sup>-1</sup> (tons dry solid). Le traitement des effluents considéré dans cette AQR est celui obtenu par des bactéries anaérobies mésophiles. La perte en virus après traitement est extrapolée à partir de résultats obtenus sur poliovirus, en cas de bon et mauvais fonctionnement du système de traitement. L'auteur estime ensuite la diminution de la concentration par dilution (au cours de l'épandage) et par perte de viabilité des virus dans le sol, depuis l'épandage jusqu'à la récolte des légumes du sol. Il estime ainsi le niveau de concentration en virus des sols au moment de

la récolte. L'auteur estime que les légumes-racines comportent 2 % de leur poids en terre potentiellement contaminée. Le lavage réduirait de 90 % la quantité de sol adhérent aux végétaux.

## B.2 Considérations sur la distribution des virus

La variabilité de la contamination traduit l'idée que la contamination n'a pas forcément les mêmes caractéristiques (notamment en moyenne) d'un endroit à l'autre, d'un jour à l'autre. On peut ajuster un certain nombre de lois de distributions de probabilité sur des données de contamination observées. Dans certains cas une partie de cette variabilité de contamination inter-lots pourra être expliquée par un certain nombre de facteurs, comme l'origine géographique de la ressource, la taille de celle-ci (cette connaissance ne réduira pas la variabilité globale du phénomène mais sera explicable). Une étude environnementale ou un programme de surveillance peut apporter des éléments permettant d'estimer cette variabilité.

Cette variabilité n'est généralement pas prise en compte dans les AQR virus/aliments, à l'exception de l'étude de Gale, qui extrapole des résultats obtenus de la contamination d'eau de distribution en *Cryptosporidium* sur rotavirus (Gale 2003).

Pour une contamination donnée, la distribution de cette contamination dans une matrice, par exemple, dans un réservoir d'eau, n'est pas forcément homogène. Cette distribution est souvent considérée comme une distribution aléatoire. Mais, dans le cas des virus, il est plausible que ceux-ci soient présents sous forme d'agrégats, de « clusters » et dans ce cas la distribution ne peut plus être considérée comme strictement aléatoire.

Les connaissances à acquérir pour estimer la distribution des virus en intra-lot, à partir d'une contamination, nécessiteront des études particulières. De façon générale, cette hétérogénéité intra-lots, sauf rares exceptions explicitées ci-dessous, n'est pas prise en compte dans les évaluations de risques liés à l'eau (Regli *et al.* 1991, Gofti-Laroche 2001, Pouillot *et al.* 2004) ou à d'autres matrices (Regli *et al.* 1991). La première question qui se pose, et pas la moindre, est la vérification de l'hypothèse sur la présence ou non d'agrégats, dans tel ou tel type de matrice, et sous quelles conditions physico-chimiques ou de contamination. La deuxième question est d'évaluer comment il est possible de prendre en compte cette hétérogénéité dans une approche d'évaluation de risque quantitative.

Les raisons de la non prise en compte de cette hétérogénéité sont les suivantes :

- comme en convient l'auteur (Regli *et al.* 1991), la distribution de l'agent dans l'aliment intervient dans la formulation de la relation dose-réponse. Ceci est rarement explicité dans les autres publications. En l'absence de prise en compte de cette hétérogénéité, et sous d'autres hypothèses (explicitées dans le paragraphe dose-réponse) la relation dose-réponse (mécaniste), notamment de type exponentiel, peut se simplifier (Haas *et al.* 1999). La prise en compte des agrégats pose des problèmes calculatoires non négligeables dans le calcul de la dose-réponse et du risque d'infection (Haas 2002) ;
- si l'hypothèse de l'existence d'agrégats est fondée, pour pouvoir la prendre en compte, il faudrait aussi disposer de données observées permettant d'estimer les paramètres de lois de distribution (notamment la surdispersion) susceptibles de décrire une situation d'agrégats. Or on dispose de peu de données dans le domaine viral, déjà pour traduire la variabilité de la contamination des ressources ;
- enfin, il convient d'évaluer si la prise en compte ou non d'agrégats aura des conséquences sécuritaires ou non sécuritaires sur le résultat final.

L'interprétation de l'effet de cette non homogénéité sur les résultats d'AQR dépend du paramètre considéré.

Pour le Comité Fédéral Santé (Comité-Santé 2003) du Canada, comme pour (Gale 2003, 2005) **la prise en compte d'une sur-dispersion ou d'agrégats est une hypothèse non sécuritaire pour estimer une moyenne du risque d'infection** à partir d'une dose ingérée, ce qui justifie *a posteriori* les évaluations de risque quantitatives déjà réalisées (modèle de référence dose-réponse bêta poisson de paramètre  $\alpha=0,2$  et  $\beta=20$ ) ; il faut aussi rappeler que dans ces modèles d'évaluation de risque, le plus souvent le risque de maladie n'est pas considéré comme dépendant de la dose ingérée. Pour (Haas 2002), la prise en compte d'une sur-dispersion (ou la prise en compte d'agrégats) est une hypothèse non sécuritaire pour l'estimation du risque moyen d'infection à partir d'une dose moyenne ingérée.

Petterson, dans une approche stochastique sur la contamination de salades dans une parcelle, estime que **la sur-dispersion (ou la prise en compte d'agrégats) sous-estime le risque médian et surestime les probabilités d'infection pour les quantiles extrêmes**, si on compare les résultats à ceux d'une distribution aléatoire (Petterson & Ashbolt 2001). Les détails de cette AQR sont malheureusement mal précisés dans la publication, ce qui rend difficile la vérification du bien-fondé de l'étude. (Maul 1991) estime que la non prise en compte de cette hétérogénéité surestime les capacités de détection d'un système de surveillance, car la probabilité de détection

## Question 8

dans un échantillon donné serait alors surestimée. La prise en compte **d'une sur-dispersion serait non sécuritaire si on souhaite estimer la probabilité de détection d'un système de surveillance**. Cette question est de nouveau abordée dans la Question 9 de façon plus précise.

La **dilution** évoquée par (Gale 2005) pour traduire l'épandage des boues sur les sols ou la dilution d'une contamination dans un milieu aquatique (Ranta *et al.* 2001) sont approchées par une relation déterministe, dans les cas évoqués ci-dessus, par un ratio.

### **B.3 Prise en compte de la survie des virus dans les aliments, des outils de détection, de la préparation des aliments**

#### **B.3.1 Persistance dans l'eau douce**

La survie et l'aspect temporel de la détection sont pris en compte dans la publication sur poliovirus (Ranta *et al.* 2001) et sur Entérovirus (Petterson *et al.* 2001b). Les auteurs considèrent qu'à partir des sources de contaminations humaines, différents effluents convergent vers la station d'épuration, et une charge virale instantanée augmente de façon graduelle. L'auteur propose une distribution gamma afin de décrire le mélange de distribution de formes exponentielles. À la fois pour simplicité du calcul, et parce que la forme de la distribution importe davantage que sa forme fonctionnelle exacte, l'auteur assume que cette distribution de mélange est de la forme  $g(t/\theta) = \theta \exp(-\theta t)$ .

$1/\theta$  est équivalent à une durée d'apparition dans la station d'épuration à partir d'une émission de particule poliovirus. Un exemple est donné grâce à l'étude du devenir d'un litre de vaccin polio déversé dans les effluents d'Helsinki, avec un réseau de traitement de 20 km. Le virus a pu être détecté dans les 24 heures et dans les 3 jours qui ont suivi. L'effet des facteurs environnementaux sur la survie virale a simplement été pris en compte sous la forme d'un pourcentage de perte constante, non dépendant du temps (Ranta *et al.* 2001).

D'autres études utilisent d'autres lois susceptibles de décrire la survie virale au cours du temps. Le facteur  $k_{10}$  décrivant cette survie (en jour<sup>-1</sup>) peut être présenté sous des formes aussi variées que les distributions gaussiennes-inverses, lognormal, weibull, gamma ou beta (Haas *et al.* 1999).

#### **B.3.2 Persistance dans les sols et à la surface des aliments**

La survie des virus sur les feuilles de salades est prise en compte dans l'AQR et suit une relation log-linéaire ( $\log_{10}$ ) avec une pente estimée entre 0,69 jour<sup>-1</sup> ou de 0,47 jour<sup>-1</sup>, puis une pente avec une distribution normale, de moyenne 0,47 jour<sup>-1</sup> et d'écart type 0,03 jour<sup>-1</sup>, (Petterson *et al.* 2001a). La durée de conservation après la dernière irrigation est estimée à 14 jours (Petterson & Ashbolt 2001). D'autres publications donnent des résultats sensiblement différents, sur des salades et des carottes, par des études menées sur bactériophages B40-8 (Petterson *et al.* 2001b). Afin de mener une approche coût-bénéfice, la réduction virale utilisée par (Shuval & Fattal 2003) a été estimée à 3 log, ce qui est considéré comme une approche sécuritaire si on considère l'estimation de (Shwartzbrod 1995).

#### **B.3.3 Persistance des virus dans l'eau de mer et les coquillages**

La survie des virus dans l'eau de mer, selon que les virus sont agrégés ou non sur de la matière organique, a été prise en compte dans une approche AQR traitant de l'eau de baignade (Schernewski & Julich 2001). Prenant le virus Polio 1 comme modèle, et une relation log-linéaire de décroissance, le  $T_{90}$  à 20°C en absence de matière organique a été estimé à 1,5 jours, avec une inactivation totale en 6 jours. En présence de matière organique le  $T_{90}$  a été estimé à 14 jours avec une inactivation totale en 57 jours. La sédimentation liée à la présence de matière organique est cependant responsable de la perte de virus disponible dans la masse d'eau et cette perte a été estimée à 90 %. La survie n'est pas prise en compte dans les AQR traitant de l'ingestion de coquillages.

D'autres travaux bien évidemment existent sur la survie virale (cf. Question 4) et pourraient sans doute apporter des éléments sur l'incertitude et la variabilité qui se rattachent à ce phénomène.

#### **B.3.4 Performances des outils de détection**

Elles ne sont quasiment pas prises en compte dans les AQR publiées concernant des virus, ou non justifiées par des performances réellement mesurées, à l'exception de la publication sur le Poliovirus (Ranta *et al.* 2001).

### B.3.5 Préparation des aliments par le consommateur ou l'industrie agroalimentaire

Elle n'est pas prise en compte dans les AQR publiées. Ceci est parfois justifié par le fait que l'absence de prise en compte d'un abattement à ce niveau est considérée comme une hypothèse sécuritaire.

## B.4 Considérations sur la prise en compte de la consommation

### B.4.1 Consommation d'eau

Suivant la recommandation de l'agence américaine de protection de l'environnement, la consommation totale d'eau du robinet est estimée pour un adulte à deux litres d'eau par jour et pour un enfant à un litre d'eau par jour (Gofti *et al.* 1999). La consommation prise en référence pour établir des recommandations dans l'eau de distribution par l'OMS est de 1 litre d'eau par jour, chiffre correspondant à la part de consommation d'eau utilisée non chauffée (WHO 2004).

La consommation d'eau prise en référence dans les publications est le plus souvent de 2 litres d'eau de boisson par jour (Regli *et al.* 1991, Crabtree 1997, Gale 2003), voire de 4 litres pour décrire une consommation extrême des plus âgés (Crabtree, 1997 ; Gerba, *et al.*, 1996). Pour l'eau de baignade, suivant les études, une valeur de 100 mL a été utilisée pour une baignade ou de 50mL/heure de baignade (Gerba *et al.* 1996b, Haas *et al.* 1999).

La valeur de 2 litres pour la consommation d'eau ne prend pas en compte l'eau qui sera ensuite réchauffée, ce qui surestimerait le risque (Dufour *et al.* 2003). (Haas *et al.* 1993) prenait comme valeur de référence pour l'eau de boisson 1,4 litre/j.

Dans les évaluations de risque quantitatives du domaine viral pour l'eau de boisson, l'analyse a porté sur des scénarios moyens ou extrêmes à partir de consommations estimées le plus souvent aux États-Unis, et seul l'âge a été pris en compte comme un facteur susceptible de décrire des consommations d'eau différentes.

### B.4.2 Consommation de coquillages

L'estimation de la consommation de coquillages a été faite à partir de la ration habituelle de consommation aux États-Unis de 12 ou 6 huîtres sur une journée correspondant à un poids de chair entre 60 et 240 g (Rose & Sobsey 1993). La ration de référence de coquillages consommés crus par un consommateur de coquillages au niveau mondial a été estimée comme suit : la production annuelle estimée par la FAO est de 10 millions de tonnes de coquillages. Parmi ceux-ci, 80 % concernent des espèces pouvant être consommées crues, et 10 % de ces 80 % le seront réellement. Quinze % des 800 000 tonnes représentent de la chair de coquillages. Ces 800 000 tonnes représentant 800 millions de repas à travers le monde, et l'auteur évalue donc la quantité consommée de chair crue de coquillages par repas entre 120 et 150 g (Shuval 2003). Pour une journée de consommation, Haas *et al.* (1999) estime que la quantité de coquillages ingérée est de 150 g/j.

### B.4.3 Consommation de salades ou de fruits et légumes du potager

La consommation de salades prise en référence est de 100 g/individu/jour (Petterson *et al.* 2001a). La consommation de salades ou de concombre prise en compte est de 100 g/150 jours, sur la base de données israéliennes (Shuval & Fattal 2003). La consommation de légumes-racines venant de zones potentiellement exposées a été évaluée par Gale à 35 g/jour/par habitant en Grande-Bretagne (Gale 2005).

## B.5 Conclusion

### B.5.1 Contamination, distribution et survie

- Les résultats des AQR publiées dans le domaine viral/alimentaire sont contestables du fait de l'absence de données de contamination fiables, et par l'absence de prise en compte de la variabilité de la contamination. Cette variabilité peut avoir différentes origines, mais une variabilité saisonnière de contamination est déjà identifiée pour l'eau et les coquillages pour certains virus, et il est dommage de ne pas en tenir compte en relation avec des pics d'incidence dans les populations, parfois saisonniers eux aussi (Lopman *et al.* 2003) ;
- Les données de contaminations virales sur les virus concernés sont obtenues par extrapolation de données sur des indicateurs (*Enterovirus*, *E. coli*), sans réelle justification scientifique. En cas d'utilisation de données sur des indicateurs (*Enterovirus* ou autre), un travail préliminaire devrait estimer la corrélation entre ces indicateurs et l'agent recherché, afin d'en tenir compte dans l'AQR ;
- L'acquisition de données de contaminations sur les virus concernés passe par la mise en place d'une stratégie d'échantillonnage ad-hoc et par l'usage de techniques de détection-quantifications standardisées, aux

performances connues permettant d'obtenir une estimation fiable de valeurs de contamination et de leur variabilité (cf. Question 9) ;

- L'utilisation de données sur l'eau brute (contenant des quantités supérieures de virus et donc plus aisément détectables) pour traduire la contamination de l'eau distribuée, passe par la connaissance de l'efficacité des traitements et de leur variabilité, et la fréquence d'accidents de contamination ou de traitements ;
- On identifie aussi ici d'autres lacunes de connaissances, comme la survie et la répartition de la contamination des virus dans les aliments (eau, coquillages, produits végétaux) ;
- Enfin l'absence de prise en compte de différents facteurs comme la préparation des aliments par les consommateurs ou les transformateurs, et les performances des traitements mis en place, découle d'un défaut de données disponibles et fiables sur le sujet.

### B.5.2 consommation

La variabilité de consommation, permettant d'estimer un risque représentatif d'une population et non d'un comportement extrême, n'est pas prise en compte dans les différentes évaluations de risques citées ci-dessus.

Il peut être intéressant de rappeler qu'en France on dispose de différentes sources de données pour estimer cette variabilité de consommation alimentaire (Urban 2003), et notamment l'étude INCA (1998-1998), qui rassemble les données prises sur une semaine de consommation, sur plusieurs centaines de personnes à quatre périodes correspondant aux différentes saisons de l'année (effectif total de 3 000 personnes) (Volatier 2000, Beaudou 2003, Shaw *et al.* 2003) ainsi que pour différentes classes d'âge supérieures à 4 ans. La prise en compte de la variabilité de la consommation d'eau du robinet a été ajustée à des distributions paramétriques (Gofti-Laroche *et al.* 2001, Shaw *et al.* 2003) et « empiriques » (Pouillot *et al.* 2002a).

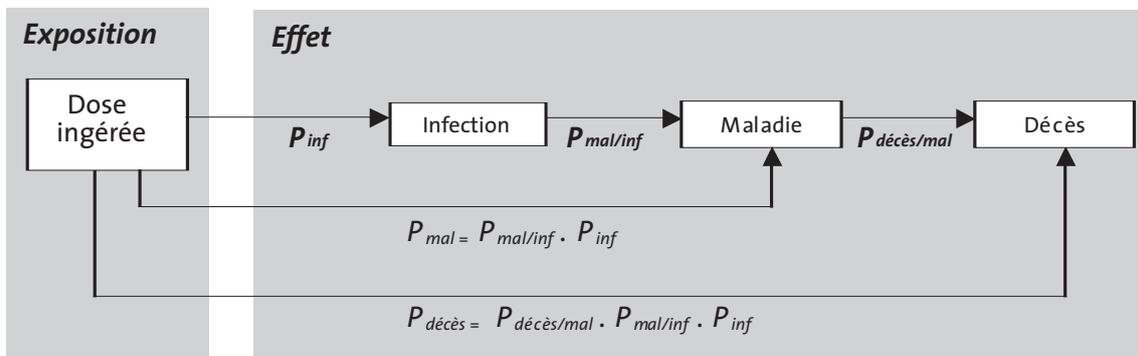
- La saisonnalité de la consommation n'a par contre pas été prise en compte et pourrait alors être étudiée en relation avec la saisonnalité de pics épidémiques d'origine virale (Lopman *et al.* 2003) ;
- La consommation de coquillages, et notamment d'huîtres pose encore des difficultés d'estimation particulières, du fait de sa grande variabilité spatiale et temporelle ;
- D'autres études en cours pourront dans l'avenir contribuer à une estimation de la consommation pour des populations particulières, comme celle concernant spécifiquement les produits de la pêche (DGAL-Afssa-INRA) ou la nouvelle enquête INCA2 (Afssa-USEN), prenant en compte des facteurs sociodémographiques. Une étude portant sur les bébés de 1 à 30 mois, en cours, pourrait être utile pour des AQR traitant de gastroentérites infantiles, comme celles à Rotavirus.

## C. Caractérisation des dangers

Par définition, la caractérisation des dangers concerne l'évaluation quantitative de la nature des effets néfastes sur la santé associés aux virus qui peuvent être présents dans les denrées alimentaires.

Les effets sanitaires pour un individu donné peuvent être abordés globalement de deux façons différentes dans les AQR. La première, la plus couramment rencontrée dans les différentes publications d'AQR concernant des virus, va consister en l'estimation de trois probabilités conditionnelles, à savoir le risque d'infection, de maladie et de décès. On considère un seul type de maladie, associé à un tableau clinique particulier, l'approche est linéaire. Cette approche est illustrée par la Figure 12.

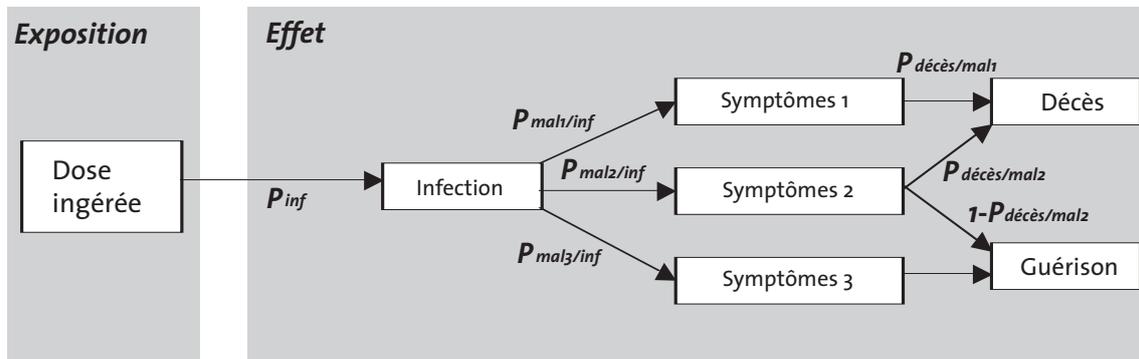
Figure 12 : schéma des différents modules pour l'évaluation des effets sanitaires



D'après (Haas *et al.* 1999, Canivet 2005)

La deuxième approche peut concerner différents types d'expression clinique pour un même agent microbien, l'effet sanitaire peut, dans ce cas, être exprimé de différentes manières, par des indicateurs pertinents (par exemple en DALY). Ce type d'approche (Figure 13) est notamment utilisé actuellement par l'OMS pour prioriser les agents infectieux dans le domaine de l'eau de distribution (WHO 2004).

Figure 13 : schéma des différents modules pour l'évaluation des effets sanitaires pour différents effets sanitaires d'un même agent infectieux



D'après (Pruss & Havelaar 2001)

Dans cette approche, la probabilité de décès sera de la forme :

$$P_{\text{décès}} = P_{\text{décès/mal1}} \cdot P_{\text{mal1/inf}} \cdot P_{\text{inf}} + P_{\text{décès/mal2}} \cdot P_{\text{mal2/inf}} \cdot P_{\text{inf}}$$

Les blocs correspondant aux symptômes peuvent aussi être traduits sous la forme d'autres indicateurs sanitaires, comme les DALY. On peut ainsi définir différents résultats sanitaires possibles pour un même agent infectieux.

Enfin, comme on le verra par la suite, d'autres approches peuvent être utiles pour estimer des effets sanitaires, en ne s'intéressant plus à l'individu mais à une population, et à des possibilités de transmission inter-humaine (Eisenberg *et al.* 2004).

### C.1 Relation dose-infection

L'objectif d'une relation dose-réponse est d'établir un lien entre le niveau d'une exposition microbienne (dose moyenne ingérée de micro-organismes) et la probabilité de survenue d'un événement indésirable (effet sanitaire) (Haas *et al.* 1999). Les doses-réponses définies en microbiologie des aliments considèrent, en premier lieu, la relation entre la dose ingérée et l'infection, en d'autre terme l'**infectivité**, au sens de l'aptitude pour un micro-organisme à pénétrer et à se multiplier dans un hôte **réceptif** (Jenicek & Cléroux 1982, Jammal *et al.* 1988).

L'infection virale peut être détectée, en dehors de l'expression de la maladie, par sérologie ou par l'excrétion de virus dans les selles, et dans ce dernier cas la notion d'infection et d'excrétion virale est confondue.

Les relations dose-infection sont déterminées principalement à partir d'essais sur volontaires sains et sont dans certains cas confirmées ou complétées par des études épidémiologiques (Eisenberg *et al.* 1998, Gofti-Laroche 2001, Pouillot *et al.* 2004). Les expérimentations animales ne sont pas utilisées pour étudier la relation dose-infection pour les virus concernés dans ce rapport (Hépatites, Calicivirus, Rotavirus, Poliovirus), sans doute en raison de la différence de pathogénie et/ou de la différence phylogénétique entre virus animaux et humains (cf. Question 4).

Afin de caractériser l'infectiosité d'un virus en fonction d'une dose ingérée, différents critères ont été définis. La Dose-Minimale Infectante (DMI) est le critère estimé sur le plus grand nombre de virus. Cette DMI correspond à la dose ingérée la plus faible (avec une estimation de la quantité de virus) ayant provoqué une infection chez au moins un individu. À cette DMI correspond une idée d'effet seuil. Cependant les modèles avec seuils, c'est-à-dire supposant une synergie-coopération de plusieurs unités infectieuses pour induire une infection et faisant intervenir la notion de Dose Minimale Infectante sont peu utilisés en microbiologie car ils ne sont pas considérés comme assez sécuritaires aux faibles doses (Haas 1983). La notion de DMI a tendance à devenir obsolète pour les approches quantitatives de risque alimentaire et à être remplacée par un autre critère, la DMI<sub>50</sub> (Gale 2005).

La  $DMI_{50}$  ou dose infectieuse médiane correspond à une dose moyenne provoquant l'infection chez 50 % des individus ayant consommé l'aliment. La  $DMI_{50}$  est déterminée après ajustement d'une fonction sur les résultats, le plus souvent, d'une expérimentation sur la relation dose-infection.

Certaines relations dose-infection sans seuil sont dits mécanistes ou explicatives. L'approche explicative est pertinente si elle reflète, au moins de manière simplifiée, le phénomène biologique sous-jacent (WHO 2004). Cette approche permet aussi de choisir entre différents ajustements possibles de la relation sur un certain nombre de données. Ceci peut être particulièrement important lorsque l'on doit extrapoler les résultats d'un modèle aux faibles doses (Haas *et al.* 1999).

Les principaux modèles explicatifs résultent de la combinaison de deux phénomènes. À partir d'un produit contaminé ingéré, il s'agit de traduire la probabilité pour un certain nombre de virus d'être effectivement ingérés par l'individu (ce qui est traduit par une loi de Poisson, si la distribution de la contamination est aléatoire) puis de calculer la probabilité pour un certain nombre d'entre eux de survivre ou d'être capables d'induire une infection, ce qui est traduit par une loi binomiale (Haas *et al.* 1999).

Les hypothèses intrinsèques pour ajuster ce type de relation sont les suivantes :

- la dose minimale infectante est de 1 particule virale (single-hit model ou modèle sans seuil), c'est-à-dire qu'un seul virus peut induire une infection, mais avec une probabilité très faible (1) ;
- il n'y a pas de synergie coopération entre les particules infectieuses (absence de seuil). Les interactions hôtes-micro-organismes (probabilité de survie pour Haas) sont indépendantes du nombre de micro-organismes ingérés (2) ;
- les individus ingèrent un nombre de pathogènes issus d'un échantillon d'une distribution de Poisson (de moyenne  $d$ ). On suppose une distribution aléatoire des pathogènes dans la nourriture (3) (Haas *et al.* 1999) ;
- Si les relations hôtes-micro-organismes sont supposées identiques d'un cas à l'autre, la probabilité d'infection ( $r$ ) d'un individu quelconque suite à l'ingestion d'un seul micro-organisme est une constante. La probabilité moyenne d'infection suit alors une relation de **type exponentiel** (Haas 2002) :

$$P(\text{infecté/dose moyenne ingérée de virus } D) = 1 - e^{-rD} \text{ et } DMI_{50} = \ln 2/r$$

( $d$  représente une dose moyenne ingérée dans une population et  $r$  une probabilité constante)

- Si la probabilité d'infection liée à l'ingestion d'un virus peut varier entre les individus ou si l'on veut tenir compte des différences de virulence entre souches, alors on peut inclure une variabilité sur la paramètre  $r$ , que l'on postule généralement suivre une loi bêta de paramètres  $\alpha$  et  $\beta$ . La fonction **hypergéométrique** gaussienne confluyente obtenue, peut se simplifier sous la forme d'une relation dose-infection qui suit une loi **Bêta-poisson** (Furumoto & Mickey 1967) sous certaines conditions ( $\beta \gg 1$  et  $\alpha < \beta$ ) (Teunis & Havelaar 2000).

$$P(\text{infecté/dose moyenne ingérée de virus } D) \approx 1 - \left(1 + \frac{D}{\beta}\right)^{-\alpha} \text{ et } DMI_{50} \approx \beta x (2^{1/\alpha} - 1)$$

Le modèle Bêta-poisson peut dans certains cas cependant surestimer le risque aux faibles doses et devrait dans ce cas être minoré par la probabilité d'exposition à au moins une particule virale (Teunis & Havelaar 2000).

- Si la probabilité d'infection varie d'une population à l'autre, et que ces populations sont identifiées par des marqueurs biologiques identifiés, deux stratégies sont possibles. S'il n'y avait pas moyen d'identifier dans l'étude expérimentale les groupes concernés, on peut construire *a posteriori* un modèle de mélange de 2 populations faisant intervenir 3 paramètres. C'est l'approche menée par (Gale 2003) sur rotavirus, sans qu'un marqueur particulier ait à ce jour été identifié pour ce virus, à la différence des Norovirus (Gale 2005). La relation dose réponse est modélisée par deux exponentielles négatives. Cela se traduit (Gale 2003, 2005) par une fonction de la forme suivante :

$$P(\text{infecté/dose moyenne ingérée de virus } D) = f_1 x(1 - e^{-r_1 D}) + f_2 - e^{-r_2 D} \text{ avec } f_1 + f_2 = 1$$

( $D$  représente une dose moyenne ingérée dans une population et  $r$  une probabilité constante au sein de chaque population) ;  $f_1$  et  $f_2$  représentent les fractions de la population appartenant à telle ou telle catégorie de réceptivité au rotavirus.

## Question 8

Dans une récente expérimentation dose-infection sur Norovirus, les deux populations ont été détectées par plusieurs marqueurs biologiques identifiés. Les relations dose-infection ont alors été étudiées de façon séparée pour les 2 populations (Teunis, com. Pers.), et de façon distincte pour des souches différentes.

- si la répartition des agents infectieux est supposée non homogène, d'autres modèles sont envisageables (Haas *et al.* 1999, Teunis & Havelaar 2000). Cependant ces approches sont souvent écartées dans le cas des doses-réponses, d'une part parce que les distributions des agents infectieux dans les inocula est mal connue, d'autre part parce que cela complexifie les formulations (augmentation du nombre de paramètres à estimer), enfin parce qu'on suppose que dans le cadre d'une expérimentation, l'homogénéisation des doses est bien supérieure à ce qu'elle pourrait être dans des aliments ou de l'eau naturellement contaminée ;
- les remarques générales relatives aux limites des relations dose-réponse, sur l'utilisation des modèles mathématiques, des limites des données épidémiologiques, microbiologiques (Delignette-Muller *et al.* 2003) sont extrapolables ici. Ces limites peuvent être distinguées en deux catégories. Des hypothèses sont formulées pour l'ajustement d'un modèle explicatif, ce sont les hypothèses rappelées ci-dessus. D'autres hypothèses sont formulées pour permettre une extrapolation des résultats, extrapolation aux faibles doses (en dessous de  $9.10^{-3}$  FFU pour rotavirus), extrapolation à la population générale, aux différentes souches, aux différents aliments rencontrés, ce qui peut aussi se définir comme l'extrapolation au triangle épidémiologique hôte-agent-matrice (FAO/OMS 2003) et enfin aux capacités de détection dans les aliments ou chez les individus comparables à celles mises en place pendant l'expérimentation (Haas *et al.* 1999) ;
- la validation de ces modèles revêt différents aspects. Quatre critères ont été définis par Dee (Dee 1995) :
  - **la validation conceptuelle** : le modèle est-il réaliste et crédible, au regard des connaissances scientifiques disponibles, notamment pour la formulation des hypothèses, les données sources sont-elles valides pour l'objectif ?
  - **la validation de l'algorithme** : les équations et les relations utilisées sont-elles justes, par exemple peut-on utiliser une relation beta-poisson au lieu de la fonction hypergéométrique gaussienne confluyente ?
  - **la validation du programme** : est-il juste et utilisé dans des conditions satisfaisantes ? Différentes approches aboutissent-elles à des résultats similaires ?
  - **la validation fonctionnelle** : les résultats (parfois partiels) sont-ils comparables à des données observées obtenues indépendamment du modèle ?

L'OMS rajoute un dernier critère de validation, la **crédibilité** qui correspond à la validation des doses-réponses sur différentes études (expérimentales et épidémiologiques) menées sur des individus différents, à différents endroits, avec des souches différentes et sur différentes matrices, ce qui permet aussi une plus large extrapolation de la relation (FAO/OMS 2003).

Les relations dose-réponse utilisées dans les évaluations de risque virus/aliments sont en grande majorité de type Bêta-poisson, exceptionnellement de type exponentiel. Pour mémoire, ce sont des modèles de type exponentiel qui s'ajustent le mieux aux parasites *Giardia*, *Cryptosporidium* et *Toxoplasma*.

Le modèle le plus souvent utilisé pour représenter le risque viral de façon générale est le modèle rotavirus, sous la forme du modèle bêta-poisson (Figure 14 et Tableau 44.) en tant que virus particulièrement infectieux, au sens où c'est celui pour lequel la dose infectieuse est la plus faible pour induire une infection. Cependant, Moe, au regard d'une unité comparable basée sur un comptage en microscopie électronique, estime que les Norovirus pourraient être aussi infectieux que les rotavirus (Balbus *et al.* 2004). **L'utilisation de la relation dose-infection Rotavirus pour l'ensemble des virus transmissibles par voie alimentaire est considérée comme une approche particulièrement sécuritaire de l'estimation du risque d'infection, et c'est celle qui est retenue pour l'établissement de normes de concentrations dans l'eau distribuée** (Regli *et al.* 1991, WHO 2004) ou pour les autres AQR (Regli *et al.* 1991, Rose & Sobsey 1993, Gerba *et al.* 1996b, Petterson *et al.* 2001a, Bassi 2002). En fait, utiliser la relation dose-infection rotavirus pour l'ensemble des virus est une approche sécuritaire pour des doses faibles ou modérées de contamination (inférieures à 100 pfu), comme le montre la comparaison de différentes relations doses-infections de différents virus des Figure 14 et Figure 15. Les études d'AQR portant sur rotavirus sont menées sur la gamme de valeurs où la relation dose-infection rotavirus est la plus sécuritaire, et correspondent à des valeurs plausibles observées de concentrations virales.

Ainsi, même si l'étude expérimentale menée par Ward peut être considérée comme pouvant être améliorée (nombre de volontaires faible, etc.), **la relation dose-infection Rotavirus est la plus utilisée pour traduire le comportement infectieux viral** (Ward *et al.* 1986).

La relation dose-infection de Gale (2003), établie sur les mêmes données expérimentales, s'ajuste mieux aux données que la relation Bêta-poisson, est moins sécuritaire aux faibles doses (mais plus proche des données observées) et plus sécuritaire pour des doses plus élevées (Figure 14 et Figure 15). Cependant la justification biologique de l'existence de 2 populations distinctes reste encore à démontrer.

L'approche classique de la relation dose-infection pour Rotavirus utilise une approximation de la fonction hypergéométrique-Kummer-confluente par une relation Bêta-Poisson, alors que les conditions d'approximation de Furumoto-Mickey sont mal satisfaites. Cette fonction doit au minimum être minorée par une relation exponentielle négative, de paramètre  $-1$  (Teunis & Havelaar 2000). La fonction hypergéométrique, sans approximation, reste d'utilisation délicate sur le plan mathématique et n'est quasiment jamais utilisée pour rotavirus, ni pour d'autres virus.

Les résultats d'une étude épidémiologique (Payment *et al.* 1991) ont été comparés aux résultats du modèle utilisant les résultats d'une campagne de mesure d'entérovirus dans l'eau distribuée dans la zone environnante (Payment *et al.* 1985), par une approche utilisant une concentration et une consommation moyenne (Haas *et al.* 1999 ; p 396-397). Haas *et al.* (1999) concluent à un relatif accord entre le résultat du modèle et les estimations de risques quotidien et annuel donnés par l'étude de Payment (1991).

Malheureusement les résultats de l'étude épidémiologique sont contestés (Sinclair & Fairley 2000) par l'existence de biais méthodologiques importants, par exemple le traitement de l'eau était connu par les personnes enquêtées. D'autre part les hypothèses sous-jacentes à la comparaison sont souvent contestables : entre autres, le modèle utilisé n'est pas celui qui s'ajuste le mieux aux données, la valeur de concentration dans l'eau a été multipliée par 2, toutes les infections se traduisent par des symptômes cliniques détectés, tous les entérovirus détectés dans l'eau auraient un comportement comparable à Rotavirus. C'est malheureusement une des seules tentatives connues de validation de la relation dose-réponse du modèle Rotavirus. On peut simplement conclure que les résultats du modèle ne sont pas totalement incohérents avec l'observation.

Pour les virus de l'Hépatite A et E, des approches de relation dose-infection ont été tentées. Dans la publication sur le risque lié à l'ingestion de coquillages (Rose & Sobsey 1993), la dose-réponse de l'Hépatite A vis-à-vis de l'infection a été assimilée à celle d'Échovirus-12 (Schiff *et al.* 1984), en tant que virus modérément infectieux et en comparaison au modèle Rotavirus hautement infectieux. Cette dose-réponse a été implicitement considérée comme valide pour l'Hépatite A dans l'AQR de (Shuval 2003). Pour l'Hépatite E, la dose-réponse d'Échovirus 12 n'est pas considérée comme suffisamment infectieuse et serait à rapprocher de celle de Rotavirus. La différence des estimations du risque infectieux entre Rose et Shuval pour l'Hépatite A est due à une différence de niveau de contamination supposée des produits ingérés suivant les zones géographiques. Enfin une autre approche à partir d'une quantité de selles infectées ingérées et non d'un nombre de particules infectieuses ingérées a été tentée (Haas *et al.* 1999, Bassi 2002) avec un modèle de type exponentiel. Aucune validation de ces modèles, notamment de VHA n'a été tentée jusqu'à présent, probablement à cause de la difficulté de quantification et du faible nombre de données de détection de ce virus dans l'eau ou les aliments.

Pour adénovirus, le modèle retenu par (Crabtree *et al.* 1997) est un modèle exponentiel, cependant l'extrapolation de la pathogénie d'un adénovirus de type 4, par transmission par inhalation ne semble pas pertinente pour déterminer la relation des adénovirus de type 40-41, avec une transmission par voie alimentaire. Le modèle a cependant été conservé, pour information dans le Tableau 44. Aucune validation épidémiologique connue n'est venue confirmer les résultats obtenus par l'AQR de Crabtree (Crabtree *et al.* 1997).

Les relations dose-infection ont été obtenues sur les différents poliovirus à l'aide de souches vaccinales. Aucune validation n'est venue confirmer ces résultats (Katz & Plotkin 1967, Minor *et al.* 1981).

La relation dose-infection sur Échovirus 12 a été obtenue à l'aide d'une souche obtenue sur un enfant malade (Schiff *et al.* 1984).

Enfin, les résultats d'une étude sur Calicivirus, menée sur des volontaires sains aux États-Unis, devraient être prochainement publiés (Moe *et al.* 2004).

Pour tous les virus cités ici, la question de la différence de sensibilité et de réceptivité entre individus ou populations définies (susceptibility), n'est pas encore considérée comme suffisamment prise en compte dans beaucoup d'études d'évaluation des risques, et pas forcément suffisamment comprise dans ses mécanismes (Gerba *et al.* 1996b, Balbus *et al.* 2004). Crabtree, (1997) et Gerba (1996) contournent la difficulté : afin d'augmenter le risque d'infection pour les personnes les plus sensibles, ils multiplient par 2 l'exposition des personnes âgées, en multipliant par deux leur consommation d'eau (4 litres d'eau bue pour une personne âgée, 2 litres pour celles de la population générale). Cette façon de procéder serait aussi justifiée selon ses études par le fait que les personnes âgées consommeraient davantage d'eau (Crabtree 1997). Les résultats de la consommation en France sur la base INCA montrent que l'effet de l'âge sur la consommation n'est pas évident et qu'il faut définir au minimum l'âge des personnes âgées concernées avec précision (Beaudeau 2003). Dans le même esprit, pour augmenter le risque d'infection des personnes les plus sensibles, Haas multiplie la concentration par 2 pour les personnes les plus sensibles (Haas *et al.* 1993).

De même Canivet (2005) multiplie la dose reçue par 3, pour augmenter le risque d'infection chez les immunodéprimés, par analogie à des études menées sur *Cryptosporidium* pour des patients infectés par le VIH (Perz *et al.* 1998). Toutes ces approches concernent rotavirus ou des virus censés se comporter comme rotavirus. Des études plus précises devraient améliorer la prise en compte de ces facteurs. Il est nécessaire de mieux définir ce qu'on entend par personne âgée, plus sensible ou immunodéprimée, de prendre en compte les notions de susceptibilité pour chaque agent infectieux concerné (l'extrapolation est parfois subjective) et de mieux comprendre éventuellement les mécanismes en cause.

**Les relations dose-infection dans le domaine viral ne sont pas suffisamment connues ni étudiées. On ne dispose toujours pas de données tangibles publiées sur les relations dose-infection pour les virus des Hépatites ni pour les Calicivirus.** Si les études sur volontaires posent des problèmes éthiques évidents, il est possible d'obtenir des informations par d'autres travaux. Des travaux de validation, c'est-à-dire de comparaison entre résultats de modèles et données observées permettraient de mieux valoriser les résultats obtenus par expérimentation ou par hypothèse. Des relations dose-infection peuvent aussi être approchées par des études épidémiologiques et environnementales *ad hoc*, et en agrégeant les données obtenues, comme cela a été tenté sur *Salmonella enteritidis* (FAO/OMS 2002). Des difficultés persisteront cependant, pour des maladies à incubation relativement longue, comme l'hépatite A, pour identifier le vecteur alimentaire et quantifier l'exposition. **Il serait important d'étudier plus finement l'effet des hypothèses citées plus haut, liées aux extrapolations de la relation dose-réponse obtenue au cas général. En particulier, les AQR devraient pouvoir tenir compte des différences d'infectiosité (et de virulence) entre différentes souches d'un même virus, et des différences de réceptivité-sensibilité des individus.**

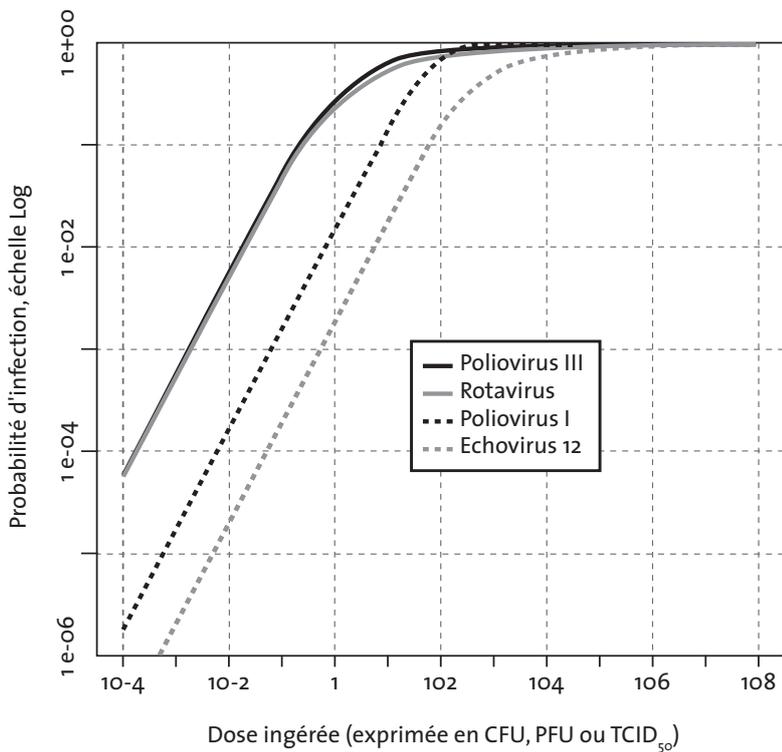
Le Tableau 44 résume les informations actuellement disponibles sur les relations dose-infection de différents virus. En gras figure le modèle de référence utilisé dans les AQR.

**Tableau 44 : informations actuellement disponibles sur les relations dose-infections de différents virus**

	Type de modèle	Paramètres	Origine des données expérimentales	Référence de l'ajustement
<b>Rotavirus</b>	Exponentiel	$R=0,0126$	De $9 \cdot 10^{-3}$ à $9 \cdot 10^4$ FFU (Ward <i>et al.</i> 1986) Étude sur adultes sains	(Haas <i>et al.</i> 1999)
	<b>Beta-poisson</b>	$\alpha=0,253$ ; $\beta=0,422$		(Haas <i>et al.</i> 1993)
	Hypergéométrique	$\alpha=0,167$ ; $\beta=0,191$		(Teunis & Havelaar 2000)
	Double negative exponentielle	$F1=0,85$ ; $R1=0,2$ $R2=0,00004$		(Gale 2003)
<b>Poliovirus I</b>	Exponentiel	$r=0,009102$	De 7 à 280 TCID <sub>50</sub> : données (Minor <i>et al.</i> 1981) Étude sur nourrissons (souche vaccinale) 10 <sup>3</sup> à 10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> : données (Lepow <i>et al.</i> 1962) Étude sur nourrissons (souche vaccinale)	(Regli <i>et al.</i> 1991)
	<b>Beta-poisson</b>	$\alpha=0,1097$ $\beta=1524$ (ou 200)		(Regli <i>et al.</i> 1991)
<b>Poliovirus III</b>	<b>Beta-poisson</b>	$\alpha=0,409$ $\beta=0,788$	1 à 10 TCID <sub>50</sub> : données (Katz & Plotkin 1967) Étude sur nourrissons (souche vaccinale)	(Regli <i>et al.</i> 1991)
<b>Échovirus 12</b>	<b>Beta-poisson</b>	$\alpha=0,374$ $\beta=186,69$ ou bien 1,3 et 75 (Haas 1983)	De 330 à 330 000 PFU : données (Schiff <i>et al.</i> 1984) Étude sur adultes sains	(Regli <i>et al.</i> 1991) (Eisenberg <i>et al.</i> 1998)
	Exponentiel	$r=0,012$		(Haas <i>et al.</i> 1999) à partir données Akin 1981
<b>Adénovirus</b>	<b>Exponentiel</b>	$R=0,4172$	De 11 à 1 000 TCID <sub>50</sub> : données (Couch <i>et al.</i> 1966) Étude sur adultes sains	(Crabtree 1997)
<b>Hépatite A* dose exprimée en g de fèces d'individus excréteurs</b>	Exponentiel	$R=1,8229$	De 0,00001 g à 4 g données (Ward <i>et al.</i> 1958) Étude sur enfants	(Haas <i>et al.</i> 1999)
<b>Coxsackievirus flexnerii et dysenteriae</b>	Exponentiel	0,00775	Coxsackievirus A <sub>21</sub> : De 6 à 832 TCID <sub>50</sub> : données (Couch <i>et al.</i> 1965) Étude sur adultes sains	(Gofti-Laroche 2001) cite Crabtree, 1995 : 789-791

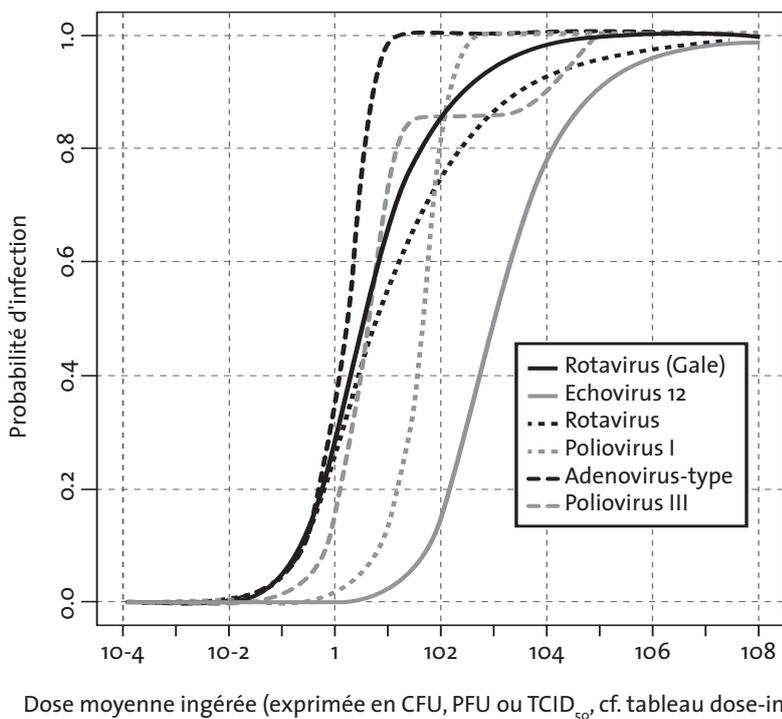
NB : La correspondance entre unités n'est pas évidente, sauf l'approximation 1 PFU=1 FFU.

Figure 14 : relations dose-infection de différents virus



(TCID<sub>50</sub> : Tissue culture infectious dose 50 ; PFU : Plaque forming unit ; FFU : Focus forming unit)

Figure 15 : relations dose-infection de différents virus pour de faibles doses (probabilités d'infection)



Dose moyenne ingérée (exprimée en CFU, PFU ou TCID<sub>50</sub>, cf. tableau dose-infection)

## C.2 Considérations sur le risque de maladie, la virulence, la morbidité

Parmi les effets sanitaires considérés, en dehors du risque d'infection, le risque de maladie lié à la consommation d'un aliment est l'effet sanitaire le plus utilisé dans les différentes publications. Mais il faut dans ce cas définir (ou choisir) précisément les troubles cliniques considérés, caractérisant le lien entre le virus et « la maladie associée ». C'est une des difficultés de cet indicateur. Dans les évaluations quantitatives de risque viral publiées, deux hypothèses sont couramment formulées, qui permettent aussi des facilités de calcul. Le manque de données disponibles quantitatives ne permet pas le plus souvent de réfuter ou de valider ces hypothèses :

- la probabilité d'être malade, sachant que l'on est infecté (morbidity ratio) est considérée, dans les évaluations quantitatives de risque viral publiées, comme indépendante de la dose ingérée ;
- une fois infecté, quelle que soit la dose reçue, quel que soit l'environnement, la probabilité d'être malade est considérée comme identique d'un individu à l'autre. Cette approche est aussi une facilité de calcul et est aussi liée à une difficulté d'estimation.

### Question 8

La probabilité d'être malade, sachant que l'on est infecté, peut s'apparenter à la notion de virulence. *A priori* la **virulence** (capacité du micro-organisme à induire des troubles cliniques chez le sujet infecté) chez les entérovirus varierait de 1 à 97 %, ce qui conduit à une estimation moyenne de 50 %, ce qui suppose une forme symétrique de la distribution, valeur reprise dans les évaluations de risques rencontrées (Gofti *et al.* 1999).

La notion de **morbidité** en épidémiologie, avec ses principaux indicateurs, comme le taux d'incidence ou de prévalence est différente de la virulence, et du **taux de morbidité (ou taux de virulence/taux de morbidité sachant l'infection)** défini dans les évaluations de risque. En effet, en général le dénominateur de l'indicateur de morbidité (incidence ou prévalence) concerne le nombre de personnes exposées à un risque pendant une période ou à un moment donné. Le taux de morbidité  $T_m$  pour les évaluations de risques concerne la probabilité de tomber malade sachant que l'on est infecté, et lorsqu'elle s'exprime sous la forme d'une constante (sous différentes hypothèses) elle est estimée par le rapport entre le nombre de malades et le nombre de personnes infectées (Teunis & Havelaar 1999).

Pour rotavirus, comme pour adénovirus, le  $T_m$  a été estimé à 0,5 pour des enfants (Rose & Sobsey 1993, Crabtree 1997). Pour le VHA le  $T_m$  a été évalué à 0,75 pour des adultes (Rose & Sobsey 1993). Dans les évaluations de risque, la probabilité d'être malade est déduite de la Probabilité d'infection et du taux de morbidité (sachant l'infection)  $T_m$  (ici une valeur constante de 0,5 qui est le rapport nombre malades/nombre infectés) selon la relation ci-dessous (Haas *et al.* 1993) :

$$P_{\text{malade}} = P_{\text{infecté}} \times T_m$$

Des contrôles partiels peuvent être envisagés avec le taux d'attaque (primaire) (nombre de cas d'une maladie donnée survenue pendant une période d'observation déterminée rapporté à la population exposée à cet agent infectieux au début de la période) rencontré au cours de TIAC, si les concentrations dans les aliments, les quantités d'aliments ingérées, la durée de l'exposition et la dose-réponse sont connues, de façon même approximative. Un exemple de validation a pu être effectué en 1993 sur *Cryptosporidium* (Haas & Rose 1994). Le Tableau 45 ci-après rappelle quelques-uns de ces taux. Les différentes évaluations ne font pas varier le  $T_m$  selon l'état des individus ni suivant la dose ingérée. D'autres facteurs, comme l'état immunitaire des individus, pourraient être pris en considération dans cette probabilité, ainsi que le type de souche virale (Gerba *et al.* 1996b, Vose 2000, Pouillot *et al.* 2002a, Oscar 2004).

Tableau 45 : taux de morbidité et de létalité exprimés pour différents virus

	% taux de morbidité (Tm*100) sachant l'infection	% taux de létalité
<b>Poliovirus</b>	0,1-1 % (paralysie) (Rose & Sobsey 1993)	0,9 % (Rose & Sobsey 1993) 10 % (Macler & Regli 1993)
<b>Coxsackievirus A</b>	50 % (méningite aseptique et/ou troubles respiratoires) (Rose & Sobsey 1993, Gerba <i>et al.</i> 1996a)	0,5% (Rose & Sobsey 1993) population générale 86 % immunodéprimés (Gerba <i>et al.</i> 1996a)
<b>Coxsackievirus B</b>	5-96 % (Gerba <i>et al.</i> 1996a)	0,59-0,94 % (Rose & Sobsey 1993) population générale 13 % nourrissons (Gerba <i>et al.</i> 1996a)
<b>Échovirus</b>	50 % (troubles respiratoires, cardiaques, diarrhée, méningites) (Rose & Sobsey 1993)	0,27-0,29 % population générale 3,4 % nourrissons (Gerba <i>et al.</i> 1996a)
<b>Virus Hépatite A</b>	75 % (hépatite infectieuse) adultes (Rose & Sobsey 1993, Gerba <i>et al.</i> 1996a) 5 % (enfants) (Regli <i>et al.</i> 1991)	Pour adultes population générale : 0,6 % (Rose & Sobsey 1993) 1 % (Shuval 2003)
<b>Rotavirus</b>	56-60 % (gastroentérite infantile) (Rose & Sobsey 1993) tm 88 pays développés tm 90 pays en développement (WHO 2004)	0,01 % population générale 1 % population âgée 63 % immunodéprimés (Gerba <i>et al.</i> 1996a) 0,6 % pour les enfants en pays sous développés 0,015 % pour les pays développés (Havelaar & Melse 2003)
<b>Adénovirus</b>	0,5 (Crabtree 1997)	0,01 % (Crabtree 1997) population générale 53 % (Gerba <i>et al.</i> 1996a) immunodéprimés
<b>Calicivirus (Norwalk-like)</b>	40-59 (gastroentérite) (Rose & Sobsey 1993)	0,0001 % (Rose & Sobsey 1993)
<b>Virus Hépatite E</b>	Symptômes avec ictère inférieur à 50 % (Worm <i>et al.</i> 2002) dépend de l'âge, du sexe, du stade de la maternité (Smith 2001)	0,2 à 4 % durant une épidémie (population générale) 10 à 20 % pour des femmes enceintes (Worm <i>et al.</i> 2002)

### C.3 Considérations sur le risque de décès, taux de létalité (case-fatality rate)

Dans les publications traitant d'AQR virus/aliments, de la même façon que précédemment, certaines hypothèses sont formulées. Par exemple, la probabilité d'un décès sachant que l'individu est malade est considérée comme indépendante de la dose ingérée, et comme identique d'un individu à l'autre, appartenant éventuellement à une même catégorie, comme une classe d'âge par exemple.

La probabilité de décès à partir de la consommation d'un aliment est calculée de la même façon que la probabilité de maladie, en fonction du taux de létalité (TI), à savoir :

$$P_{\text{décès}} = P_i * T_m * T_l$$

(Pi probabilité d'infection, Tm taux de morbidité, Tl taux de létalité) (Haas *et al.* 1999).

Il faut distinguer, pour mémoire, le taux de mortalité et le taux de létalité. Les dénominateurs sont différents. Le taux de mortalité s'applique à la population exposée et le taux de létalité à la population malade. Le Tableau 45 rappelle les valeurs choisies pour les différentes évaluations de risque publiées dans le domaine viral. Goffi-Laroche (2001) considère pour les virus d'origine alimentaire, un taux de virulence (ou taux de morbidité sachant l'infection) de 50 % et un taux de létalité de 1 (0,5-1,8) pour mille sauf pour l'hépatite A, pour des adultes non immunodéprimés. Le taux de létalité est considéré dans les évaluations de risques comme pouvant varier en fonction des populations sur rotavirus (Gerba *et al.* 1996a) mais cette notion n'est pas prise en compte pour les adénovirus (Crabtree 1997). Pour l'hépatite A, Shuval (2003) considère un taux de létalité de 0,6-1 % dans les pays développés (adultes) et un taux supérieur dans les pays en voie de développement. Ce taux varie entre 0,1 et 2,1 % selon les classes d'âge (Havelaar & Melse 2003).

Les estimations des taux de létalité doivent être interprétées avec prudence. Le dénominateur dépend des critères de définition de la maladie (gravité des symptômes) et des méthodes d'identification des cas (confirmés ou non au laboratoire). En effet, souvent ces estimations sont fondées sur les cas recensés, de façon plus ou moins active, par le système de soins. Les cas les plus graves sont plus facilement inclus dans le recueil des données sanitaires liées à un agent infectieux que les atteintes moins sévères (qui ne font pas forcément l'objet d'investigations ni d'identification au laboratoire). Ces estimations peuvent donc être considérées comme très sécuritaires.

Les considérations sur le calcul de la probabilité de décès pour des individus malades, notamment sur la prise en compte de son incertitude, sont les mêmes que pour la probabilité de maladie pour des individus infectés.

## Question 8

### C.4 Considérations sur la mesure de l'effet sanitaire en DALY

Une autre approche en tant qu'effet sanitaire, ou en terme d'estimation de coût sanitaire est la mesure de la gravité d'une maladie qui tient compte du temps « d'invalidité » (temps où la qualité de vie ou la vie elle-même est restreinte du fait de la maladie), exprimée sous la forme de DALY (Disability Adjusted Life Years) (Fewtrell & Bartram 2001, Havelaar & Melse 2003) ou « années de vie corrigées de l'incapacité » (OMS, communiqué du 16 novembre 1998). L'idée générale est d'accorder un poids à une maladie en fonction de sa sévérité (S) puis de multiplier ce poids par sa durée (D) et par le nombre de personnes potentiellement affectées par ce type de maladie (N). Bien évidemment la mortalité a le maximum de poids (1) en terme de sévérité, et sa durée est traduite en terme de perte d'espérance de vie. Le concept peut se traduire en terme de quantité de vie (durée de maladie et espérance de vie), de qualité de vie (sévérité des atteintes cliniques) et d'atteinte sociale (nombre de personnes atteintes). L'unité du DALY est une unité de temps pour un certain nombre de cas symptomatiques, un certain nombre d'infectés ou pour une personne exposée/an. Cette approche permet de traiter différents aspects de la morbidité, différentes expressions cliniques dans une même unité et de comparer l'effet de différents agents infectieux et non infectieux. Cette méthode a par exemple été utilisée pour tester l'intérêt d'une désinfection au bromate (qui a aussi une relative toxicité) de l'eau sur *Cryptosporidium* par une approche bénéfice risque calculée en DALY (Havelaar & Melse 2003).

D'après la méthodologie proposée par (Murray & Lopez 1997, Havelaar & Melse 2003), l'effet sanitaire mesuré en DALY peut s'exprimer de la façon suivante :

$$\text{DALY} = \text{YLL} + \text{YLD}$$

**YLL** (year life lost) est le produit du nombre d'années de vie perdues par le nombre de personnes concernées pour une durée définie. YLL mesure l'écart entre l'espérance de vie et l'âge où la mortalité intervient.

**YLD** (years lived with disability) représente le nombre d'années de vie, de qualité de vie définie, perdues par le nombre de personnes concernées et une durée définie

$$\text{YLD} = N \times D \times S$$

Avec (S) Sévérité de la maladie ( $0 \leq S \leq 1$ ), (D) durée de la maladie (en années), (N) nombre de personnes potentiellement affectées par ce type de maladie.

Les données sur l'incidence (ici N), la morbidité et la mortalité, voire la durée de maladie sont obtenues à partir de données cliniques, épidémiologiques, ou issues d'informations sur la surveillance. Les données sur la sévérité sont issues le plus souvent de la consultation d'experts médicaux (Havelaar & Melse 2003). L'extrapolation d'un DALY d'un pays à l'autre et plus encore, d'une région à l'autre, sont difficiles. L'estimation de la sévérité fait l'objet d'études à l'échelle européenne (Schwarzinger *et al.* 2003).

Les résultats de cette approche pour VHA et Rotavirus sont résumées dans le Tableau 46, d'après les données issues du rapport d'Havelaar (Havelaar & Melse 2003) et du rapport de l'OMS (WHO 2004). Les résultats de Shuval (2003) au niveau mondial ne sont pas repris dans le Tableau 46.

Pour 1 000 cas symptomatiques :

**Tableau 46 : résultats de l'approche DALY pour VHA et Rotavirus**

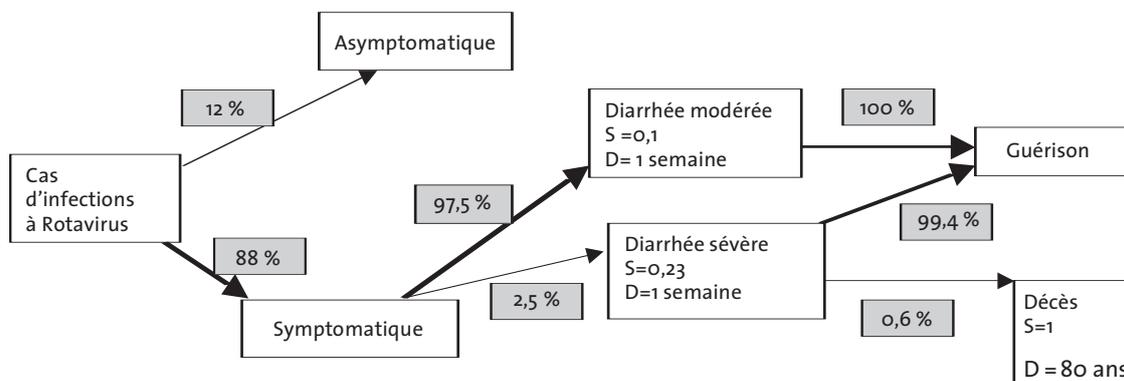
		YLD (lié à la mortalité)	YLL (lié à la morbidité)	DALY (Havelaar, Melse, 2003a)	(WHO, 2003)
Rotavirus	Régions à faibles revenus	2,2	480	482	480
	Régions à forts revenus	2	12	14	14
VHA	Régions à faibles revenus	74	3	77	
VHA (pays développés)	0-14 ans	3	74	77	
	15-49 ans	4,5	250	255	
	> 50 ans	4,5	400	405	

Remarque : pour comparer les chiffres Rotavirus et VHA dans les pays développés, il faudrait ventiler les résultats sur Rotavirus par classe d'âge ou tenir compte de la structure démographique des populations pour VHA.

**Question 8**

Le modèle sous-jacent pour ces estimations pour Rotavirus est donné dans la Figure 16. Les probabilités de transition, approximatives, car les données ne sont pas de très bonne qualité, entre les différents compartiments, sont données pour les pays développés (Havelaar & Melse 2003).

**Figure 16 : modèle de transition pour Rotavirus utilisé pour le calcul du DALY pour des enfants de moins de 5 ans, dans un pays développé (européen)**



D'après les données d'(Havelaar & Melse 2003).  
S : sévérité, D : durée de la maladie.

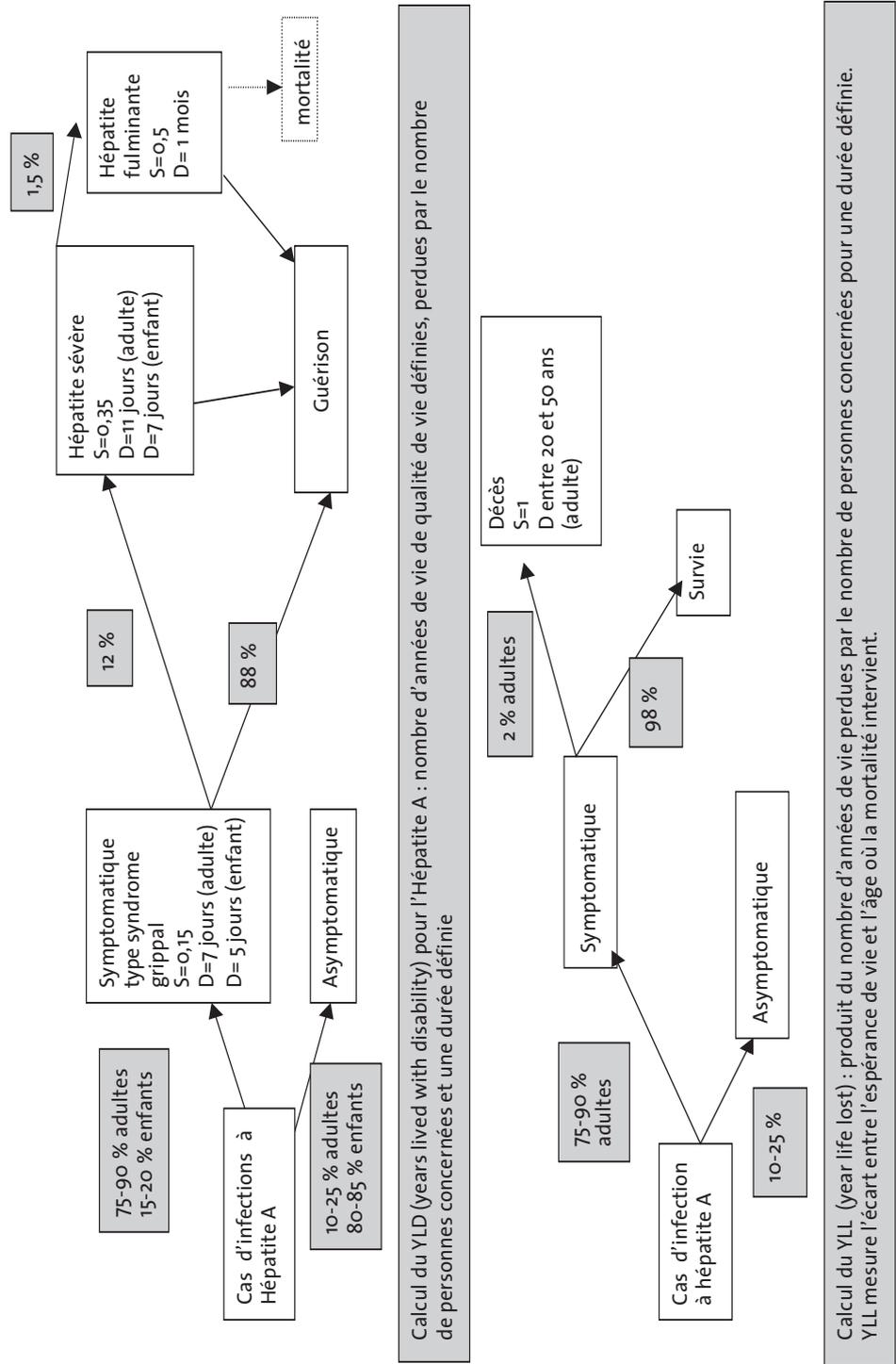
Un modèle de coût des infections à Rotavirus pour des enfants de moins de 5 ans a été établi sur des données françaises (Melliez *et al.* 2005). Le modèle tient compte de l'estimation de l'incidence, de l'effet saisonnier de la maladie, et donc du mois de naissance, de l'allaitement, et du type de soins qui seront effectués. Il s'agit d'un modèle plus complexe que le précédent (Havelaar & Melse 2003), et qui fournit le nombre annuel de diarrhées aiguës chez les enfants de moins de 5 ans (300 000), de décès (9) et un coût médical direct annuel exprimé en euros (28 millions d'euros/an) (Melliez *et al.* 2005). L'expression de l'effet sanitaire ne s'exprime pas cependant en DALY et n'estime pas S et D (Melliez *et al.* 2005).

**Question 8**

Pour VHA

Compte tenu du faible nombre d'information, la morbidité et la mortalité ont été considérées de façon séparée pour le calcul du DALY. On aboutit au schéma de la Figure 17 où sont distingués les cas bénins des cas mortels. Les cas d'hépatites fulminantes aboutissant à un décès sont implicitement pris en compte dans la partie mortalité.

Figure 17 : modèle de transition pour VHA utilisé pour le calcul du DALY pour des adultes dans un pays développé (européen)



D'après les données d'Havelaar & Melse 2003). Le DALY est la somme du YLL et YLD.

Différentes critiques ont été apportées sur cette approche, sur la subjectivité de la notation de sévérité, sur la qualité des données permettant d'établir les indicateurs, et sur des aspects fondamentaux d'équivalences (additivité mortalité et morbidité) et finalement d'éthique (Homedes 1995).

Si le nombre de cas incidents d'infections est connu par classe d'âge, les données nécessaires à l'estimation des DALY pour une maladie donnée sont les suivantes :

- taux de morbidité ;
- taux de létalité ;
- durée des symptômes ;
- sévérité des symptômes.

L'ensemble doit bien évidemment être déterminé par classe d'âge (van den Brandhof *et al.* 2004). En Hollande, l'estimation en DALY du coût des gastroentérites est estimée à 67 000 DALY par an, toutes causes confondues. L'estimation par cause de gastroentérite, par exemple pour des gastroentérites à Norovirus, n'est pas donnée (van den Brandhof *et al.* 2004).

### C.5 Considérations sur le risque attribuable à l'alimentation et la transmission inter-humaine

L'impact des gastroentérites virales d'origine alimentaire est en général défini par des approches épidémiologiques. Il faut d'abord évaluer le nombre de personnes atteintes (symptomatiques) par l'agent infectieux considéré, puis évaluer parmi celles-ci le nombre de personnes atteintes par voie alimentaire. Cette dernière estimation est effectuée à partir de résultats d'études épidémiologiques (InVS 2004). Or différentes études épidémiologiques n'aboutissent pas forcément aux mêmes résultats.

La transmission inter-humaine des différentes maladies virales (sur l'exemple de Norovirus) peut se faire par contact de mains souillées, contact avec des selles ou des vomissements de personnes infectées en cours d'excrétion (Marks *et al.* 2003). La transmission inter-humaine directe est par définition liée à un contact direct entre personnes. Par opposition la transmission indirecte inter-humaine peut se faire *via* des surfaces souillées ou des aliments (dont l'eau) contaminés.

La contamination initiale (cas index) peut avoir une origine commune (eau, aliments), puis une transmission secondaire inter-humaine permet l'extension de la maladie (Kohli *et al.* 2001).

En général, la notion de transmission inter-humaine dans les études épidémiologiques concernant les gastroentérites virales prend en compte la transmission directe ou indirecte, car il est difficile, par exemple au domicile, de différencier les deux types de transmission.

En Hollande, l'incidence annuelle de gastroentérites est estimée à 283 cas/an/1 000 personnes (De Wit *et al.* 2003). Entre 5 % et 11 % de ces cas seraient dus à Norovirus, 2 % aux Saporovirus et 5 % aux Rotavirus (De Wit *et al.* 2003). Dans cette étude cas-témoin l'analyse de mauvaises pratiques d'hygiène en cuisine sert à construire deux types d'indicateurs :

- un premier facteur de risque lié à la transmission indirecte d'un agent infectieux entre personnes, par le biais de la préparation des aliments ;
- et un deuxième facteur de risque lié à l'introduction d'un aliment contaminé au domicile (De Wit *et al.* 2003). Les cas attribuables à l'introduction d'un aliment contaminé au domicile sont ceux issus des personnes n'ayant pas eu de contact avec une personne atteinte de gastroentérite pendant la semaine précédant leur gastroentérite (De Wit *et al.* 2003).

Dans cette étude, si un cas a eu un contact avec une personne malade dans les 7 jours précédant les symptômes, ce cas sera attribué à de la transmission inter-humaine et non à de la transmission alimentaire.

Environ 50 % des cas d'infections à Norovirus et à Rotavirus seraient imputables à de mauvaises pratiques d'hygiène dans la préparation des aliments (De Wit *et al.* 2003). **La fraction de risque attribuable (selon les modalités définies précédemment) à l'introduction d'un aliment contaminé au domicile est comprise entre 12 et 16 % pour Norovirus, et est proche de 4 % pour Rotavirus (De Wit *et al.* 2003).** En Angleterre, le risque attribuable à la transmission alimentaire est estimé à partir des épidémies de gastroentérites et inclut les cas alimentaires et la transmission secondaire en résultant. Le risque attribuable à une transmission alimentaire est de 10,7 % des cas de norovirus, 2,5 % des cas de rotavirus, 10,7 % des cas d'astrovirus (Adak *et al.* 1991).

**Mead (1999) n'obtient pas les mêmes valeurs, et attribue 40 % des cas à une origine alimentaire pour Norovirus, 1 % pour Rotavirus et Astrovirus, 5 % pour les Hépatites A.** Les valeurs de Mead sont déduites de la publication

## Question 8

de Fankhauser (Fankhauser *et al.* 1998) sur 51 cas de TIAC (cas groupés détectés de 10 à plus de 6 000 personnes) : 47 % des cas sont attribuées à une origine alimentaire (dont 10 % à la consommation d'huîtres) et 6 % à de l'eau contaminée. Mead (1999) ramène le chiffre précédent à 40 %, compte tenu de l'extrapolation des cas groupés à l'ensemble des cas, même sporadiques. Compte tenu du nombre important de cas rapporté aux gastroentérites à Norovirus aux États-Unis, la connaissance de la part attribuable à l'alimentation devient extrêmement importante afin de pouvoir comparer l'importance de différents germes transmis par voie alimentaire, entre, par exemple, virus et bactéries (Mead *et al.* 1999).

Dans le cas d'investigations des TIAC (Toxi-Infection Alimentaire Collective), on distingue les taux d'attaque primaires et secondaires. Le taux d'attaque primaire représente le pourcentage de personnes ayant consommé l'aliment contaminé (une fois enlevé le nombre de cas de personnes malades n'ayant pas consommé l'aliment et qui sont tombées malades durant la période d'observation) (Morton *et al.* 1998). Ce taux d'attaque primaire représente le pourcentage de malades imputables à la consommation d'aliments. Pour des populations fermées (école, bateau), il est aussi possible d'obtenir le taux d'attaque secondaire, déterminé après investigation des cas épidémiques, et d'estimer la durée de la période d'incubation (Morton *et al.* 1998). Le taux d'attaque secondaire est lié alors à la transmission inter-humaine qui peut suivre les premiers cas (ex : Norovirus).

Les taux d'attaque primaire sur Calicivirus mesurés au cours de différentes études étaient compris entre 23 et 93 % (médiane 60 %), le taux de transmission secondaire entre 4 et 32 % (Green *et al.* 2001). Pour l'Hépatite A, des phénomènes épidémiques d'origine alimentaire sur une population non immunisée peuvent atteindre une grande ampleur, comme à Shanghaï en 1988, où l'épidémie a atteint 300 000 personnes (Xu *et al.* 1992).

L'approche de l'investigation des TIAC est donc différente de l'étude de De Wit (2003) qui concerne l'investigation de cas sporadiques. L'extrapolation des résultats issus de ces cas groupés (TIAC) à l'ensemble des cas, et l'extrapolation d'un pays à l'autre, compte tenu des différences de surveillance, pose des difficultés spécifiques (De Wit *et al.* 2003).

**Parmi les cas de maladies attribués à un agent infectieux donné, la proportion de cas imputables à une origine alimentaire en France (InVS 2004) a été estimée à 14 % pour Norovirus et à 5 % pour l'Hépatite A, à partir des données de De Wit (2003).** L'eau de consommation n'est pas prise en compte dans ces estimations.

D'autres études estiment de façons encore différentes la part attribuable à l'alimentation par rapport au nombre de cas. Fiore (2004) attribue 2 % à 3 % des cas d'infection à l'hépatite A à une origine alimentaire.

En Australie, le pourcentage de cas de gastroentérites à Norovirus associées à une contamination des aliments, incluant la nourriture contaminée juste avant l'ingestion, et à de mauvaises pratiques d'hygiène en cuisine, a été estimé à 25 % (IC à 95 % entre 12-38 %), pour Rotavirus à 2 % (IC à 95 % entre 1-3 %), pour Astrovirus et Adénovirus à 1 % (IC à 95 % entre 2-18 %) (eau *a priori* exclue de l'analyse) (Flint *et al.* 2005, Hall *et al.* 2005).

Comme on peut le constater, la question de l'attribution des cas à une origine alimentaire pose encore des difficultés méthodologiques et pratiques pour les épidémiologistes (Batz *et al.* 2005). L'estimation de la part attribuable aux aliments dans l'estimation de la morbidité pour chaque agent est particulièrement importante lorsqu'il s'agit de hiérarchiser différentes maladies d'origine alimentaire et les mesures de lutte en résultant.

Lorsqu'il s'agit d'utiliser d'autres indicateurs sanitaires, en terme de coût économique, ou en DALY, (Haas *et al.* 1999) expliquaient déjà qu'on devait tenir compte de l'estimation des cas sporadiques-endémiques comme des cas épidémiques, que l'on devrait classer, selon les situations, comme résultant d'une contamination alimentaire ou non. L'estimation des coûts de l'épidémie de VHA dans la région des Pouilles en Italie, tient compte des cas liés à l'ingestion de l'aliment contaminé mais aussi de ceux qui ont attrapé la maladie par transmission secondaire inter-humaine (Lucioni *et al.* 1998).

Parmi ces cas épidémiques, certains sont des cas secondaires liés à un premier foyer d'origine alimentaire. Par exemple, au Japon, 60 % des cas d'épidémies à Norovirus sont attribués à une contamination initiale d'un aliment (Inouye *et al.* 2000). Le nombre de cas qui auraient pu être évités, dans ces épidémies, auraient pu l'être soit par l'absence de contamination des produits (foyer primaire) soit par de meilleures pratiques d'hygiène pour limiter la transmission secondaire inter-humaine (si l'on n'a pas pu empêcher le foyer primaire). Dans une étude hollandaise, menée en 2002, 12 % des épidémies liées à Norovirus étaient reliés à une contamination alimentaire initiale (van Duynhoven *et al.* 2005).

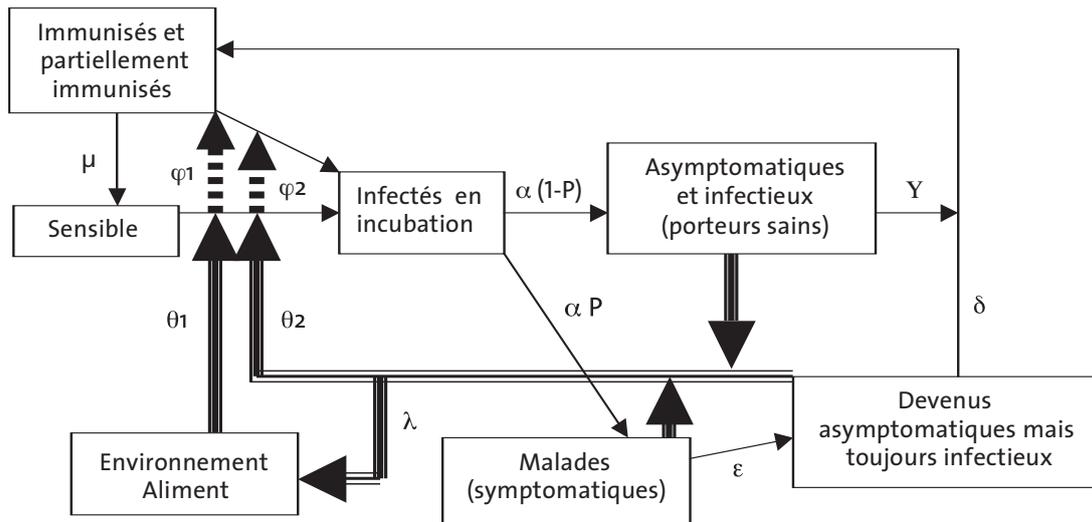
La modélisation des cas épidémiques et de la transmission secondaire pour des agents comme Norovirus, virus de l'hépatite A ou Rotavirus sont donc un enjeu important pour comprendre l'importance des ces maladies (Gordon *et al.* 1990). On peut noter que pour le cas particulier de l'hépatite E la transmission interhumaine est moins importante que pour les autres maladies, le taux d'attaque secondaire fréquemment rencontré étant inférieur à 2,5 % (Smith 2001).

On peut citer à ce propos les travaux récents d’O’Neill et de Marks (O’Neill & Marks 2005) et de Teunis (com.pers.) sur la transmission inter-humaine à Norovirus, et les travaux d’ Eisenberg (2004) sur Rotavirus.

Une évaluation des risques complète liée à l’ingestion d’un aliment ou de l’eau (Fewtrell & Bartram 2001) devrait tenir compte de la transmission secondaire (inter-humaine), de l’immunité, de la dynamique de population des pathogènes dans l’environnement (saisonnalité). Les premières approches de ce type ont été menées sur *Cryptosporidium* (Eisenberg *et al.* 1998, Eisenberg *et al.* 2005). La liste des paramètres à estimer pour la dynamique de maladie est rappelée dans le Tableau 47, sur l’exemple des entérovirus (Eisenberg *et al.* 2004).

Pour la modélisation, il faut aussi définir un état initial pour chacun des compartiments de la Figure 18 ci-après.

**Figure 18 : modèle de transmission d’infection à rotavirus et risque exprimé pour des populations humaines**



D’après (Eisenberg *et al.* 2004) - Les flèches pleines traduisent l’excrétion virale, les flèches fines les transitions d’un état à l’autre. Toutes les flèches sont des relations mathématiques et présupposent l’estimation de paramètres. Le modèle va différer selon les infections.

**Tableau 47 : résumé des paramètres à estimer pour décrire la dynamique de maladie des Entérovirus**

Description du paramètre	Symbole	Données nécessaires à l’estimation
Taux de transition pour sortir de la période d’incubation/jour	$\alpha$	Inverse de la période d’incubation
Taux de transition pour sortir de la période symptomatique/jour	$\varepsilon$	Inverse de la durée de la période symptomatique
Taux de transition pour sortir du statut excréteur à immunisé pour les porteurs sains/jour	$\gamma$	Inverse de la durée de la période d’excrétion pour les porteurs sains
Taux de transition pour sortir du statut excréteur à immunisé après la période symptomatique/jour	$\delta$	Inverse de la durée de la période d’excrétion après la phase symptomatique
Taux de transition pour passer du statut immunisé à sensible/jour	$\mu$	Inverse de la durée de la période d’immunité
Probabilité d’une réponse symptomatique/jour	$P$	Taux de morbidité
Nombre d’agents infectieux excrétés/jour dans l’environnement	$\lambda$	Mesure dans les selles
Taux de transmission inter-humaine entre personnes excrétrices et sensibles	$\varphi_2$	Fonction du nombre de contacts avec personnes excrétrices
Taux de transmission inter-humaine entre personnes excrétrices et partiellement immunisées	$\theta_2$	Estimé à partir du paramètre précédent
Taux de transmission des aliments aux personnes sensibles	$\varphi_1$	Fonction de différents paramètres (dont relation dose-infection)
Taux de transmission des aliments aux personnes partiellement immunisées	$\theta_1$	Fonction de différents paramètres (dont relation dose-infection)

D’après (Eisenberg *et al.* 2004)

## Question 8

Comme dans la publication de Ranta (2001) la publication d'Eisenberg (2004) traitant du risque d'infection à entérovirus à partir de l'ingestion accidentelle de sols contaminés par des enfants, introduit un modèle de dynamique de maladie, prenant en compte la transmission secondaire et le statut immunitaire des individus pour évaluer le nombre de nouveaux cas de maladie par an divisé par le total de la population exposée au risque (incidence cumulée), avec la prise en compte ou non d'une source de contamination environnementale (2 scénarios) (Eisenberg *et al.* 2004). Le nombre de cas attribuables à la source de contamination environnementale est obtenue par différence des résultats obtenus par les deux scénarios précédents (excès de risque attribuable). Ce type d'approche permet de mieux comparer ce qui est attribuable à une voie alimentaire de ce qui est attribuable à la transmission inter-humaine. **La validation de ce type d'approche nécessite cependant de connaître et de définir précisément l'incidence attribuable à différents types d'exposition dans les études épidémiologiques, en vue de les comparer aux résultats des approches AQR.**

### C.6 Conclusion

La caractérisation des dangers dans les publications d'AQR montre aussi des limites :

- afin de mener une approche la plus sécuritaire possible, la relation dose-infection de rotavirus est le plus souvent extrapolée à tous les virus transmissibles par voie alimentaire, avec une simplification de la relation mathématique qui n'est pas réellement satisfaisante (cf. Question 9) ;
- la relation dose-infection sur les autres principaux virus d'intérêt, à savoir les Calicivirus et les virus des hépatites ne sont pas actuellement disponibles. Il faudra, de toute façon, envisager de mieux valoriser ou de compléter les résultats d'études épidémiologiques en vue d'apporter les données permettant de valider ou de construire des modèles de relations dose-infection, dose-maladie, dose-mortalité, sur la population générale ou pour des populations plus sensibles ;
- la part attribuable aux aliments et la part attribuable à la transmission inter-humaine peuvent être étudiées par l'investigation épidémiologique, qui peut apporter des éléments à la modélisation. Suivant les méthodes et les critères, on peut noter que la part attribuable aux aliments pour un même virus peut être très différente (ex : Norovirus), ce qui pose problème. De nouvelles approches d'AQR permettront de voir l'effet immédiat de la contamination des aliments, mais aussi de comptabiliser les cas liés à une transmission secondaire inter-humaine. On aurait alors les moyens de mieux appréhender l'impact sanitaire d'une contamination alimentaire par ces virus ;
- de nouveaux indicateurs sanitaires sont définis par l'OMS, prenant en compte la sévérité et la durée des symptômes (DALY) ; là encore, les données françaises, qui ne sont pas actuellement disponibles, pourraient valider ou non les valeurs choisies sur le plan international pour tel ou tel virus responsable de gastroentérites.

## D. Caractérisation des risques

### D.1 Résultats sur le risque d'infection

Le calcul du risque annuel d'infection (comme de maladie, de décès) est calculé de la même façon dans les différentes publications. Le risque annuel P est calculé en fonction du risque quotidien Pi selon la formule ci-dessous :

$$P(\text{annuel}) = 1 - (1 - P_i)^{365}$$

Cette formule est valide si l'on admet que le risque est indépendant d'un jour à l'autre pour un individu et si l'on considère que le risque est constant au cours de l'année. Cette deuxième hypothèse est considérée comme difficilement acceptable pour décrire la situation d'un consommateur (dont la consommation varie d'un jour à l'autre) exposé à une contamination variable d'un jour à l'autre (Pouillot *et al.* 2002b).

Les résultats de ces calculs sont indiqués dans le Tableau 48. Compte tenu de toutes les limites évoquées plus haut, ces résultats n'ont qu'une valeur indicative, et ne sont pas forcément considérés comme valides ou extrapolables à la situation française.

Tableau 48 : calculs de risque quotidien et annuel d'infection

	Risque quotidien	Risque annuel	Référence
Rotavirus/ eau de distribution pour une concentration $2,22 \cdot 10^{-7}/L$	(2L par jour) $2,75 \cdot 10^{-7}$ (niveau acceptable pour l'US-EPA)	$10^{-4}$ (niveau acceptable)	(Regli <i>et al.</i> 1991)
Rotavirus (conc $0,004/L$ )/ eau de distribution	$4,90 \cdot 10^{-3}$ (conso journalière 2L)	$8,34 \cdot 10^{-1}$ (conso journalière 2L)	(Gerba <i>et al.</i> 1996b)
Entérovirus/Salades arrosées avec de l'eau traitée issue de station d'épuration (secondary treated municipal effluent)	$0,12$ à $0,5 \cdot 10^{-4}$ (99 <sup>e</sup> percentile) pour 100 g de laitue		(Petterson <i>et al.</i> 2001a)
Entérovirus (type rotavirus)/ coquillages (conso 60g, contamination 6pfu )	0,5		(Rose & Sobsey 1993)
VHA/coquillages (conso 60g, contamination 6pfu sur modèle échovirus-12)	0,01 (ou 1 %)		(Rose & Sobsey 1993)
Adénovirus/ Eau de distribution (consommation journalière 2 litres)	$8,34 \cdot 10^{-4}$ à $8,3 \cdot 10^{-3}$ pour 2L/j d'eau consommée suivant niveau de contamination	$2,63 \cdot 10^{-1}$	(Crabtree 1997)
VHA coquillages pour 120-150g (contamination à l'échelle mondiale)	0,005 (ou 0,5 %)		(Shuval 2003)
VHE coquillages (contamination à l'échelle mondiale)	0,005 (ou 0,5 %)		(Shuval 2003)

## D.2 Estimation des risques : les différentes approches méthodologiques

Les approches déterministes estiment le risque d'un effet à partir d'une valeur limite ou moyenne pour les différents modules de l'AQR. Le résultat attendu est alors une valeur sans intervalle de confiance ou de crédibilité. La plupart des publications en AQR virus/aliments sont faites à partir d'approches déterministes. Cependant, notamment sur rotavirus et pour d'autres relations dose-réponse on peut trouver une estimation de l'incertitude liée à la relation dose-réponse (Haas *et al.* 1993, Havelaar *et al.* 2000) ainsi que pour les relations liées à la survie virale (Petterson *et al.* 2001a). Les études de sensibilité, sauf exception, comme celle d'Eisenberg (2004) qui ne traite d'ailleurs pas d'un aliment « volontairement ingéré » (et est donc absente du tableau) sont globalement absentes des analyses réalisées.

En résumé, la méthode suivie dans les principales publications internationales d'évaluation de risques appliquées aux virus dans les aliments est rappelée dans le Tableau 49 ci-après.

**Tableau 49 : approche méthodologique utilisée dans les principales publications internationales d'évaluation de risques appliquées aux virus dans les aliments**

Publication	Objet	Approche déterministe	Approche stochastique		
			Prise en compte incertitude et variabilité	Deuxième ordre	Commentaire
(Regli <i>et al.</i> 1991)	Eau de distribution/ Rotavirus	Valeurs extrêmes	Non	Non	
(Rose & Sobsey 1993)	Coquillages/ Rotavirus et VHA	Valeurs extrêmes	Non	Non	
(Shuval 2003)	Coquillages/ VHA et VHE	Valeurs extrêmes	Non	Non	
(Pettersson <i>et al.</i> 2001a)	Salades/ Entérovirus	Non	Oui : prise en compte variabilité de contamination, incertitude sur paramètre décroissance (scénarios)	Non	Approche d'une analyse de sensibilité
(Crabtree 1997)	Adénovirus/ eau de distribution	Valeurs extrêmes	Non	Non	
(Ranta <i>et al.</i> 2001)	Poliovirus/ eau de distribution		Oui : dynamique de maladie et capacités de détection (scénarios)	Non	Approche population dynamique de maladie
(WHO 2004)	Rotavirus/ eau de distribution	Valeurs guides	Non	Non	
(Fewtrell & Bartram 2001)	VHA/salades avec de l'eau non traitée	Valeurs guides	Non	Non	Exemple d'approche pour des valeurs hypothétiques
(Canivet 2005)	Rotavirus/ culture cellulaire/ eau de distribution	Valeurs guide	Oui	Oui	Approximation Furumoto-Mickey de la dose-réponse

Globalement les appréciations quantitatives de risques publiées raisonnent sur le risque individuel. Une personne âgée n'aura pas forcément le même risque d'infection qu'une personne jeune ou immunodéprimée, et les conséquences de l'infection ne seront pas les mêmes dans les pays développés ou en développement (Gerba *et al.* 1996b, Crabtree 1997, Shuval 2003).

La publication de Ranta (2001) est différente dans le sens où elle s'intéresse non plus au risque de l'individu mais au risque lié à une population au cours d'endémie ou d'épidémie, cette population excréant des particules virales de façon transitoire en quantité variable. **Les approches de risque pour les « populations »** sont intéressantes lorsque la dynamique de l'évolution des épidémies (et l'état immunitaire des populations ou le nombre de cas secondaires) est susceptible d'influer sur le résultat recherché. Dans la publication de Ranta, (2001) cette approche était importante puisqu'il s'agissait d'estimer le nombre de particules virales et leur dynamique dans les stations d'épuration.

Enfin parmi les publications traitant du risque d'infection virale, certaines utilisent des modèles environnementaux pour estimer une exposition alimentaire. On peut citer deux publications, Bassi, (2002), Schernewski et Julich (2001) qui utilisent des résultats de modèles de diffusion (modèles hydrodynamiques marins, modèles d'infiltration des sols) afin de mieux caractériser l'exposition (Schernewski & Julich 2001, Bassi 2002).

### D.3 Questions de gestion pouvant être menées par des approches AQR et par type d'aliment

Afin d'identifier les questions pouvant être menées par des approches AQR, l'approche par type d'aliment s'impose. Un certain nombre de mesures de gestion visera à diminuer l'exposition à différents niveaux, soit en diminuant la contamination accidentelle des produits, soit en incitant à davantage de mesures d'hygiène dans la préparation des aliments. Les mesures préventives par vaccination ne seront pas envisagées ici.

Le choix des aliments correspond à ceux choisis dans les approches AQR publiées : eau de distribution, produits végétaux et coquillages (Tableau 43).

Dans les figures ci-après (Figure 19, Figure 20 et Figure 21) parmi les questions de gestion, apparaît en plein ce qui a déjà été traité dans les AQR publiés, et en italique ce qu'il serait souhaitable ou envisageable d'aborder. On s'aperçoit que très peu de questions ont été traitées à ce jour par des approches AQR.

Ces figures indiquent aussi les données ayant servi à des approches AQR. Là encore les données utilisées sont le plus souvent théoriques, estimées en moyenne à partir d'indicateurs, sur certaines phases de la production au lieu d'être issues de données observées.

Les modes de contamination envisagés sont de plusieurs natures : des contaminations aiguës, saisonnières ou chroniques, des contaminations « attendues » résiduelles (flèches pleines) ou des contaminations par des by-pass, comme par exemple une rupture de canalisation qui pourrait court-circuiter deux compartiments habituellement séparés, comme celui des eaux usées ou des eaux potables. L'estimation des deux modes possibles de contamination, reliée à la fréquence de tels événements, peut apporter des éléments intéressants pour la gestion du risque. L'estimation des contaminations par by-pass est parfois prise en compte dans les approches AQR.

Il faut aussi ne pas perdre de vue que les modèles conceptuels ci-dessous sont bien évidemment une simplification du monde réel. On a déjà cité dans les paragraphes « consommation de coquillages » et « préparation des aliments par le consommateur ou l'industrie agroalimentaire » les approches en population, qui tiennent compte de l'immunité, etc. Mais il faut aussi être conscient que pour un même virus responsable de gastroentérites, la population peut être exposée par différents types d'aliments. Parmi les aliments, certains n'ont pas été cités ici, comme la viande pour certains virus potentiellement zoonotiques (Ijaz *et al.* 2005).

Enfin une contamination microbiologique par exemple de l'eau de distribution est souvent poly-microbienne (InVS & CIRE SudOuest 2000, InVS & CIRE Saône-et-Loire 2001, InVS & Rhône-Alpes. 2002).

Les interactions entre agents infectieux sont souvent mal connues et ne sont donc pas pour l'instant prises en compte. Les variabilités spatiale et temporelle (saisonnalité) ne sont pas ou peu abordées, alors que leur importance est forte dans le domaine viral (Kohli *et al.* 2001).

Les modèles d'AQR ne sont pas en mesure de répondre aux questions pour lesquelles on ne dispose pas d'un minimum d'information.

Figure 19 : les différentes approches d'AQR dans l'eau de distribution

**Question 8**

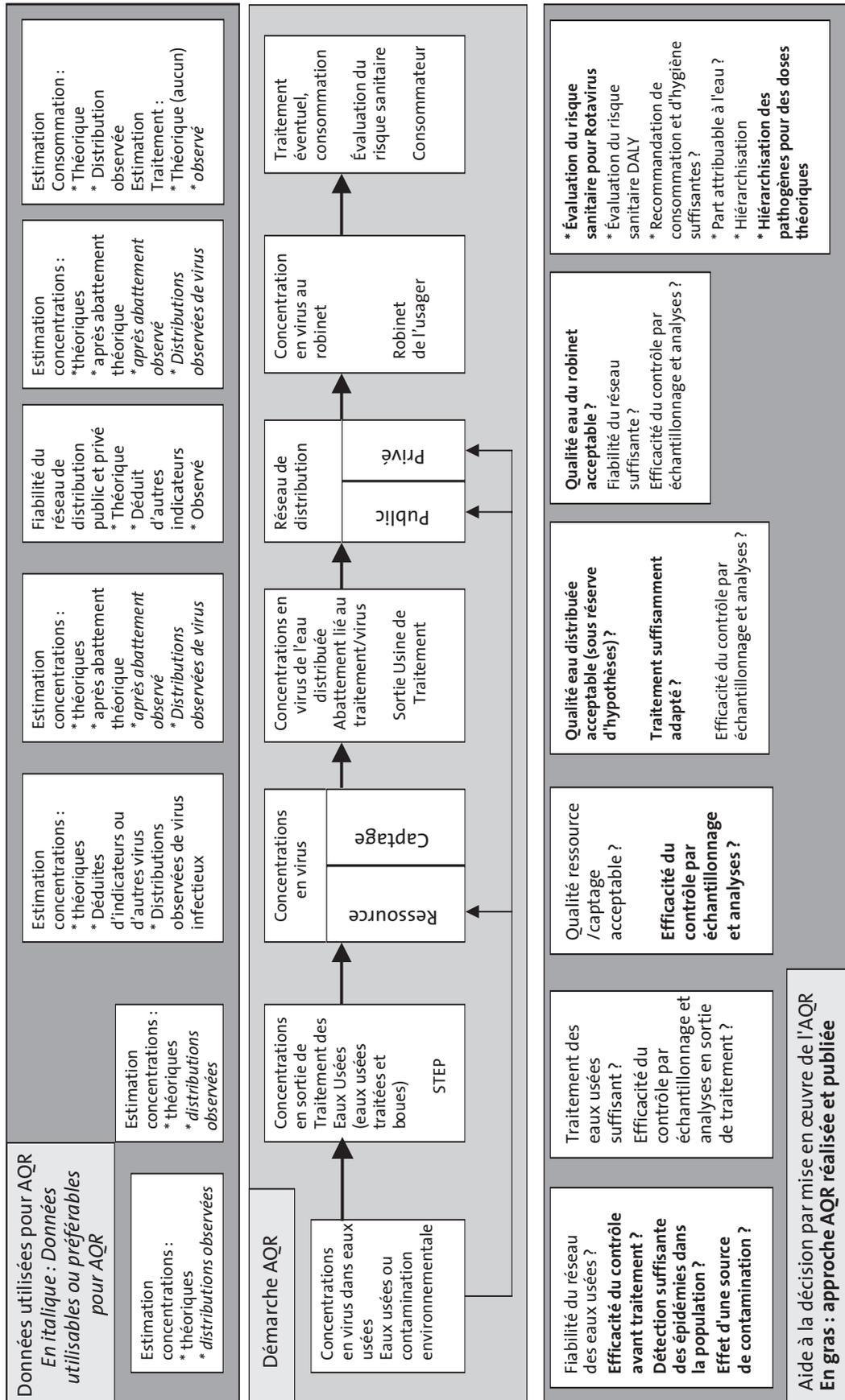
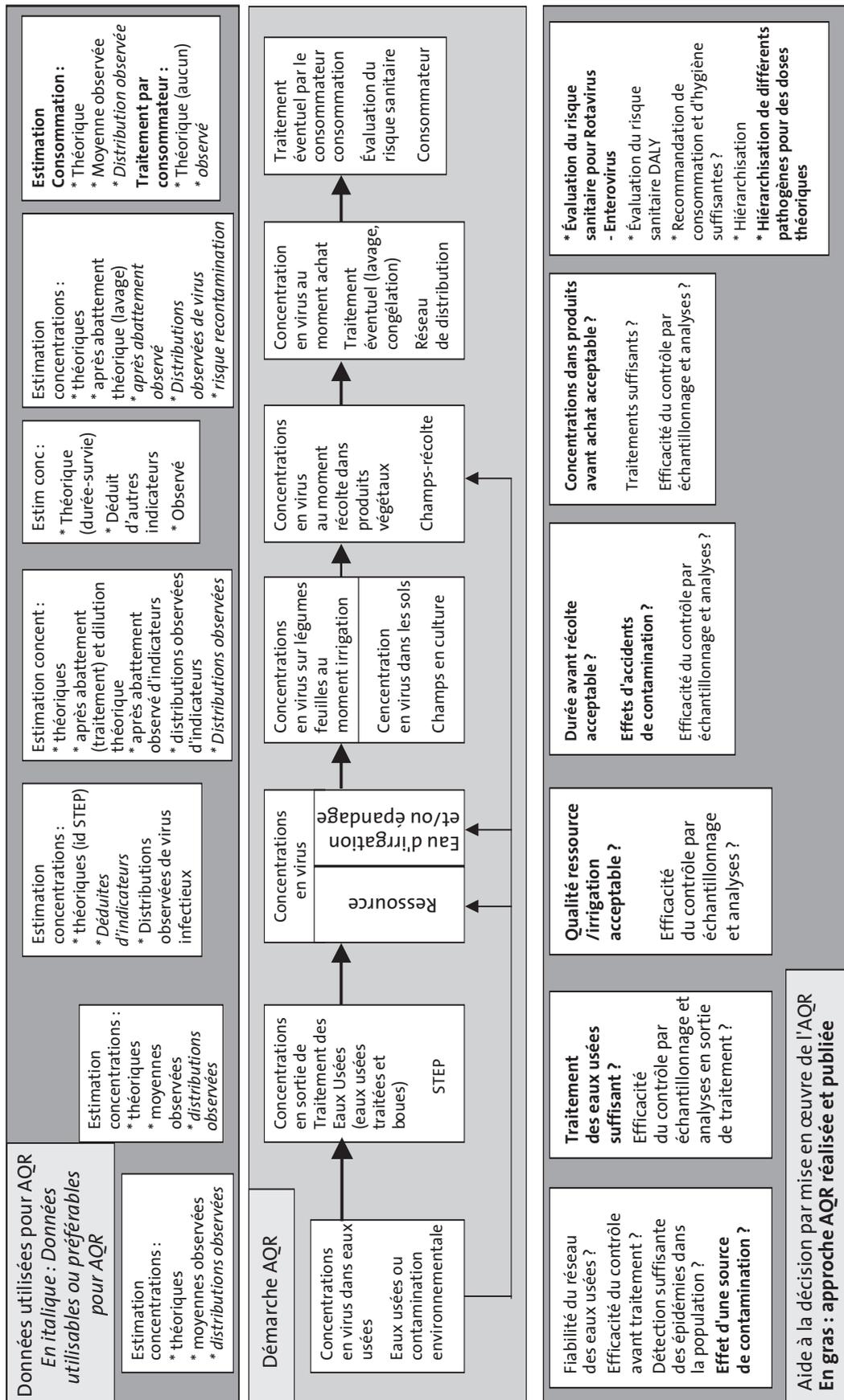
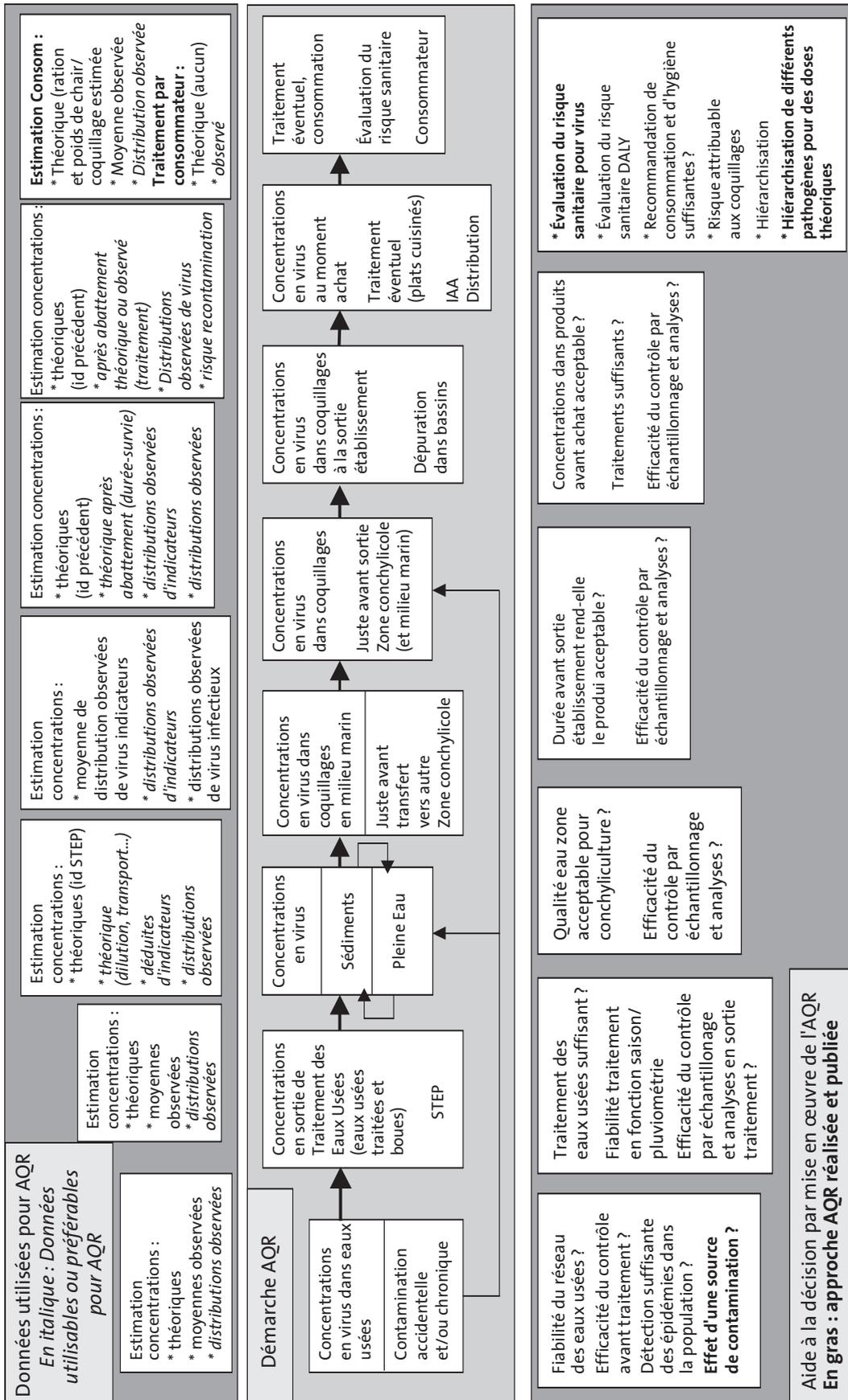


Figure 20 : les différentes approches AQR dans les produits végétaux et salades, carottes, radis, framboises



Question 8

Figure 21 : les différentes approches AQR dans les coquillages



## E. Conclusions - perspectives

Les différentes parties du rapport dressent un état des lieux des objectifs potentiels d'une AQR et des données disponibles pour la mener à bien. La question 8 se focalise sur les AQR existantes concernant les virus présents dans les aliments et l'eau.

Les **principales limites rencontrées dans les AQR présentées dans cette question** sont probablement l'existence de données fiables de contamination des aliments et de relations dose-réponse validées, mais aussi le manque de connaissances sur un ensemble d'autres facteurs comme les performances des outils de détection, sur les capacités de survie des virus dans différents environnements, sur la circulation du virus dans les populations humaines (morbidité-mortalité liée à un virus donné et à une matrice donnée), sur la virulence des différents variants et la sensibilité des populations. Enfin si les virus ne se multiplient pas dans les aliments concernés, ce qui peut simplifier l'AQR, le manque d'outil de quantification du matériel infectieux pour un certain nombre de virus est sans doute une sérieuse limite pour l'évaluation quantitative des risques.

Malgré leur faiblesse méthodologique au vu d'autres évaluations de risques menées en microbiologie, il faut constater qu'un certain nombre d'évaluations de risque dans le domaine viral servent de référence, notamment pour la définition de concentrations acceptables (Regli *et al.* 1991). Il est possible qu'on puisse dans certains cas améliorer les modèles d'évaluation de risque existants sur le plan international.

Parmi les facteurs limitants de l'AQR on peut noter prioritairement le **manque de données sur l'exposition** :

- le manque de **données fiables de contamination** de l'eau et des aliments et le manque de données reliant de façon fiable des indicateurs et une contamination virale ne permettent pas de mener à bien une AQR. De plus, pour les virus non cultivables, la relation génome infectieux/non infectieux ne peut être établie. En outre, il convient de souligner l'absence de standardisation des techniques de quantification et l'absence de données fiables sur la survie avec et sans traitement ;
- par ailleurs, il est complexe de connaître précisément la **répartition à l'échelon national de la population** en fonction du type de ressources, de leur vulnérabilité par rapport au virus et des types de traitement de potabilisation ;
- enfin, les **données de consommation** sont moins limitantes pour l'eau ou la consommation de végétaux, mais sont difficiles à établir dans le domaine de la consommation de coquillages (très forte variabilité spatiale et temporelle de la consommation), ou si l'on doit tenir compte de la préparation des aliments.

La partie **caractérisation des dangers** pourrait être affinée mais ne pose pas de difficultés particulières en comparaison à d'autres agents microbiens. Il faut cependant souligner qu'assimiler la relation dose-infection de tous les virus par celle des Rotavirus est une hypothèse très sécuritaire, et qu'il n'existe pas de dose-réponse établie pour les principaux virus d'intérêt à transmission alimentaire, à savoir Norovirus, VHA, VHE. D'autre part, la prise en compte de la transmission inter-humaine secondaire demandera des développements méthodologiques spécifiques. L'identification d'un couple potentiel virus-aliment pouvant être utilisé pour une évaluation quantitative des risques relève d'une autre démarche (CFSAN 2002). Il faut aussi clairement identifier la population cible pour un couple virus-élément, et en particulier préciser la classe d'âge, le statut immunitaire, la localisation de la population, voire la réceptivité de la population que l'on souhaite étudier.

Sous réserve de l'acceptation d'un certain nombre d'hypothèses (**cf. Question 9**), des évaluations quantitatives de risque sont actuellement réalisables pour les virus, pour un certain nombre de matrices (eau, produits végétaux), pour des données de contamination théoriques ou approximées. On notera cependant que les données sont moins bien établies que pour d'autres agents infectieux comme *Cryptosporidium*.

## Références bibliographiques

**Adak, G.K., Caul, E.O. & Cowden, J.M. 1991.** Infection with small round structured viruses: England and Wales 1981-1990. *CDR (Lond Engl Rev)* 1 (13), R141-144.

**Afssa 2002.** Rapport sur les infections à protozoaires liées aux aliments et à l'eau : évaluation scientifique des risques associés à *Cryptosporidium* sp. Afssa. 185 p.

**Afssa 2004.** Appréciation des risques alimentaires liés aux Campylobacters. Afssa. 96 p.

**Balbus, J., Parkin, R., Makri, A., Ragain, L., Embrey, M. & Hauchman, F. 2004.** Defining susceptibility for microbial risk assessment : results of a workshop. *Risk Anal* 24 (1), 197-208.

**Bassi, C. 2002.** Éléments d'évaluation du risque sanitaire lié à l'infiltration des eaux usées dans les nappes. École Nationale de Santé Publique. 100 p p.

**Batz, M.B., Doyle, M.P., Morris, G., Jr., Painter, J., Singh, R., Tauxe, R.V., Taylor, M.R. & Wong, D.M. 2005.** Attributing illness to food. *Emerg Infect Dis* 11 (7), 993-999.

**Beauudeau, P.Z., A., Ledrans, M., Volatier, J.L. 2003.** Consommation d'eau du robinet pour la boisson en France métropolitaine : résultats tirés de l'enquête alimentaire INCA1. *Environnement, Risques et Santé* 2 (3), 147-157.

**Brooks, J.P., Tanner, B.D., Josephson, K.L., Gerba, C.P., Haas, C.N. & Pepper, I.L. 2005.** A national study on the residential impact of biological aerosols from the land application of biosolids. *J Appl Microbiol* 99 (2), 310-322.

**Canivet, N. 2005.** Application de la démarche AQR aux paramètres microbiologiques de l'eau de distribution publique. Rapport Afssa-ENGREF-ISAA. 157 p p.

**CFSAN 2002.** A decision based approach to identify and select risk assessments. FDA. 8 p.

**Comité-Santé, F. 2003.** La qualité virologique de l'eau potable document pour commentaires publics. Comité Fédéral Santé Canada. 26 p.

**Couch, R.B., Cate, T.R., Gerone, P.J., Fleet, W.F., Lang, D.J., Griffith, W.R. & Knight, V. 1965.** Production of Illness with a Small-Particle Aerosol of Coxsackie A21. *J Clin Invest* 44, 535-542.

**Couch, R.B., Cate, T.R., Douglas, R.G., Jr., Gerone, P.J. & Knight, V. 1966.** Effect of route of inoculation on experimental respiratory viral disease in volunteers and evidence for airborne transmission. *Bacteriol Rev* 30 (3), 517-529.

**Crabtree, K.D., Gerba, C.P., Rose, J.B., Haas, C.N. 1997.** Waterborne adenovirus : a risk assessment. *Wat. Sci. Tech.* 35 (11-12), 1-6.

**De Wit, M., Koopmans, M. & van Duynhoven, Y. 2003.** Risk factors for Norovirus, Sapporo-like virus and Group A rotavirus gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases* 9 (12).

**Dee, D.P. 1995.** A pragmatic approach to model validation. In *Quantitative skill assessment of coastal ocean models*. Davies, L.a. (ed). Washington DC, Lynch and Davies, pp. 1-13.

**Delignette-Muller, M.L., Leclerc, V. & Pardon, P. 2003.** Relation dose-réponse. In *Bilan des connaissances relatives aux STEC*. Afssa (ed). Paris, Afssa, pp. 164-167.

**Desenclos, J.C. 1996.** Épidémiologie des risques toxiques et infectieux liés à la consommation de coquillages. *Rev. Epidemiol. Sante. Publique* 44, 437-454.

**Dufour, A., Snozzi, M., Koster, W., Bartram, J., Ronchi, E. & Fewtrell, L. 2003.** *Assessing microbial safety of drinking water : improving approaches and methods*. London, IWA. 295 p p.

**Eisenberg, J.N., Soller, J.A., Scott, J., Eisenberg, D.M. & Colford, J.M., Jr. 2004.** A dynamic model to assess microbial health risks associated with beneficial uses of biosolids. *Risk Anal* 24 (1), 221-236.

**Eisenberg, J.N., Lei, X., Hubbard, A.H., Brookhart, M.A. & Colford, J.M., Jr. 2005.** The role of disease transmission and conferred immunity in outbreaks: analysis of the 1993 *Cryptosporidium* outbreak in Milwaukee, Wisconsin. *Am J Epidemiol* 161 (1), 62-72.

- Eisenberg, J.N.S., Seto, E.Y.W., Colford, J., Olivieri, A.W. & Spear, R.C. 1998.** An analysis of Milwaukee *Cryptosporidium* outbreak based on dynamic model of disease transmission. *Epidemiology* 9 (3), 255-263.
- Fankhauser, R.L., Noel, J.S., Monroe, S.S., Ando, T. & Glass, R.I. 1998.** Molecular epidemiology of « Norwalk-like viruses » in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 178 (6), 1571-1578.
- FAO/OMS 1995.** Application of risk analysis to food standards issues. FAO/OMS
- FAO/OMS 2002.** Risk assessment of Salmonella in eggs and broiler chickens
- FAO/OMS 2003.** Hazard characterization for pathogens in food and water. Rome, FAO/OMS. 77 p.
- Fewtrell, L. & Bartram, J. 2001.** *Water quality : guidelines, standards and health. assessment of risk and risk management for water related infectious disease.* London, IWA Publishing. 424 p.
- Fiore, A.E. 2004.** Hepatitis A transmitted by food. *Clin Infect Dis* 38 (5), 705-715.
- Flint, J.A., Van Duynhoven, Y.T., Angulo, F.J., DeLong, S.M., Braun, P., Kirk, M., Scallan, E., Fitzgerald, M., Adak, G.K., Sockett, P., Ellis, A., Hall, G., Gargouri, N., Walke, H. & Braam, P. 2005.** Estimating the burden of acute gastroenteritis, foodborne disease, and pathogens commonly transmitted by food: an international review. *Clin Infect Dis* 41 (5), 698-704.
- Frey, H.C. & Sumeet, R.P. 2002.** Identification and review of sensitivity analysis methods. *Risk Analysis* 22 (3), 553-577.
- Furumoto, W.A. & Mickey, R. 1967.** A mathematical model for the infectivity-dilution curve of Tobacco Mosaic virus : theoretical considerations. *Virology* (32), 216-223.
- Gale, P. 2003.** Developing risk assessments of waterborne microbial contaminations. In *Water and Wastewater microbiology.* Elsevier (ed). London, pp. 263-280.
- Gale, P. 2005.** Land application of treated sewage sludge: quantifying pathogen risks from consumption of crops. *J Appl Microbiol* 98 (2), 380-396.
- Gerba, C., Rose, J.B. & Haas, C.N. 1996a.** Sensitive populations : who is at greatest risk? *Int Journal of Food Microbiology* (30), 113-123.
- Gerba, C.P., Rose, J.B., Haas, C.N. & Crabtree, K.D. 1996b.** Waterborne rotavirus : a risk assessment. *Wat. Res.* 30 (12), 2929-2940.
- Giovannini, A., Prencipe, V., Conte, A., Marino, L., Petrini, A. & Pomilio, F. 2004.** Quantitative risk assesment of salmonella spp infection for the consumer of pork products in an italian region. *Food control* 15, 139-144.
- Gofti, L., Zmirou, D., Seigle Murandi, F., Hartemann, P. & Potelon, J.L. 1999.** Évaluation du risque microbiologique d'origine hydrique : un état de l'art et des perspectives. *Rev. Epidemiol. Sante. Publique* 47, 61-73.
- Gofti-Laroche, L. 2001.** Évaluation du risque microbiologique hydrique : validation épidémiologique des fonctions dose -réponse du risque viral et parasitaire - Étude EMIRA. In *Biologie, Médecine et Santé*, Grenoble I, pp. 260 p.
- Gofti-Laroche, L., Potelon J.L., Da Silva, E. & Zmirou, D. 2001.** Description de la consommation d'eau de boisson dans certaines communes françaises (étude EMIRA). *Rev. Epidemiol. Sante. Publique* 49, 411-422.
- Gordon, S.M., Oshiro, L.S., Jarvis, W.R., Donenfeld, D., Ho, M.S., Taylor, F., Greenberg, H.B., Glass, R., Madore, H.P., Dolin, R. & et al. 1990.** Foodborne Snow Mountain agent gastroenteritis with secondary person-to-person spread in a retirement community. *Am J Epidemiol* 131 (4), 702-710.
- Green, K.Y., Chanock, R.M. & Kapikian, A.Z. 2001.** Human Caliciviruses. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins.
- Haas, C., N., Rose, J., B. & Gerba, C., P. 1999.** Quantitative microbial risk assessment, John Wiley and Sons, Inc. 449 p.
- Haas, C.N. 1983.** Estimation of risk due to low doses of microorganisms: a comparison of alternative methodologies. *American Journal of Epidemiology* (118), 573-582.
- Haas, C.N., Rose, J.B., Gerba, C. & Regli, S. 1993.** Risk assessment of viruses in drinking water. *Risk Analysis* 13 (5), 545-552.

**Question 8**

**Haas, C.N. & Rose, J.B. 1994.** Reconciliation of microbial risk models and outbreak epidemiology: the case of Milwaukee outbreak. *Ann. Conf. AWWA*. New York.

**Haas, C.N. 2002.** Conditional dose-response relationships for microorganisms: development and application. *Risk Anal* 22 (3), 455-463.

**Hall, G., Kirk, M.D., Becker, N., Gregory, J.E., Unicomb, L., Millard, G., Stafford, R. & Lalor, K. 2005.** Estimating foodborne gastroenteritis, Australia. *Emerg Infect Dis* 11 (8), 1257-1264.

**Havelaar, A.H., De Hollander, A.E., Teunis, P.F., Evers, E.G., Van Kranen, H.J., Versteegh, J.F., Van Koten, J.E. & Slob, W. 2000.** Balancing the risks and benefits of drinking water disinfection: disability adjusted life-years on the scale. *Environ Health Perspect* 108 (4), 315-321.

**Havelaar, A.H. & Melse, J.M. 2003.** Quantifying public health risk in the WHO guidelines for drinking water quality: a burden of disease approach. RIVM report 734301022. 49 p p.

**Homedes, N.** The disability-adjusted life year (DALY) definition measurement and potential use. Consulté le 2004. Dernière mise à jour.

**Ijaz, S., Arnold, E., Banks, M., Bendall, R.P., Cramp, M.E., Cunningham, R., Dalton, H.R., Harrison, T.J., Hill, S.F., Macfarlane, L., Meigh, R.E., Shafi, S., Sheppard, M.J., Smithson, J., Wilson, M.P. & Teo, C.G. 2005.** Non-travel-associated hepatitis e in England and wales: demographic, clinical, and molecular epidemiological characteristics. *J Infect Dis* 192 (7), 1166-1172.

**Inouye, S., Yamashita, K., Yamadera, S., Yoshikawa, M., Kato, N. & Okabe, N. 2000.** Surveillance of viral gastroenteritis in Japan: pediatric cases and outbreak incidents. *J Infect Dis* 181 Suppl 2, S270-274.

**InVS & CIRE SudOuest 2000.** Épidémie de gastro-entérite à germes multiples liés à la consommation de l'eau de distribution, Gourdon. 48 p.

**InVS & CIRE Saône-et-Loire 2001.** Épidémie de gastroentérite à *Cryptosporidium*, Dracy-Le-Fort. 71 p.

**InVS & Rhône-Alpes., C. 2002.** Épidémie de gastro-entérite en Isère. 36 p.

**InVS 2004.** Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France. 192 p.

**Jammal, A., Allard, R. & Loslier, G. 1988.** *Dictionnaire d'Épidémiologie*. Paris, EDISEM-MALOINE. 171 p.

**Jenicek, M. & Cléroux, R. 1982.** Épidémiologie : principes, techniques, applications. St. Hyacinthe, Qué, Edisem inc. 454 p.

**Katz, M. & Plotkin, S.A. 1967.** Minimal infective dose of attenuated poliovirus for man. *Am J Public Health Nations Health* 57 (10), 1837-1840.

**Kohli, E., Bon, F. & Pothier, P. 2001.** Les principaux virus de gastro-entérites chez l'homme. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* 16 (2), 97-102.

**Lepow, M.L., Warren, R.J., Ingram, V.G., Daugherty, S.C., Robbins, F.C. & Cleveland, M.D. 1962.** Sabin type I (L5c2ab) Oral Poliomyelitis vaccine. *Am J of Diseases of children* 104, 67-71.

**Lopman, B.A., Adak, G.K., Reacher, M.H. & Brown, D.W. 2003.** Two epidemiologic patterns of norovirus outbreaks: surveillance in England and wales, 1992-2000. *Emerg Infect Dis* 9 (1), 71-77.

**Lucioni, C., Cipriani, V., Mazzi, S. & Panunzio, M. 1998.** Cost of an outbreak of hepatitis A in Puglia, Italy. *Pharmacoeconomics* 13 (2), 257-266.

**Macler, B.A. & Regli, S. 1993.** Use of microbial risk assessment in setting US drinking water standards. *Int J Food Microbiol* 18 (4), 245-256.

**Marks, P.J., Vipond, I.B., Regan, F.M., Wedgwood, K., Fey, R.E. & Caul, E.O. 2003.** A school outbreak of Norwalk-like virus: evidence for airborne transmission. *Epidemiol Infect* 131 (1), 727-736.

**Maul, A. 1991.** Échantillonnage et inférence statistique. In *Virologie des milieux hydriques*. Doc, T.a. (ed). Paris, Lavoisier, pp. 35-69.

- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M. & Tauxe, R.V. 1999.** Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5 (5), 607-625.
- Melliez, H., Boelle, P.-Y., Baron, S., Mouton, Y. & Yazdanpanah, Y. 2005.** Mortalité, morbidité et coût des infections à rotavirus en France. *Bull Epid Hebd* (35), 175-176.
- Minor, T.E., Allen, C.I., Tsiatis, A.A., Nelson, D.B. & D'Alessio, D.J. 1981.** Human infective dose determinations for oral poliovirus type 1 vaccine in infants. *J Clin Microbiol* 13 (2), 388-389.
- Moe, C., Teunis, P., Lindesmith, L., Collins McNeal, E.J., Le Pendu, J., Treanor, J., Herrmann, L., Blacklow, N.R. & Baric, R. 2004.** Norovirus Dose Response. Second International Calicivirus conference. Dijon.
- Morton, R., F., Richard Hebel, J. & McCarter, R., J. 1998.** *Épidémiologie et biostatistique*. Vélizy, France, Doin. 255 p.
- Murray, C.J. & Lopez, A.D. 1997.** Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349 (9063), 1436-1442.
- Nauta, M.J. 2000.** Separation of uncertainty and variability in quantitative microbial risk assessment models. *International Journal of food Microbiology* 57, 9-18.
- OMS 2003.** Guidelines for drinking water quality p.
- OMS-OCDE 2003.** Assessing microbial safety of drinking water. London, IWA. 295 p.
- O'Neill, P.D. & Marks, P.J. 2005.** Bayesian model choice and infection route modelling in an outbreak of Norovirus. *Stat Med* 24 (13), 2011-2024.
- Oscar, T. 2004.** Dose-response model for 13 strains of salmonella. *Risk Anal* 24 (1), 41-49.
- Payment, P., Trudel, M. & Plante, R. 1985.** Elimination of viruses and indicator bacteria at each step of treatment during preparation of drinking water at seven water treatment plants. *Appl Environ Microbiol* 49 (6), 1418-1428.
- Payment, P., Richardson, J., Siemiatycki, J. & Dewar, R. 1991.** A randomized trial to evaluate the risk of gastrointestinal disease due to consumption of drinking water meeting current microbiological standards. *Am J of Public Health* 81 (6), 703-708.
- Perz, J.F., Ennever, F.K. & Le Blancq, S.M. 1998.** *Cryptosporidium* in tap water: comparison of predicted risks with observed levels of disease. *Am J Epidemiol* 147 (3), 289-301.
- Petterson, S.R. & Ashbolt, N.J. 2001.** Viral risks associated with wastewater reuse : modelling virus persistence on wastewater irrigated salad crops. In *Water Science and Technology*. Vol. 43. OMS (ed). London, IWA Publishing, pp. 23-26.
- Petterson, S.R., Ashbolt, N.J. & Sharma, A. 2001a.** Microbial Risks from Wastewater irrigation of salad crops : a screening-level risk assessment. *Water Environment Research* 72 (6), 667-672.
- Petterson, S.R., Teunis, P.F. & Ashbolt, N.J. 2001b.** Modeling virus inactivation on salad crops using microbial count data. *Risk Anal* 21 (6), 1097-1108.
- Pouillot, R., Beaudreau, P., Roze, S. & Derouin, F. 2002a.** Évaluation quantitative du risque sanitaire lié à la présence de *Cryptosporidium* sp dans l'eau distribuée. Afssa. 57 p.
- Pouillot, R., Gerbier, G. & Gardner, A. 2002b.** « TAGS » a program for the evaluation of test accuracy in the absence of a gold standard. *Preventive Veterinary Medicine* 53, 67-81.
- Pouillot, R., Albert, I., Cornu, M. & Denis, J.B. 2003.** Estimation of uncertainty and variability in bacterial growth using bayesian inference. Application to *Listeria monocytogenes*. *International Journal of food Microbiology* 81, 87-104.
- Pouillot, R., Beaudreau, P., Denis, J.B. & Derouin, F. 2004.** A quantitative risk assessment of waterborne cryptosporidiosis in France using second-order Monte Carlo simulation. *Risk Anal* 24 (1), 1-17.
- Pruss, A. & Havelaar, A.H. 2001.** The global burden of disease study and applications in water, sanitation and hygiene. In *Water Quality : guidelines, standards and health*. Fewtrell, L. & Bartram, J. (eds). London, IWA.

**Question 8**

**Rai, S.N., Krewski, D. & Bartlett, S. 1996.** A general framework for the analysis of uncertainty and variability in risk assessment. *Human and Ecological Risk Assessment* 2 (4), 972-989.

**Ranta, J., Hovi, T. & Arjas, E. 2001.** Poliovirus surveillance by examining sewage water specimens : studies on detection probability using simulations models. *Risk Analysis* 21 (6), 1087-1096.

**Regli, S., Rose, J.B., Haas, C.N. & Gerba, C.P. 1991.** Modeling the risk from Giardia and viruses in drinking water. *Journal of the American Water.*

**Rose, J.B. & Sobsey, M. 1993.** Quantitative Risk assessment for viral contamination of shellfish and coastal waters. *Journal of Food Protection* 56 (12), 1043-1050.

**Schernewski, G. & Julich, W.-D. 2001.** Risk assessment of virus infections in the Oder estuary (southern baltic) on the basis of spatial transport and virus decay simulations. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 203, 317-325.

**Schiff, G.M., Stefanovic, E.C., Young, D.S., Sander, J.K. & Ward, R.L. 1984.** Studies of Echovirus 12 in volunteers : determination of minimal infectious dose and the effect of previous infection on infectious dose. *Journal of Infectious Disease* (150), 858-866.

**Schwarzinger, M., Stouthard, M.E., Burstrom, K. & Nord, E. 2003.** Cross-national agreement on disability weights: the European Disability Weights Project. *Popul Health Metr* 1 (1), 9.

**Shaw, I., Greening, G., Lake, R., Hudson, A., Cressey, P. & Nortje, G. 2003.** Risk-profile : Norwalk-like virus in mollusca (raw). NZ-FSA. 41 p.

**Shuval, H., Lampert, Y. & Fattal, B. 1997.** Development of a risk assessment approach for evaluating wastewater reuse standards for agriculture. *Water Science and Technology* 35, 11-12.

**Shuval, H. 2003.** Estimating the global burden of thalassogenic diseases : human infectious diseases caused by waste water pollution of marine environment. *Journal of Water and Health* 1 (2), 53-64.

**Shuval, H. & Fattal, B. 2003.** Control of pathogenic microorganisms in wastewater recycling and reuse in agriculture. In *The handbook of water and wastewater microbiology*. London, Elsevier, pp. 240-262.

**Shwartzbrod, L. 1995.** Effect of human viruses on public health associated with the use of wastewater and sewage sludge in agriculture and aquaculture. WHO p.

**Sinclair, M.I. & Fairley, C.K. 2000.** Drinking water and endemic gastrointestinal illness. *J Epidemiol Community Health* 54 (10), 728.

**Smith, J.L. 2001.** A review of hepatitis E virus. *J Food Prot* 64 (4), 572-586.

**Teunis, P.F. & Havelaar, A.H. 1999.** *Cryptosporidium* in drinking water : evaluation of ILSI/RSI quantitative risk assessment framework. RIVM report n°284550006. 100p p.

**Teunis, P.F. & Havelaar, A.H. 2000.** The Beta Poisson dose-response model is not a single-hit model. *Risk Anal* 20 (4), 513-520.

**Urban, S. 2003.** Étude comparative des données d'exposition et de mode de vie disponibles en France et dans d'autres pays développés en vue de l'évaluation de l'exposition humaine. École Nationale de la Santé Publique. 101 p.

**van den Brandhof, W.E., De Wit, G.A., de Wit, M.A. & van Duynhoven, Y.T. 2004.** Costs of gastroenteritis in The Netherlands. *Epidemiol Infect* 132 (2), 211-221.

**van Duynhoven, Y.T., de Jager, C.M., Kortbeek, L.M., Vennema, H., Koopmans, M.P., van Leusden, F., van der Poel, W.H. & van den Broek, M.J. 2005.** A one-year intensified study of outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *Epidemiol Infect* 133 (1), 9-21.

**Volatier, J.L. 2000.** *Enquête INCA individuelle et nationale sur les consommations alimentaires*. Paris, Tec and Doc. 158 p.

**Vose, D. 2000.** *Risk analysis : a quantitative guide*. New York, John Wiley and sons. 418 p.

**Ward, R., Krugman, S., Giles, J.P., Milton Jacobs, A. & O., B. 1958.** Infectious Hepatitis : studies of its natural history and prevention. *The New England Journal of Medicine* 258 (9), 407-416.

**Ward, R.L., Bernstein, D.I., Young, E.C., Sherwood, J.R., Knowlton, D.R. & Schiff, G.M. 1986.** Human Rotavirus studies in volunteers : determination of infectious dose and serological response to infection. *Journal of Infectious Disease* 154 (5), 871-880.

**WHO 2004.** *Guidelines for drinking water quality*. Geneva. 515 p.

**Worm, H.C., van der Poel, W. & Brandstatter, G. 2002.** Hepatitis E : an overview. *Microbes and infection* (4), 657-666.

**Xu, Z.Y., Li, Z.H., Wang, J.X., Xiao, Z.P. & Dong, D.X. 1992.** Ecology and prevention of a shellfish-associated hepatitis A epidemic in Shanghai, China. *Vaccine* 10 Suppl 1, S67-68.

## Question 8



**Question 9 : Quels sont les pré-requis à l'élaboration d'une stratégie d'échantillonnage d'eau et d'aliments pour évaluer une contamination virale, au regard d'une approche d'AQR ?**



## Question 9 : Quels sont les pré-requis à l'élaboration d'une stratégie d'échantillonnage d'eau et d'aliments pour évaluer une contamination virale, au regard d'une approche d'AQR ?

Responsable du sous-groupe : Mme Thébault

Membres du sous-groupe : Mme Dubrou, M. Dubois, Mme Ferré

### Résumé de la Question 9

### Question 9

Dans l'eau et les aliments, le suivi des différents dangers microbiens est effectué à l'aide d'indicateurs bactériens, qui ne sont pas forcément toujours corrélés à la présence de pathogènes et notamment des virus entériques. De plus, ces indicateurs ne révèlent pas la nature du virus auquel les consommateurs seraient éventuellement confrontés. Un contrôle virologique des aliments ou de l'eau pourrait servir à mieux évaluer l'exposition des consommateurs aux infections virales d'origine alimentaire, ou à améliorer la sécurité alimentaire. La première question à laquelle sont confrontées les autorités sanitaires est comment mettre en place un tel suivi. Malgré les limites évoquées dans la Question 3, l'outil de RT-PCR ou de PCR en temps réel est actuellement le seul outil de détection capable d'être utilisé dans le cadre d'une surveillance des principaux virus transmissibles par voie alimentaire, à savoir les norovirus et le virus de l'hépatite A. Le niveau de concentration de virus à rechercher dépend du niveau de risque considéré comme acceptable, et les évaluateurs du risque ne disposent pour cela que de données internationales. Une approche par la méthodologie d'appréciation quantitative du risque appliquée au domaine de l'eau de distribution montre l'importance du volume choisi pour un prélèvement, du nombre de prélèvements à effectuer pour une concentration donnée de virus. L'efficacité théorique d'un plan de surveillance est extrêmement dépendante des performances de l'outil de détection, de la dispersion des virus (avec agrégats ou non) et pour une évaluation du risque sanitaire, de la proportion de génomes issus de virus infectieux sur le nombre de génomes totaux.

À titre d'exercice, à partir d'une contamination théorique en génomes de norovirus dans l'eau de distribution, il a été tenté d'établir le risque sanitaire pour des consommateurs d'eau du robinet de plus de 15 ans, à l'aide de deux critères sanitaires, à savoir le risque d'infection pour 10 000 et un coût sanitaire exprimé en DALY (cf. définition développée dans la Question 8). Cette approche tient également compte des récentes découvertes sur la sensibilité différente des personnes aux infections à norovirus, liée à l'existence d'un récepteur spécifique aux virus. La dose-réponse pour les rotavirus a été extrapolée ici aux norovirus, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus par des expériences réalisées sur des volontaires exposés aux norovirus, mais non publiés (Teunis, communication personnelle). Cependant, de nombreuses hypothèses ont dû être formulées, et l'estimation la plus difficile concernait pour l'eau de surface sans traitement, le calcul du ratio entre le nombre de virus infectieux et le nombre total de génomes détectables par les outils de biologie moléculaire. Cette estimation serait à relier au contexte, comme le montrait le logigramme de la Question 3. Toutefois, l'utilisation des deux critères sanitaires, avec des valeurs cibles définies pour chacun d'eux sur le plan international, va aboutir, dans le cas des norovirus, à des choix de concentration limites différents, plus sécuritaire, si on utilise le risque d'infection que le coût sanitaire en DALY. Le critère DALY/an oblige, dans ce cas, à réfléchir à des niveaux de concentrations acceptables différents pour chaque virus, suivant la gravité des symptômes, voire pour chaque classe d'âge. L'exercice ainsi réalisé souligne les facteurs à étudier en priorité pour mieux évaluer l'exposition des consommateurs et évaluer le gain d'un contrôle virologique, en plus d'un contrôle microbiologique. Il en découle : la nécessité d'améliorer les performances des tests ; de mettre en place des études visant à mieux connaître le niveau de contamination virale dans l'eau et les aliments, et de relier ceux-ci aux indicateurs ; d'évaluer la part de virus infectieux par rapport aux non infectieux ; d'étudier le devenir de ce pouvoir infectieux en fonction des traitements et des paramètres physico-chimiques de l'eau ou des aliments. D'autre part, il faudrait estimer de façon quantitative et plus précise la morbidité et la mortalité liées aux différents virus en vue d'une estimation du coût en DALY. D'une façon générale, il est nécessaire d'améliorer les investigations épidémiologiques de manière à recueillir davantage d'informations utilisables pour une AQR et valider ou infirmer les hypothèses retenues dans la modélisation. Le modèle que nous avons utilisé ne tient pas compte de la transmission inter-humaine. Toutefois, il serait important d'estimer ce paramètre, qui est directement lié au risque d'incidence accrue d'une infection virale dans la population générale. Malgré toutes ces limites, l'avancée rapide des connaissances rend de plus en plus envisageable l'idée d'un contrôle virologique pour certains produits à certaines phases de leur production.

Le contrôle d'agents infectieux dans les eaux de distribution et les aliments est effectué en routine par le biais d'indicateurs microbiologiques. Ces indicateurs sont considérés comme étant efficaces *vis-à-vis* d'incidents récents de contamination fécale, mais sont plus ou moins bien corrélés à la présence des virus infectieux. Ainsi, certains virus, par exemple le virus de l'hépatite A (VHA), peuvent avoir une durée de survie dans l'environnement hydrique ou les aliments plus importante par rapport à un indicateur bactérien comme *Escherichia coli* (Chironna *et al.* 2002). Toutefois, les données de survie et de résistance aux traitements pour les virus sont parcellaires (cf. Question 4 et Question 6). De plus, la détection et la quantification des virus posent encore des difficultés méthodologiques (cf. Question 3).

La mise en place des nouveaux outils de diagnostic implique des compétences particulières et des coûts d'analyse élevés. La recherche des virus est donc actuellement limitée à des cas de contamination suspectée ou avérée (cf. Question 7).

Des résultats de contrôles virologiques obtenus au cours d'études ponctuelles sont cependant publiés pour des ressources en eau potable, pour des eaux minérales ou des aliments, comme les coquillages (Lodder *et al.* 1999, Glass *et al.* 2000, Le Guyader *et al.* 2000, Skrabber *et al.* 2005, van den Berg *et al.* 2005). Les données anciennes ont été obtenues sur des entérovirus cultivables par culture cellulaire, celles plus récentes concernent les principaux virus d'intérêts sanitaires (par voie alimentaire), à savoir les norovirus et les virus des hépatites A et E. Ces virus n'étant pas ou difficilement cultivables, il a fallu attendre la mise au point de techniques de détection par biologie moléculaire pour obtenir des données sur la contamination de l'environnement et des aliments. Néanmoins, l'interprétation d'un danger n'est pas évidente lorsque l'on dispose uniquement des résultats obtenus par ces techniques de RT-PCR ou de PCR en temps réel (cf. Question 3) (Gassilloud *et al.* 2003). Même si certains pays disposent de résultats sur leurs ressources ou leurs produits alimentaires et si d'autres utilisent déjà les outils de biologie moléculaire afin d'analyser des échantillons impliqués dans des épidémies (Cheng *et al.* 2005), les évaluateurs et les gestionnaires du risque alimentaire peuvent se poser la question de l'intérêt de la mise en place d'un contrôle virologique par PCR et RT-PCR de façon systématique ou dans certaines situations spécifiques, par rapport aux critères classiques microbiologiques de contrôle des aliments et des eaux de boisson.

Afin d'aborder ces questions, une analyse a été conduite sur les différents objectifs attendus d'une surveillance virologique et les conséquences pour la méthodologie à mettre en place.

Un exemple d'application, dans le cas des ressources en eau brute, a été particulièrement étudié, sur la base d'un certain nombre de considérations théoriques.

Cependant, le passage d'un exemple théorique à une situation d'application réelle requiert des données scientifiques valides. Le manque d'un certain nombre de ces données ou leur défaut de représentativité peuvent être considérés comme des facteurs fortement limitants à l'exploitation, à des fins sanitaires, des résultats. Des propositions en terme de recherche permettraient d'améliorer la situation, et d'estimer la pertinence d'une surveillance virologique dans les eaux ou les aliments.

## A. Contexte général et définition des objectifs

### A.1 De l'efficacité d'un système de surveillance à la définition des objectifs de sécurité alimentaire

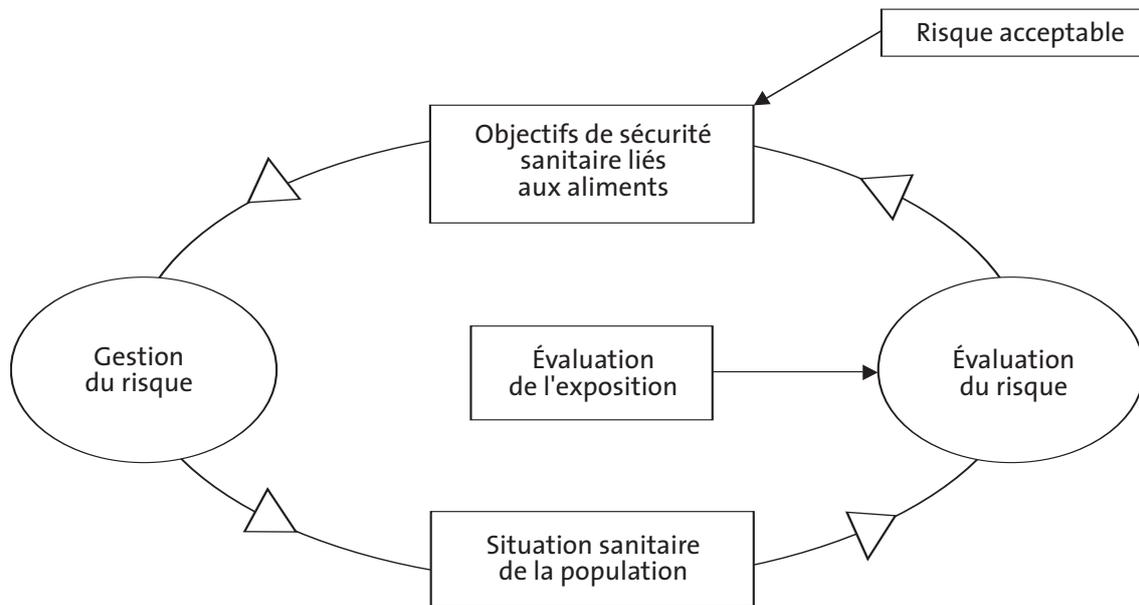
L'efficacité d'un système de surveillance/contrôle est définie comme la probabilité de détection d'un danger lorsque qu'une denrée dépasse un niveau de concentration microbienne donné, ou une certaine prévalence de denrées alimentaires contaminées, ou encore lorsqu'un épisode de contamination dépasse une certaine durée à un certain niveau.

Il faut donc, dans un premier temps, disposer de valeurs limites ou de valeurs seuils. Le choix des valeurs seuils pour la gestion du risque peut être issu des résultats de l'évaluation du risque (Havelaar *et al.* 2004), et ce choix aura un impact sur l'exposition des personnes. Dans le cas présent, un système de surveillance peut soit servir à mieux estimer l'exposition des personnes, soit permettre la mise en place de mesures de gestion si certaines valeurs dépassent ce qui est considéré comme acceptable. Cette démarche se doit d'être itérative (Figure 22), car la situation sanitaire n'est jamais figée.

#### Définition de valeurs seuils dans l'alimentation

L'ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) (2002) et la Commission du Codex Alimentarius (2004) ont posé les principes méthodologiques permettant de définir des valeurs seuils dans l'alimentation. L'Objectif de sécurité alimentaire ou FSO (de l'anglais Food Safety Objective) est une concentration ou une fréquence de contamination (prévalence) maximale d'un aliment au moment de sa consommation. La détermination de cette concentration/fréquence de contamination maximale en fonction du niveau de protection acceptable (ALOP : de l'anglais Appropriate level of protection) peut être déterminée par une approche en appréciation quantitative du risque (AQR) (Havelaar *et al.* 2004).

Figure 22 : schéma montrant le lien entre l'évaluation du risque et la gestion du risque, via la définition d'objectifs de sécurité sanitaire et l'évaluation de la situation sanitaire



**Question 9**

d'après (Fewtrell & Bartram 2001)

Un niveau de protection acceptable concerne, par exemple un certain nombre de cas d'infection liés à un agent infectieux par an considéré comme limite. Le nombre de cas attribuables à la contamination d'un aliment particulier parmi ces cas d'infection est ensuite estimé, ce qui permet de définir une concentration et une prévalence limites dans l'aliment considéré (Zwietering 2004). Le critère ALOP peut être exprimé pour un certain nombre d'individus (par exemple : incidence pour 10 000 habitants) ou pour un certain nombre de repas (par exemple : incidence pour 10 000 portions), ou enfin en DALY par an (de l'anglais Disability Adjusted Life Years, années de vie corrigées de l'incapacité, cf. Question 8) (Havelaar *et al.* 2004). La définition d'un niveau de protection acceptable est un processus complexe qui ne sera pas détaillé ici (De Swarte & Donker 2005).

Différentes méthodes permettent de mieux définir le nombre de cas attribuables à un aliment, par des approches épidémiologiques (cf. Question 8) ou par une approche d'AQR (Havelaar *et al.* 2004).

Afin de définir un niveau de protection acceptable, une autre méthode rend compte de la faisabilité de la diminution du risque, c'est le concept d'ALARA (as-low-as-reasonably-achievable, littéralement « aussi faible que raisonnablement atteignable ») qui tient compte, par exemple, des résultats d'approches coûts-bénéfices ou de risques croisés (Havelaar *et al.* 2004, Walls & Buchanan 2005). Un risque croisé décrit le fait que la diminution d'un risque peut en augmenter un autre.

En premier lieu, l'objectif de sécurité alimentaire (FSO) est donc en théorie défini à partir d'un niveau quantifié de protection sanitaire (ALOP).

Puisque le FSO est défini au moment de la consommation, des critères intermédiaires ont été définis à différents stades de la production d'un aliment. En effet le niveau de contamination juste avant consommation dépend aussi des pratiques et des traitements mis en place par le consommateur, et n'est pas forcément bien estimé ni maîtrisable (Havelaar *et al.* 2004). La définition de critères intermédiaires permet au producteur de vérifier l'adéquation de la qualité de sa production au risque alimentaire acceptable recherché (Gorris 2004, Havelaar *et al.* 2004).

Deux critères ont alors été proposés, à savoir un critère de performance (CP) (résultat attendu d'une étape de la vie du produit, comme l'efficacité d'un traitement) et un objectif de performance PO (niveau de contamination maximal d'un aliment à une étape de la chaîne alimentaire avant la consommation) (Stringer 2005, Van Schothorst 2005). Ces critères permettent de définir des objectifs à atteindre pour différents niveaux de la production, à partir de la définition des ALOP. Sur la base d'évaluations de risques déterministes, des valeurs seuils (concentrations et prévalences limites) ont été définies, par exemple, pour *Listeria* dans les fromages au lait cru (Zwietering 2004) ou pour *E. coli* O157-H7 produisant des Shiga-toxines dans le steak tartare (Havelaar *et al.* 2004). Enfin, un exemple d'application du concept d'objectif de performance a été effectué sur un exemple théorique, pour évaluer l'efficacité de la surveillance pour différentes fréquences (prévalences) de contamination en *Listeria* dans les fromages au lait cru (Sanaa *et al.* 2005).

### Définition de valeurs seuils dans l'eau de consommation

Dans le domaine de l'eau de consommation ou de l'eau d'irrigation, des concepts de même nature ont été élaborés, à savoir celui de risque acceptable ou tolérable (acceptable risk, par exemple : limite de l'incidence annuelle acceptable de gastroentérites liées à l'ingestion d'eau contaminée). La valeur retenue pour un risque acceptable au regard d'autres risques, sert à définir un objectif de santé pour l'aliment considéré (health target) (exprimé dans les mêmes unités que le risque acceptable) qui peut être différent d'un pays à l'autre, d'une région à l'autre (WHO 2001). Cet objectif de santé permet d'en déduire des objectifs de qualité de l'eau en terme d'objectifs de performances ou de critères de performance (par exemple un traitement de l'eau) obtenus à partir d'approches AQR (WHO 2004) (Figure 22).

La définition des objectifs de santé est directement reliée à la surveillance et à ses résultats, puisque la surveillance permet de vérifier l'adéquation des résultats aux objectifs, de montrer la faisabilité de ceux ci, ou au contraire une inadéquation à résoudre par l'application de mesures correctrices (WHO 2001).

## Question 9

### Valeurs limites de risque acceptable définies au plan international dans l'eau de consommation et les aliments

Au niveau international, différents niveaux de risques acceptables ont été définis.

Dans le domaine de l'eau de consommation, l'agence américaine de l'environnement (US-EPA) a défini un risque acceptable pour l'infection à *Giardia*, à un cas d'infection pour 10 000 habitants par an. Ce niveau de risque acceptable a été extrapolé aux virus responsables de gastroentérites (Regli *et al.* 1991). L'objectif de l'US-EPA était bien sûr de prévenir des cas d'épidémies liées à l'eau, mais aussi de réduire le niveau endémique des maladies (Macler & Regli 1993).

La définition de ce risque a permis de définir une efficacité de traitement minimale de 4 log pour la potabilisation d'eaux superficielles (Regli *et al.* 1991, Macler & Regli 1993). Si l'on se réfère au cas des *Giardia intestinalis*, cela correspond en moyenne à un risque de maladie pour 20 000 personnes par an et à un risque de mortalité de 1 pour 20 millions de personnes par an (WHO 2001).

L'OMS utilise depuis 2003 un autre critère sanitaire pour définir le risque acceptable dans l'eau de distribution, exprimé en DALY/an (WHO 2004 et Question 8). Un excès de risque acceptable de cancer pour des produits génotoxiques sans seuil, pendant la durée de vie (atteinte moyenne à 65 ans) avait été défini à  $10^{-5}$ . Sur l'exemple du cancer du rein, il est possible d'estimer une valeur de 11,4 DALY par cas de cancer et  $1,6 \times 10^{-6}$  DALY par personne par an en tant que risque acceptable (WHO 2004).

L'OMS recommande, par analogie au risque de cancer, la définition d'un risque acceptable pour les agents microbiologiques exprimé en DALY (cf. Question 8), et propose une valeur de  $1 \times 10^{-6}$  DALY/an comme un risque acceptable pour différents agents infectieux de référence dont les rotavirus. Même si l'OMS recommande des valeurs de risque acceptable à atteindre pour l'eau pour certains agents infectieux, le choix du risque acceptable (objectif de santé) reste du ressort du pays concerné et peut être différent d'un pays à l'autre (WHO 2004).

Dans le domaine alimentaire, des exemples de risques acceptables sont donnés, de l'ordre de 5 cas de mortalité par an pour 1 million de personnes (ex *Listeria*, lorsque le nombre actuel estimé en France est de 0,5 à 1,25 cas par  $10^6$  (InVS 2004)) (Zwietering 2004). Dans un autre exemple, l'ALOP est estimé à 10 infections/100 000 enfants de moins de 15 ans par an par *E. coli* O157 (estimation actuelle à 13 cas d'infections/100 000 enfants aux Pays-Bas (Havelaar *et al.* 2004)). Aux États-Unis, 0,25 cas de listériose pour 100 000 individus a été proposé comme ALOP (Walls & Buchanan 2005). L'ALOP, dans ces différents exemples est toujours inférieur à la valeur la plus récente de l'incidence de la maladie mesurée dans le pays. Dans le domaine alimentaire il n'y a pas de généralisation entre différents agents infectieux, ni de règle établie pour l'un d'entre eux au niveau international.

### A.2 Différents objectifs pour une stratégie d'échantillonnage (évaluation de l'exposition)

Différents types d'objectifs peuvent être visés par le contrôle virologique des eaux ou des aliments.

#### a. Évaluation de l'exposition

- Connaître la distribution de la contamination, en période normale de fonctionnement, et en cas d'accident de contamination ;
- Déterminer la fréquence, la durée et la nature des accidents en fonction de différents types de situations (ex. taille et nature de la station de traitement, zone conchylicole concernée) ;
- Déterminer la population concernée par différents types de situation.

## b. Contrôle virologique dans les aliments

- Détecter précocement une contamination de la denrée pour anticiper une contamination des consommateurs.

## c. Questions spécifiques

- Déterminer l'efficacité d'éventuels traitements ou de différentes mesures préventives ;
- Répondre à des lacunes de connaissances :
  - mieux établir des facteurs de risque de contamination,
  - mieux établir le lien entre indicateurs et contamination,
  - mieux apprécier les conséquences sanitaires d'une contamination,
  - mieux établir la diversité microbiologique ou de génotypes présents d'un même virus au cours d'épisodes de contamination.

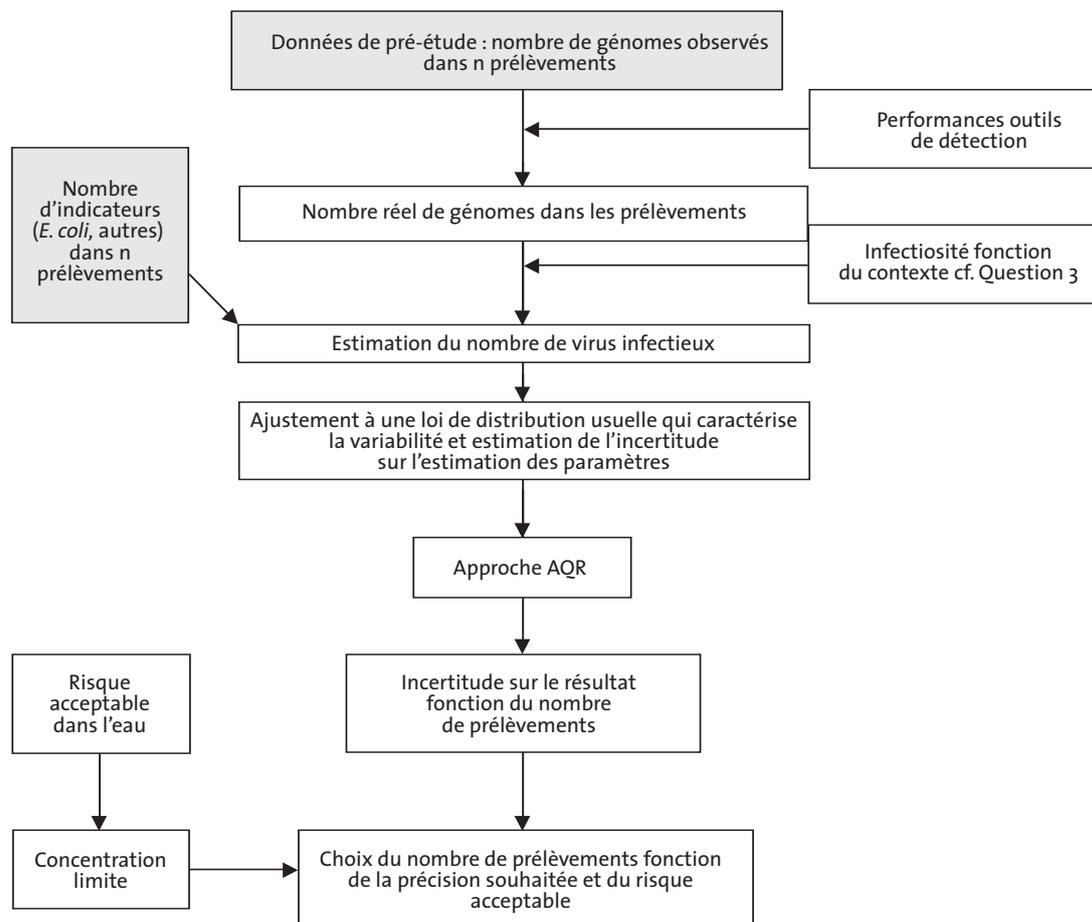
À chacun de ces objectifs correspond une stratégie d'échantillonnage spécifique, mais les principales questions, auxquelles la stratégie d'échantillonnage devra répondre, seront sensiblement les mêmes.

## Question 9

### A.3 Démarche et points à définir pour la mise en place d'une évaluation de la contamination/d'un contrôle virologique

#### A.3.1 Démarche visant à estimer la variabilité de la contamination virale en vue d'évaluer un risque sanitaire

Figure 23 : démarche visant à établir une stratégie d'échantillonnage optimale dans l'eau en vue d'évaluer les risques



La démarche ci-dessus a déjà été développée notamment sur *Cryptosporidium* (Pouillot *et al.* 2002). En l'absence de données de contamination, cette démarche ne peut être utilisée dans le domaine viral. L'interprétation d'une précision acceptable sur l'estimation du risque dépend aussi du risque acceptable. Si la valeur du risque (moyenne ou quantiles) et son intervalle de crédibilité sont très inférieurs à la valeur de risque acceptable même pour une précision relative médiocre, améliorer la précision relative par un plus grand nombre d'échantillons aura peu d'intérêt (Pouillot *et al.* 2002). En l'absence de définition d'un risque acceptable, la précision souhaitée pour l'appréciation des risques va dépendre de l'objectif, par exemple si on s'intéresse au risque moyen ou aux quantiles extrêmes. La Figure 23 contient aussi des spécificités liées à la méthode de détection des virus comme VHA ou Norovirus par biologie moléculaire et rappelle (cf. Question 8) que certaines approches AQR estiment les quantités virales à partir d'indicateurs (bactériophages, *E. coli*, Entérovirus cultivables).

### A.3.2 Démarche visant à la mise en place d'un contrôle virologique dans les denrées

## Question 9

Les différentes étapes du processus sont rappelées dans la Figure 24. Pour mener ce type d'approche un certain nombre de données est nécessaire, et certaines informations relatives aux différentes étapes du processus, comme par exemple les performances des outils de détection et l'estimation de l'infectiosité des génomes.

L'approche AQR doit être considérée comme pouvant être utilisée par l'expertise collégiale : les hypothèses doivent être validées ou admises de façon consensuelle, les données et connaissances doivent être reconnues comme suffisantes au moins pour une première approche. En effet c'est l'AQR qui permettra d'établir le lien entre le risque et la concentration dans l'aliment au moment de la consommation (FSO), ou à un moment de la production (PO).

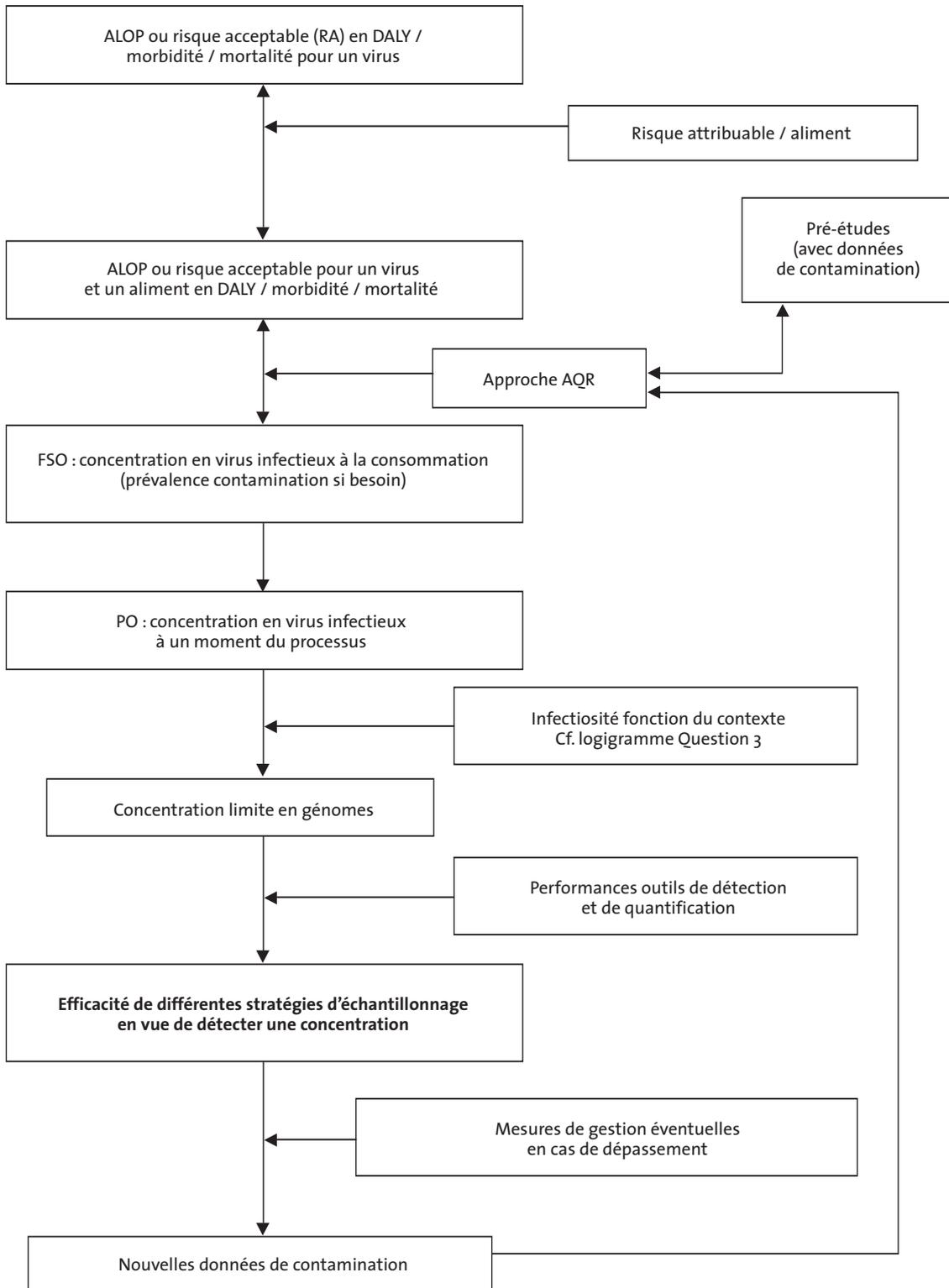
Le risque peut être exprimé en terme de coût sanitaire en DALY ou en morbidité. Mais compte tenu des incertitudes qui persistent toujours à l'élaboration d'un modèle, il serait judicieux de vérifier si le risque attribuable obtenu par le modèle d'AQR avec des données de contamination représentatives (données de pré-études) sont bien dans l'ordre de grandeur du risque attribuable estimé par d'autres approches (épidémiologiques par exemple) (flèches à double sens de la Figure 24). On sera alors en mesure d'évaluer quel niveau de concentration est à atteindre en vue d'atteindre l'ALOP recherché.

En fonction de la concentration à détecter, en fonction des performances des outils et de la répartition des virus (agrégés-répartition homogène ou non issues de données de pré-études), on sera alors en mesure d'estimer le nombre et le volume des prélèvements nécessaires. Il sera alors possible d'évaluer la faisabilité de mesures de contrôle à un moment donné de la production.

On disposera alors de nouvelles données de contamination qui pourront servir à de nouvelles évaluations de risque, si on est en mesure de faire le lien entre la concentration à un moment donné et le risque pour le consommateur, c'est-à-dire si on connaît, par exemple, l'abattement de concentration virale résultant de traitements éventuels.

Si l'objectif d'un contrôle est d'écarter un aliment potentiellement nocif pour la santé, les résultats du contrôle peuvent aussi servir à l'évaluation. On peut remarquer dans les deux approches l'intérêt de la définition préalable d'un risque acceptable-ALOP-FSO. Au regard de l'absence de données de contamination virale disponibles représentatives, et compte tenu du fait que ces données sont moins nécessaires dans cette deuxième approche, c'est cette démarche qui a été mise en place, au moins partiellement, dans ce rapport, en vue de procurer des éléments à une stratégie d'échantillonnage de contrôle/surveillance virologique dans l'eau.

Figure 24 : démarche visant à établir une stratégie d'échantillonnage optimale dans l'eau en vue d'un contrôle virologique dans l'eau ou les aliments



**Question 9**

### A.3.3 Points à définir pour la mise en place d'une stratégie d'échantillonnage

Les points à définir sont les suivants :

- objectif à définir précisément ;
- population humaine concernée, consommation concernée, produit concerné ;
- agent infectieux concerné ;
- point d'application du contrôle : à quel niveau de la vie du produit ;
- échantillonnage : définition de l'unité d'échantillonnage (le lot dans le domaine alimentaire), nombre d'échantillons nécessaires pour caractériser un moment donné un type de situation donné (ou le lot dans le domaine alimentaire), stratification éventuelle, fréquences des prélèvements à réaliser (et en fonction périodes si nécessaire) ;
- concentrations minimales à détecter, analyte recherché ;
- technique de détection-quantification à utiliser, et d'analyse, laboratoires compétents ;
- commémoratifs à joindre ;
- expression des résultats attendus, recueil des données, analyse et interprétation des résultats ;
- évaluation du coût et de l'efficacité de la mise en place d'un contrôle.

D'autres aspects peuvent être étudiés, comme les procédures assurance-qualité, mais ne seront pas abordés ici.

## A.4 Plans d'échantillonnage en place dans le contrôle microbiologique

### A.4.1 Plans d'échantillonnage dans le contrôle microbiologique des aliments

Deux types de plans d'échantillonnage sont classiquement mis en place pour le contrôle microbiologique des aliments (Codex Alimentarius 2003).

**Le plan d'échantillonnage aux mesures** est une méthode d'estimation de la qualité d'un lot qui consiste à mesurer dans chaque prélèvement élémentaire, la valeur d'une grandeur caractérisant la marchandise contrôlée puis à calculer la moyenne obtenue sur ces prélèvements et à la comparer à des valeurs limites. La distribution de la contamination dans la marchandise, pour ce plan d'échantillonnage, doit suivre une loi normale (Codex Alimentarius 2003). Dans le cas d'une contamination virale, la distribution de la contamination est en général inconnue, et peut tout aussi bien suivre d'autres lois de distributions, Log-normale ou Négative Binomiale.

**Le plan d'échantillonnage aux attributs** est une méthode d'estimation de la qualité d'un lot qui consiste à qualifier chaque prélèvement élémentaire de l'échantillon du caractère (ou attribut) conforme ou défectueux selon que la spécification Codex est respectée ou non (dépasse ou non une valeur seuil) (Codex Alimentarius 2003). Si le nombre de prélèvements élémentaires défectueux, sur le nombre fixé de prélèvements élémentaires à réaliser sur le lot, dépasse le critère d'acceptation du plan, le lot est refusé. Dans la définition d'un plan aux attributs à 3 classes, il faut définir au moins deux valeurs seuils, la première « m » sert à définir une « qualité acceptable à la rigueur » et la deuxième « M » une « qualité inacceptable ». Le critère d'acceptation, dans le plan à 3 classes, va concerner le nombre de prélèvements élémentaires de « qualité acceptable à la rigueur ». Un seul prélèvement élémentaire dépassant la valeur M suffit à faire rejeter le lot. Le plan d'échantillonnage mis en place dans le domaine alimentaire concerne le plus souvent des unités sécables, à la différence du domaine de l'eau. En général, la taille du lot n'est pas prise en compte pour définir le nombre de prélèvements élémentaires à réaliser pour estimer la contamination du lot. Pour un plan d'échantillonnage donné, la courbe d'efficacité (operating characteristic curve) pour ces deux plans d'échantillonnage correspond à l'estimation de la probabilité d'acceptation du lot en fonction du taux de défectueux dans celui-ci. Le risque fournisseur correspond à la probabilité de rejet d'un lot à tort, le risque consommateur au risque d'accepter un lot à tort (ISO 2859-1). Le niveau de qualité limite, concerne un lot pris isolément et correspond au taux de défectueux accepté dans ce lot avec une certaine probabilité au moment du contrôle, en général dans 10 % des cas (ISO 2859-2). Enfin le niveau de qualité acceptable concerne une série continue de lots pour laquelle on définit un taux maximum de défectueux admissible dans des lots (Codex Alimentarius 2003).

D'autres plans d'échantillonnages sont mis en place pour caractériser la concentration en agents microbiens des aliments, visant davantage à caractériser un milieu donné ; le meilleur exemple est l'échantillonnage mis en place par l'IFREMER pour la caractérisation de zones conchylicoles (REMI-REPHY) (Beliaeff & Cochard 1995). Si l'on devait estimer la concentration en virus des salades dans un champ ou une zone agricole, la réflexion sur l'échantillonnage devrait être probablement différente des plans d'échantillonnage définis plus haut et tenir compte de la variabilité spatiale de la contamination (en plus de la variabilité temporelle) de la zone considérée.

#### A.4.2 Plans d'échantillonnage dans le contrôle microbiologique de l'eau

Dans ce cas, le critère microbiologique est en général défini pour un niveau donné de la production d'eau potable (stade du traitement). Le nombre d'échantillons à réaliser est fonction du débit. Les paramètres suivis sont indiqués dans la Question 2.

#### A.4.3 Plans de surveillance et de contrôle

Dans la nomenclature de la DGAI, un plan de surveillance a une envergure nationale, et tout lot d'aliment produit ou importé sur le territoire national correspondant aux critères spécifiés, peut faire l'objet d'un prélèvement. Le plan d'échantillonnage est un sondage aléatoire, souvent stratifié par département ou par type d'établissement. Les résultats peuvent être utilisés directement pour des calculs d'évaluation de la contamination des produits. Le nombre total d'analyses va influencer sur la précision du résultat. Les plans de contrôle (nomenclature DGAI) concernent des contrôles orientés, en vue de détecter des situations de dépassement, et d'écarter des produits dangereux de la consommation. Les résultats ne sont pas forcément extrapolables pour décrire, ou en déduire, la contamination générale des produits. Parallèlement des pré-études-enquêtes peuvent être menées au niveau local, avant d'envisager des études sur le plan national.

### Question 9

#### A.5 Conclusion sur les objectifs

Les objectifs des plans d'échantillonnage sont divers, et le manque de données *a priori* de pré-études limitent les possibilités de propositions de stratégies d'échantillonnage. Par exemple, un plan d'échantillonnage basé sur une limite de précision n'est pas envisageable, puisqu'on ne dispose pas de distributions quantitatives issues de pré-études ou d'études locales. Un plan d'échantillonnage aux attributs serait donc davantage envisageable dans un premier temps.

À titre d'exemple, le premier objectif d'un plan d'échantillonnage pourrait être l'évaluation de la contamination virale dans l'eau distribuée, (une des questions prioritaires pour la Question 8) afin de mieux évaluer le risque sanitaire associé. L'outil envisagé pourrait être la RT-PCR ou mieux encore la PCR en temps réel, pour des raisons évidentes de faisabilité et de praticabilité pour des virus peu ou pas cultivables, comme VHA ou norovirus, mais dont la part attribuable à l'eau n'est pas forcément considérée comme négligeable (WHO 2004).

En absence de définition d'un niveau de risque acceptable défini dans l'alimentation au niveau européen ou national, les objectifs de santé (Health Targets) définis par l'OMS dans le domaine de l'eau seront utilisés pour déterminer, si possible, les concentrations recherchées au niveau de l'eau distribuée ou des ressources superficielles. Ceci est particulièrement important si l'objectif de la surveillance est de mettre en place un plan de contrôle visant à détecter précocément une contamination anormale pour prévenir une potentielle contamination des consommateurs.

L'intérêt de la mise en place d'un plan de surveillance par mesure directe de virus au lieu (ou en complément) d'indicateurs microbiologiques, pour mieux évaluer l'exposition aux virus des consommateurs, peut aussi être évaluée par une approche d'appréciation quantitative des risques. Cette étape est d'ailleurs un préalable nécessaire pour estimer l'impact *a priori* de certaines mesures de gestion sur le risque viral.

Cependant les limites en termes de connaissances nécessaires à ce type d'approche seront aussi mises en évidence. L'amélioration de ces connaissances sera le pré-requis nécessaire à l'élaboration d'éventuels plans de contrôle ou de surveillance.

## B. Exemple de l'application dans le domaine de l'eau de distribution et limites rencontrées

L'objectif de l'approche ci-dessous est principalement de proposer une stratégie d'échantillonnage dans les eaux visant à mieux déterminer l'exposition aux norovirus des consommateurs adultes d'eau du robinet non chauffée, par une meilleure connaissance du niveau de contamination des eaux brutes et distribuées, voire de déterminer le risque sanitaire associé à une détection de génomes de ces virus.

L'objectif secondaire pourrait être aussi d'appréhender l'intérêt de la mise en place d'un plan de surveillance par mesure directe de norovirus au lieu (ou en complément) d'indicateurs microbiologiques, pour mieux évaluer l'exposition aux norovirus des consommateurs. Cependant, compte tenu des limites de connaissances, il sera difficile, d'une part de valider complètement l'approche, et même de conclure totalement sur les résultats. Le principal résultat attendu sera donc surtout l'identification des lacunes de connaissances permettant d'aborder, de façon satisfaisante par une approche AOR, l'efficacité attendue d'un plan d'échantillonnage de la surveillance de virus dans l'eau.

## B.1 Description du modèle d'appréciation quantitative du risque viral

### B.1.1 Définition de la situation étudiée

Un modèle d'évaluation de risque permet d'établir un lien théorique entre une valeur de concentration dans l'eau et un risque sanitaire, qui peut s'exprimer sous la forme d'un risque quotidien ou annuel d'infection ou de maladie, ou d'un coût sanitaire exprimé en DALY (cf. Question 8). Cette approche permet de fixer des objectifs en terme de détection, et par conséquent, d'évaluer la faisabilité (sans considérer les problèmes de coût et les délais d'analyse cependant) et l'intérêt d'un contrôle virologique des eaux.

#### B.1.1.1 Population humaine étudiée dans l'exemple considéré

La sévérité d'une maladie virale, qui sert à calculer un DALY, est différente selon la classe d'âge considérée et le statut immunitaire des personnes. Dans l'exemple ci-dessous on considèrera une population d'individus d'âge supérieur à 15 ans, sans atteinte particulière du système immunitaire.

#### B.1.1.2 Virus étudié

Les virus étudiés seront les norovirus en prenant le prototype, le virus de Norwalk, comme modèle. Ces virus sont fréquemment impliqués dans des cas de gastroentérites collectives liées à l'eau, et sont les plus fréquents dans les cas de gastroentérites d'origine alimentaire (cf. rapport « morbidité-mortalité »). Ces virus n'étant pas cultivables, leur détection se fait par RT-PCR. Comme il existe différents variants et différentes souches, différentes réactions de RT-PCR avec différentes amorces sont nécessaires pour une détection. Tous les norovirus présents dans le cas d'une contamination ne sont pas forcément détectés ; d'une part si on ne dispose pas de toutes les amorces pour tous les variants possibles, d'autre part parce que la technique comporte une limite de détection.

De façon générale il n'existe pas d'immunité durable après une infection à norovirus et l'immunité croisée semble inefficace même à court terme (Tan & Jiang 2005). D'autre part, ce virus évolue de façon extrêmement rapide (cf. fiche Norovirus, Question 1).

La découverte récente du mécanisme immunitaire à l'origine de la résistance à l'infection à norovirus, et sa répartition dans les populations humaines a permis de mieux comprendre les résultats d'investigation épidémiologiques et les résultats expérimentaux sur des essais visant à mieux estimer la relation dose-infection.

Enfin ce virus est réputé pour être particulièrement infectieux pour de faibles doses, de façon relativement comparable aux rotavirus (Teunis, com.pers.).

#### B.1.1.3 Voie d'exposition considérée

La voie d'exposition considérée sera l'eau. L'alimentation par l'eau de surface sera particulièrement considérée, du fait de sa vulnérabilité aux contaminations environnementales. On envisagera le cas d'une absence et d'une présence de traitement. Les performances du traitement sur l'infectiosité des norovirus seront supposées connues. Il faut rappeler ici qu'on ne dispose pas de jeux de données sur la contamination en norovirus des eaux de surfaces, et encore moins en corrélation avec des indicateurs microbiologiques.

### B.1.2 Relation dose-infection considérée

Les résultats expérimentaux de la relation dose-infection obtenue sur rotavirus sont extrapolés aux norovirus. Les derniers résultats expérimentaux de relation dose-infection, obtenus sur des volontaires adultes, montrent qu'en effet les norovirus seraient très infectieux, notamment pour de très faibles doses, de façon comparable aux rotavirus (Teunis, résultats non publiés, 2005). Utiliser la dose-infection rotavirus est une approche sécuritaire pour les faibles doses, si l'on considère les autres relations dose-infection disponibles (cf. Question 8 et Figure 22).

On ne rappellera pas ici les hypothèses sous-jacentes à l'utilisation et à l'extrapolation des résultats obtenus sur des volontaires sains à une population générale adulte, ou à des faibles doses, et qui ont été rappelés dans la Question 8. Cependant, il faut rappeler quelques principes justifiant la relation dose-infection qui sera utilisée dans le cas d'une approche AQR stochastique (cf. Question 8).

Le modèle de relation dose-infection utilisé ci-après utilise une approche mécaniste ou explicative des relations dose-infection.

En l'absence d'interaction entre particules infectieuses, et si on accepte l'hypothèse qu'un seul virus peut produire une infection (approche sécuritaire « single hit »), la probabilité d'infection sachant la dose ingérée peut s'écrire sous la forme :

$$\text{Relation 1 : } P_{\text{inf}}/\text{dose} = 1 - (1 - R)^D$$

D est la dose ingérée, R est la probabilité d'infection pour une dose de 1 virus.

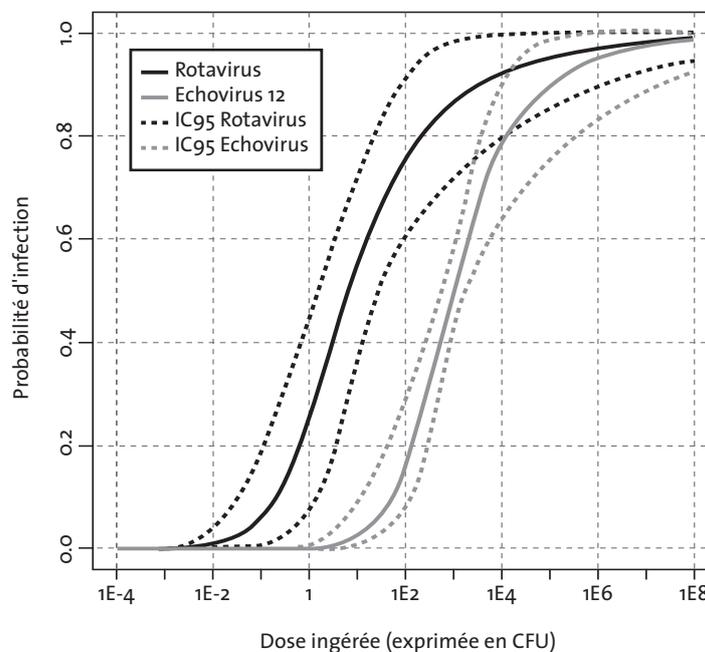
Si la répartition des virus dans l'aliment est considérée comme homogène par hypothèse, la dose ingérée suit une loi de Poisson.

Si la relation hôte-pathogène ne varie pas d'un cas à l'autre,  $R$  est une constante. Si la probabilité  $R$  est considérée comme variable d'un individu à l'autre, d'une contamination à l'autre,  $R$  suit alors une loi Beta (Haas *et al.* 1999). Pour une dose moyenne ingérée, la relation dose-infection suit alors un modèle hypergéométrique gaussien.

La loi Beta comporte deux paramètres qu'il faut estimer sur la relation dose-infection.

L'ajustement des données expérimentales obtenues sur rotavirus est meilleur pour un modèle où  $R$  est variable. L'obtention des paramètres de la loi Beta correspondante est cependant délicate pour rotavirus (cf. Question 8). La plupart des AQR concernant les virus contourne la difficulté en utilisant une relation appelée Beta-Poisson, qui approxime la relation hypergéométrique, sous certaines conditions (Haas *et al.* 1999). Malheureusement cette approche n'est pas valide dans le cas de Rotavirus, car les conditions pour l'approximation de Furumoto-Mickey ne sont pas satisfaites, ce qui constitue une première difficulté. Le deuxième problème, évoqué par Teunis & Havelaar (2000), c'est que la relation beta-poisson est anormalement sécuritaire, car on peut obtenir des risques d'infection pour des doses ingérées inférieures à 1 virus (cf. Question 8 – « relation dose infection »).

Figure 25 : relations dose-infections Rotavirus et Échovirus (modèles Beta-Poisson)



Enfin, quel que soit le modèle hypergéométrique gaussien ou beta-Poisson utilisé, un troisième problème se pose. Ces modèles doivent être utilisés pour des doses ingérées moyennes et non sur des distributions de consommations individuelles ou de contaminations (Haas *et al.* 1999, Haas 2002).

Vose, (Vose 1998), Sanaa (Sanaa 2005) et Canivet (Canivet 2005) ont proposé dans ce contexte de revenir à la relation générale (relation 1). Cette approche permet aussi une généralisation plus évidente au cas où la contamination n'a pas une dispersion homogène et où le nombre de virus ne suit plus une loi de Poisson.

Afin de mener ce type d'approche pour rotavirus-norovirus, il est cependant nécessaire d'estimer les paramètres  $\alpha$  et  $\beta$  du modèle beta-poisson et leurs distributions respectives, si on s'intéresse à l'incertitude autour de ces valeurs. Les valeurs de ces paramètres peuvent être obtenues en utilisant le modèle hypergéométrique gaussien sur les données expérimentales, par une approche MCMC<sup>(48)</sup> sur Mathematica (Teunis & Havelaar 2000). Dans le contexte expérimental, et en utilisant cette formulation exacte, on se place dans le cas particulier où on évite

(48) Markov chain Monte Carlo.

bien les trois problèmes évoqués plus haut. Les paramètres  $\alpha$  et  $\beta$  et leur distribution nous ont été transmis par Teunis (com. pers., 2005), afin de mener à bien l'approche ci-dessous.

Le programme a été écrit sous @risk (PALISADE), pour le risque quotidien et annuel avec une approche séparant la variabilité de l'incertitude, en utilisant différentes itérations pour la variabilité (1 000) et différentes simulations pour l'incertitude (100) avec un échantillonnage par Hypercube Latin. Ainsi pour la relation dose-infection, on utilisera une loi beta différente pour chaque simulation, et pour chaque itération on utilisera une valeur différente de probabilité R issue de la loi beta de la simulation.

Pour des approches AQR déterministes (cf. Question 8) le modèle beta poisson avec l'approximation de Furumoto-Mickey a été utilisé. En effet, dans ces approches simplifiées, un ordre de grandeur moyen peut être considéré comme suffisant.

Cette approche permet de résoudre, de façon satisfaisante sur les plans explicatif et mathématique, les 3 problèmes évoqués plus haut, même si cette approche, délicate à mettre en œuvre n'est pas actuellement utilisée dans les approches AQR publiées concernant des virus (cf. Question 8).

## Question 9

### B.1.3 Taux de morbidité, DALY, sensibilité des populations

La probabilité d'être malade dans les modèles virologiques n'est pas considérée comme liée à la dose de virus ingérée (cf. Question 8), ce qui peut être vérifié pour rotavirus (Haas *et al.* 1999). On supposera qu'il en est de même ici pour norovirus. La probabilité d'être malade sachant que l'on est infecté a été estimée ici à 0,5, en accord avec la valeur estimée par Lindesmith (Lindesmith *et al.* 2003). Des travaux sur le sujet permettraient d'argumenter le choix de cette valeur et de mieux en estimer la variabilité.

Les doses ingérées d'un jour à l'autre sont supposées non cumulatives vis-à-vis de l'infection et du risque de maladie, à la différence des approches menées sur *Cryptosporidium* ou d'autres agents infectieux de l'eau (Pouillot *et al.* 2002, Canivet 2005). Le modèle de dose réponse hypergéométrique ne permet pas cette hypothèse, à la différence du modèle exponentiel (Haas *et al.* 1999) et est biologiquement peu acceptable, car elle revient à assimiler une faible dose sur de nombreux jours à la même dose sur une journée.

Le risque de maladie est supposé indépendant d'un jour à l'autre, ce qui peut être considéré comme acceptable, vu la très faible immunité acquise aux infections à norovirus, probablement liée à la très forte diversité des souches et à la rapidité de l'évolution de celles-ci dans l'environnement, même au cours d'épidémies (cf. fiche Norovirus, Question 1).

L'estimation en DALY requiert l'estimation de plusieurs paramètres (cf. Question 8), à savoir la sévérité des symptômes, la fréquence de ceux-ci au sein des malades, la durée de ces symptômes, pour les différentes classes d'âge. Afin de simplifier l'approche et en absence de données de synthèse sur le sujet pour des pays européens, la classe d'âge considérée est celle supérieure à 15 ans. Tous les malades ont été supposés atteints par une diarrhée aqueuse (non sanglante), et la sévérité n'a été prise en compte que reliée à ce symptôme. La valeur de sévérité a été prise à 0.067, qui est la valeur correspondante pour une diarrhée aqueuse classique chez un adulte, empruntée au Global Burden of Disease Project et reprise par Havelaar (Havelaar & Melse 2003) et l'OMS (WHO 2004) pour différentes infections provoquant des diarrhées (*Campylobacter*, *Cryptosporidium*). La durée des symptômes suit une loi LogNormale tronquée, par analogie à l'approche d'Havelaar (Havelaar *et al.* 2000) sur *Cryptosporidium*. La durée des symptômes est au minimum de 1 jour, en médiane à 2 jours et au maximum de 7 jours (cf. fiche Norovirus, Question 1). Il aurait été préférable de disposer de distributions observées pour traduire au mieux la variabilité sur norovirus.

Au stade actuel de connaissance, deux mécanismes immunitaires expliquent la résistance de certains individus aux norovirus. Le premier serait lié à l'existence d'un récepteur particulier (Se+) à Norovirus et dont le déterminisme serait génétique. 20 % de la population serait résistante par absence de récepteur, mais on se servira des valeurs expérimentales obtenues par Lindesmith (Lindesmith *et al.* 2003) sur des volontaires pour estimer ce pourcentage et son incertitude. Ces personnes sont ou ne sont pas, toute leur vie durant, résistantes ou sensibles aux norovirus. Le deuxième mécanisme immunitaire n'est pas élucidé dans son déterminisme, et notamment si celui-ci est acquis ou inné (génétique). On va supposer que ce deuxième mécanisme (Ig-) est de même nature que le premier (inné), et donc perdure toute la vie durant. Les deux mécanismes sont supposés indépendants pour un même individu. Les valeurs utilisées pour prendre en compte le deuxième mécanisme de résistance/sensibilité et son incertitude associée sont issues de la publication de Lindesmith (Lindesmith *et al.* 2003). Ces deux valeurs vont intervenir à l'échelle de la population. L'avancée des connaissances permettrait d'étayer les hypothèses prises en compte ci-dessus.

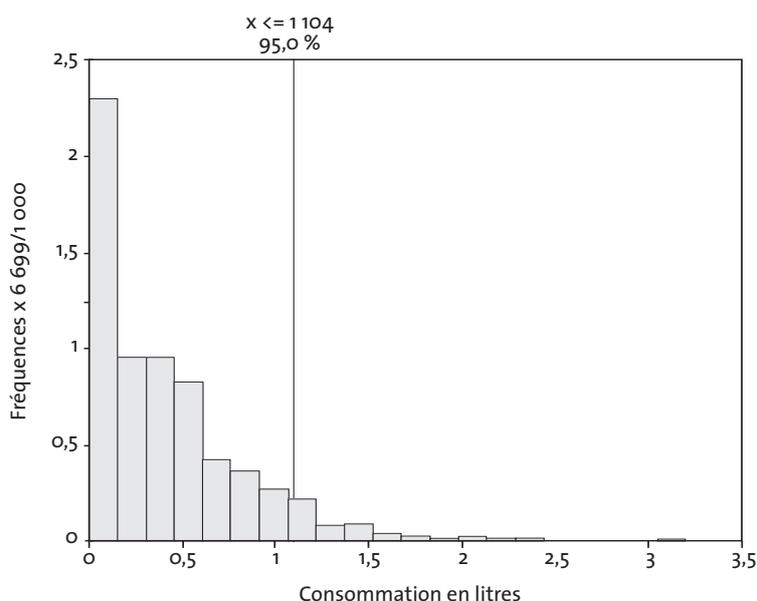
### B.1.4 Consommation d'eau

Les données utilisées sont issues de la base INCA1 (JL Volatier, coord) réalisée en 1998-1999. Les personnes étaient enquêtées pendant une semaine. Les périodes d'enquête étaient réparties équitablement suivant les saisons. Seuls les individus de plus de 15 ans de l'enquête ont été conservés, pour caractériser une population « adulte », soit les résultats de 1 440 individus. Parmi ces individus certains (483) ont déclaré ne pas avoir consommé d'eau du robinet non chauffée pendant la semaine d'étude. Ceux-ci ont été considérés, par hypothèse comme des non consommateurs d'eau du robinet. La proportion de consommateurs adultes est ainsi estimée à 66,45 %. Seule la consommation d'eau du robinet non chauffée a été prise en compte. L'efficacité du chauffage a donc été considérée ici comme maximale.

Compte tenu du grand nombre d'observations quotidiennes obtenues, soit 957 consommateurs observés pendant une semaine, la distribution utilisée est une distribution empirique réalisée sur les observations, comme cela avait été fait pour l'approche *Cryptosporidium*. Ceci évite un ajustement qui ne serait pas totalement correct mais peut sous-estimer certaines consommations extrêmes. Le grand nombre d'observations corrige en partie, ce problème. La consommation moyenne obtenue est de 0,404 litres, la consommation médiane de 0,322 litres, la valeur minimale (quotidienne) est de zéro, la valeur maximale de 3,2 litres ; ces valeurs peuvent être comparées à la valeur recommandée par l'US-EPA de 2 litres pour des adultes (cf. Question 8). La consommation a été prise de façon analogue au modèle de (Pouillot *et al.* 2004), c'est-à-dire prenant en compte la corrélation de la consommation au cours de la semaine, pour un même consommateur, entre les jours de consommation.

### Question 9

Figure 26 : distribution de la consommation d'eau quotidienne chez les plus de 15 ans



### B.1.5 Concentrations en génome considérées

La publication choisie en référence pour la contamination des eaux de surface est celle de Lodder (Lodder & de Roda Husman 2005). Les concentrations en génomes de norovirus détectés dans des eaux de surface (rivières) par RT-PCR étaient comprises entre 4 et 4 900 génomes détectables par litre. Dans cette approche, le nombre de génomes est obtenu par une approche utilisant des dilutions successives. Cette estimation est considérée comme juste, mais non corrigée des performances de la RT-PCR, à savoir la limite de détection et le rendement après extraction (cf. paragraphe ci-dessous). Dans les eaux usées non traitées issues de populations en période d'épidémie à norovirus, Lodder trouve des valeurs pouvant aller jusqu'à  $10^7$  génomes de norovirus par litre (Lodder *et al.* 1999). Laverick trouve des valeurs voisines dans les effluents de  $1$  à  $7 \cdot 10^7$  copies/10 L (Laverick *et al.* 2004). Dans le modèle, le nombre de génomes détectés dans un volume de prélèvement donné est censé avoir été corrigé du rapport du volume après extraction (par exemple 10  $\mu$ L) et du volume utilisé pour la réaction de RT-PCR (par exemple 1  $\mu$ L).

### B.1.6 Technique d'analyse et performances considérées

La technique de détection considérée est la RT-PCR. Pour les norovirus, la culture cellulaire n'est pas possible, et la détection est donc possible actuellement par des outils de biologie moléculaire, à savoir la RT-PCR ou la RT-PCR en temps réel.

Deux indicateurs des performances de la RT-PCR sont considérés, à savoir la limite de détection, et le rendement total comprenant la filtration et l'extraction. Ces deux paramètres sont supposés indépendants entre eux et indépendants du volume de prélèvement traité (entre 2 et 1 000 litres). Même si cette hypothèse n'est pas forcément vraie, nous ne disposons pas de données permettant d'en tenir compte.

Ces deux paramètres sont considérés comme identiques entre des RT-PCR visant à détecter différentes souches d'un même virus utilisant des amorces différentes. Par ailleurs la RT-PCR est supposée efficace sur les différentes souches (« antigenic types ») de norovirus présents dans l'eau de surface, alors que Lodder a montré pouvoir détecter au mieux 85 % des souches connues de norovirus (Lodder & de Roda Husman 2005).

#### Question 9

Les valeurs de performances pouvant être utilisées sont mal connues du fait de l'absence de standardisation (cf. Question 3), et du manque de publication portant sur le rendement notamment comprenant la phase d'extraction. À titre d'exemple, les valeurs prises en considération pour la limite de détection au niveau du prélèvement (avant filtration-extraction) sont issues de la publication de Lamothe (Lamothe *et al.* 2003). La valeur minimale est de 10 génomes (ou copies) ; la valeur la plus probable de 50 et la valeur maximale de 100 copies. Pour le rendement, les valeurs sont obtenues à partir de rendements observés sur de l'eau de surface (E. Dubois, Ferré, com.pers), tenant compte de situations moins favorables que celles prises en compte par Lamothe dans de l'eau minérale embouteillée. La valeur de rendement obtenue par Lamothe était entre 28 et 45 % (Lamothe *et al.* 2003). Les valeurs retenues sont au minimum de 5 %, la valeur la plus probable de 20 % et la valeur maximale de 70 % (cf. Question 3).

Les performances de la RT-PCR seront supposées identiques sur du génome infectieux et non-infectieux. L'approche par dilution successive permet d'établir des distributions de concentrations de génomes, par RT-PCR (Lodder & de Roda Husman 2005). La RT-PCR en temps réel est une technique qui, en suivant l'amplification à chaque cycle grâce à l'utilisation d'un fluorochrome, permet d'évaluer le niveau de contamination d'un échantillon ; et en se basant sur une gamme étalon d'estimer la quantité de génome présent. Les valeurs de performances sont aussi difficiles à estimer du fait de l'absence de standardisation notamment de la gamme-étalon (cf. Question 3). Si l'on devait considérer cette technique, on devrait estimer la limite de détection, de quantification et son rendement. Cette technique n'est pas considérée ici, mais pose les mêmes types de question que la RT-PCR. L'approche menée ici ne tient pas compte des performances de reproductibilité ni de répétabilité de la technique, par manque de données disponibles.

### B.1.7 Infectiosité (initiale) du génome viral

Ce paramètre est, de loin, le plus difficile à estimer. Si pour certains virus on peut mettre en parallèle des résultats de culture cellulaire, de sérologie et de RT-PCR, ce n'est pas le cas pour norovirus, et il faudra, dans ce cas, accepter d'extrapoler des résultats obtenus sur d'autres virus. Ce qui est recherché ici, c'est le rapport entre génomes issus de virus infectieux et génomes viraux. On peut admettre pour ces virus à transmission oro-fécale, que le point de départ est ce rapport dans les selles de personnes malades. On peut admettre que ce rapport peut être différent d'un individu à l'autre, et au cours de l'évolution de la maladie. Mais on dispose de peu d'informations sur le sujet. Les résultats sont exprimés en nombre de génomes/g de selles, le plus souvent, mais sans information sur l'infectiosité. On peut aussi rechercher à mieux expliciter ce rapport dans les eaux usées non traitées, traitées et dans les ressources en eau contaminée. Là encore, on ne dispose pas d'information permettant d'approcher ce rapport, même sur des virus différents de norovirus. Dans la publication de Lodder, les réovirus cultivables dans les eaux de surface représentent 1 % du génome détecté en norovirus (Lodder & de Roda Husman 2005). L'auteur estime alors comme plausible une valeur de 1 % entre génome infectieux et total. Par ailleurs, en absence d'autres données, les résultats de Monpoeho (Monpoeho *et al.* 2004) sur des entérovirus dans des boues d'épuration non traitées montrent que le rapport entre culture cellulaire et RT-PCR en temps réel est de 2 % à 1 % (sans correction sur les performances de la culture cellulaire ni de la RT-PCR en temps réel). Ce résultat est extrapolé ici aux norovirus, la valeur maximale prise en compte est de 2 %, la plus probable de 1 % et la valeur minimale de 1 %, pris comme paramètres d'une loi de Pert. Il est difficile de conclure si ces valeurs sont trop ou pas suffisamment élevées, et donc si ces hypothèses sont sécuritaires ou non. Ces questions, comme le paragraphe qui suit, sont à relier au logigramme de la Question 3. On pourrait dire que c'est le contexte (présence d'indicateurs bactériens, contexte environnemental ou épidémiologique) qui va permettre d'évaluer le pourcentage de virus infectieux/génomes totaux. On pourrait étudier l'importance de ce facteur par une analyse de sensibilité.

### B.1.8 Survie, effet du traitement

Entre la ressource en eau et le robinet du consommateur, il peut se dérouler différents événements (traitements, dilutions) susceptibles d'influer sur la survie du virus infectieux. Certaines études comparent la survie des génomes aux virus infectieux (Gassilloud *et al.* 2003) en comparant culture cellulaire et résultats de PCR, de sérologie et RT-PCR, des VLP et de RT-PCR (Caballero *et al.* 2004, Loisy *et al.* 2004, Loisy *et al.* 2005). Bien évidemment les travaux faisant appel à la culture cellulaire ne sont pas disponibles pour les norovirus, et avec les autres approches, on ne dispose pas de publication dans le domaine de l'eau, que ce soit en terme de survie ou d'efficacité de traitement. C'est pourquoi, bien que le modèle puisse tenir compte de niveaux d'abattement, lié à la survie ou au traitement, l'abattement ne sera pas considéré. Il serait possible cependant de tenir compte d'abattement théorique par analogie aux entérovirus (cf. Question 6), si cette hypothèse est considérée comme acceptable.

### B.1.9 Corrélations avec les indicateurs

Les données reliant des indicateurs à des virus infectieux et à des quantités de génomes sont restreintes. La revue de Lodder (2005) reliant bactériophages et quantités de génomes est, à ce titre intéressante (Lodder & de Roda Husman 2005). Cette corrélation pourrait s'exprimer sous la forme d'une présence/absence, ou, mieux encore décrire les distributions en parallèle des virus infectieux/indicateurs/génomes. Beaucoup d'approches en Appréciation Quantitative des Risques (cf. Question 8) estiment la quantité de virus infectieux à partir d'indicateurs (*E. coli*), en utilisant un ratio (cf. Question 8). Afin de valider ou d'infirmer cette approche, de mieux décrire la perte d'information en termes d'estimation de l'exposition, de telles études seraient importantes à mener.

## B.2 Efficacité attendue théorique d'un système de surveillance au niveau d'un captage

### B.2.1 De la définition des objectifs de santé au calcul des concentrations théoriques recherchées

Pour déterminer la gamme de concentrations à rechercher, deux approches sont possibles, une approche déterministe et une approche stochastique. Regli (1991) et l'US-EPA avaient défini un risque d'infection limite à  $10^{-4}$  cas d'infection/an. Regli en déduisait que la concentration limite de l'eau au robinet devait alors être de  $2,22 \cdot 10^{-7}$ /litre (Regli *et al.* 1991). À partir d'un DALY limite de  $10^{-6}$ /an, l'OMS en déduit une valeur limite de qualité de l'eau de boisson à  $1,6 \cdot 10^{-6}$ /L (pour un risque annuel d'infection de  $1,6 \cdot 10^{-4}$ ) (WHO 2004).

On peut aussi utiliser une approche stochastique. Pour une concentration de  $10^{-6}$  virus infectieux/L en utilisant l'approximation de Furumoto Mickey pour la dose-réponse de Rotavirus, en tenant compte de la variabilité de consommation on obtient un risque annuel d'infection en moyenne de  $1,6 \cdot 10^{-4}$  (Tableau 50).

Tableau 50 : risque annuel d'infection à Rotavirus

Conc :	Moyenne		Percentiles				
			25	50	75	90	95
	Est	1.64	0.5	1.30	2.31	3.54	4.36
	Clinf	0.11	0.03	0.08	0.15	0.23	0.28
	Clsup	7.59	2.33	6.04	10.70	16.43	20.23

Approche empirique par relation dose-réponse Beta-poisson, sans prise en compte des performances d'outils de détection, pour 10 000, pour des consommateurs d'eau du robinet non chauffée immunocompétents, pour une concentration de  $10^{-6}$  virus infectieux/L. Utilisation programme R Canivet, 2005 ; 200 itérations.

On peut retenir que la gamme de concentration à rechercher, sur un modèle de virus très infectieux, comme Rotavirus, est de l'ordre de  $10^{-7}$  à  $10^{-6}$  virus infectieux par litre dans l'eau du robinet. Dans toutes ces approches, on suppose que la dose-réponse est obtenue avec une dose quantifiée de manière parfaite en virus infectieux. Le contrôle ou le suivi peut aussi être effectué sur de l'eau avant traitement. Dans ce cas la concentration à détecter en virus infectieux, par exemple dans des eaux de surface ou des eaux usées, estimée sur des entérovirus peut aller de 0,2/litre à 300 pfu/litre (cf. Question 4 - Tableau 26).

### B.2.2 Efficacité d'un plan d'échantillonnage en absence d'agrégats, en fonction d'une concentration en virus infectieux (approche déterministe) et en fonction du volume prélevé

En absence de valeur connue de contamination en norovirus, une approche explicative est mise en place. Dans ce cas une approche déterministe suffit, les paramètres pour lesquels une incertitude a été évaluée sont pris en compte à la valeur la plus probable.

■ En absence d'agrégat, quel volume permet de détecter une concentration donnée en virus infectieux, avec une probabilité de 95 % ?

• **Hypothèses :**

- la technique de détection considérée est la RT-PCR ;
- le rapport entre génomes de virus infectieux/génomes totaux est de 1 % (valeur la plus probable). On a donc 100 fois plus de génomes viraux détectés que de génomes issus de virus infectieux ;
- le rendement d'extraction (R), indépendant du volume filtré, est le même pour du génome de virus infectieux ou non, et a pour valeur 20 % (cf. Question 3) (valeur la plus probable à définir) ;
- la limite de détection utilisée est de 10 ou 20 copies après filtration-extraction ;
- la dispersion des virus dans l'eau est aléatoire et suit une loi de Poisson.

• **Méthode utilisée :** approche déterministe (Tableau 51) dans EXCEL

**Tableau 51 : paramètres utilisés pour l'estimation du volume en absence d'agrégat**

Paramètre	Notation	Valeur
Concentration en virus infectieux à détecter	Concv	De $10^{-6}$ à $10^3$
Concentration en génomes	Concg	$= (1/Vi) * concv$
Concentration en génomes après extraction	Concge	$= R * concg$
Volume nécessaire pour détecter une concentration donnée, avec une limite de détection (LD) de 10 et 20 copies	V	$= \text{Loi.Gamma. Inverse}(0,95;LD;concge)$ La loi gamma inverse est la distribution gamma cumulée pour les caractéristiques ci-dessus

• **Résultats :**

**Tableau 52 : volume (en litres) du prélèvement nécessaire pour détecter dans 95 % des cas une concentration donnée en virus infectieux par RT-PCR (en faisant un seul prélèvement)**

Concentrations en Rotavirus infectieux	volumes en litres LD 10 copies	volumes en litres LD 20 copies
0,000001 – $10^{-6}$	785 261	1 393 961
0,00001 – $10^{-5}$	78 526	139 396
0,0001 – $10^{-4}$	7 852	13 939
0,01 – $10^{-2}$	78,5	139,4
0,1	7,85	13,94
1	0,79	1,39
10	0,08	0,14
100	0,01	0,01

*Sous réserve de l'acceptabilité des hypothèses formulées plus haut*

De très grands volumes, de l'ordre de 1 000 litres à plusieurs centaines de litres sont requis pour détecter du virus dans de l'eau distribuée. Ces volumes sont réduits à 10 litres pour des eaux fortement contaminées (Lodder & de Roda Husman 2005), voire à quelques litres (Dubois, com. Pers.). L'hypothèse de la constance des performances n'est plus si robuste si on s'intéresse à de très grands volumes. La faisabilité de manipuler de très grands volumes se pose. De ce fait il semble difficile de garantir par une telle approche la détection de très faibles concentrations, celles qui sont recherchées comme garantissant un niveau de sécurité suffisant, au robinet, chez le consommateur. Il est par contre envisageable de mener une stratégie d'échantillonnage avec des volumes acceptables au niveau des ressources ou des captages d'eaux superficielles. Par contre il faudra, dans ce cas, pour évaluer l'exposition, être en mesure de connaître ou d'évaluer l'efficacité de traitement et la survie jusqu'au consommateur. En multipliant les prélèvements sur une même ressource, l'efficacité s'améliore.

■ En l'absence d'agrégats, avec un volume de prélèvement d'1,5 et de 10 litres, combien doit on faire de prélèvements pour détecter une concentration donnée avec une probabilité de 95 % ?

En absence de valeurs connues de contamination en norovirus, et comme dans le cas précédent, une approche explicative est mise en place. Dans ce cas une approche déterministe suffit, les paramètres pour lesquels une incertitude a été évaluée sont pris en compte à la valeur la plus probable.

• **Hypothèses :**

- la technique de détection considérée sera de la RT-PCR ;
- les volumes de prélèvements utilisés sont d'1,5 et de 10 litres ;
- le rapport entre génomes issus de virus infectieux/génome total est de 1 % ( $V_i$ ) (valeur la plus probable). On aura donc 100 fois plus de génomes issus de virus non infectieux pouvant être détectés que de génomes infectieux ;
- le rendement d'extraction (R), indépendant du volume filtré, serait le même pour du génome de virus infectieux ou non, et a pour valeur 20 % (valeur la plus probable) ;
- la limite de détection utilisée est de 10 copies (valeur la plus probable) (LD) ;
- la dispersion des virus dans l'eau est aléatoire et suit une loi de Poisson.

• **Méthode utilisée :** approche déterministe (Tableau 53) dans EXCEL, d'après Vose (2000)

**Tableau 53 : paramètres utilisés pour déterminer le nombre de prélèvements à réaliser en absence d'agrégats afin de détecter une concentration donnée de virus infectieux**

Paramètre	Notation	Valeur
Concentration en virus infectieux à détecter	Concv	De $10^{-6}$ à $10^3$
Concentration en génomes	Concg	$= (1/V_i) * Concv$
Nombre moyen dans 1,5 litres de prélèvement	Nv	$= 1,5 * Concg$
Nombre moyen après extraction	Ne	$= R * Nv$
Probabilité de détection pour un prélèvement d'1,5 litres, et une LD de 10 copies	P1	$= 1 - \text{Loi.Poisson}(LD-1; Ne; \text{Vrai})$
Probabilité de détection pour n prélèvements de 10 litres et une LD de 10 copies	Pn	$= 1 - \text{Loi.Binomiale}(0; n; P1; \text{Faux})$

• **Résultats :** approche déterministe (Tableau 54) ( sous EXCEL) :

**Tableau 54 : nombre de prélèvements à effectuer pour détecter une concentration donnée de virus infectieux, pour un volume donné de chaque prélèvement, pour une probabilité de détection supérieure à 95 %**

Concentration en virus infectieux/litre	Nombre de prélèvements nécessaires pour détecter au moins un prélèvement positif dans 95 % des cas pour des prélèvements d'1,5 litres	Nombre de prélèvements nécessaires pour détecter au moins un prélèvement positif dans 95 % des cas pour des prélèvements de 10 litres
0,01		75 000
0,02		400
0,05		4
0,07		2
0,08		1
0,1	2 750	1
0,2	35	1
0,3	6	1
0,4	3	1
0,5	2	1
0,6	1	1

Les résultats montrent, comme précédemment, que pour des volumes modérés de prélèvement, le nombre de prélèvements requis pour garantir que le niveau de sécurité en terme de concentration en virus infectieux est atteint (c'est-à-dire pour des concentrations de l'ordre de  $10^{-6}$  virus/L) n'est pratiquement pas envisageable pour des prélèvements effectués au niveau du robinet. Par contre, ces résultats montrent la faisabilité d'une telle approche sur l'eau brute. On peut se référer, par comparaison, à la fréquence d'échantillonnage annuelle pour caractériser une unité de distribution de débit donné (cf. Question 2). Ces résultats sont à modérer, du fait des hypothèses qui ont dû être formulées et sont, par exemple, dépendants des valeurs prises pour caractériser les performances de la RT-PCR et qui sont à valider par d'autres études. L'effet d'une des hypothèses sur le résultat, à savoir la dispersion homogène des virus dans l'eau est cependant analysée dans le paragraphe ci-dessous.

### B.2.3 Efficacité d'un prélèvement en présence d'agrégats et/ou d'une répartition non constante dans l'eau

#### • Répartition non homogène-homogène de virus dans l'eau

On va considérer deux situations différentes : dans le premier cas, on ajuste un jeu de données théoriques quantitatives en génome viral (corrige des performances) par une loi de Poisson, de paramètre  $\mu$  (moyenne) égal à 29, et dans le deuxième cas par une loi de Poisson, de même moyenne,  $\mu$ , mais  $\mu$  suit une loi Gamma (0.0682, 429.26). Cette loi Gamma traduit une sur-dispersion du paramètre  $\mu$  d'une loi de Poisson, et donc une relative non-homogénéité de la dispersion des virus entre des prélèvements différents. Si la technique de détection a un rendement de 70 % et une limite de détection de 6 copies (après avoir tenu compte du rendement), on peut montrer après 1000 simulations par échantillonnage par hypercube-latin, que la probabilité de détecter un échantillon positif est de 20,9 % pour un échantillon dont la contamination virale suit une loi Gamma-Poisson, et de 100 % pour un échantillon dont la contamination suit une loi de Poisson. Si la technique de détection a un rendement d'extraction de 70 % et une limite de détection de 30, les résultats s'inversent : on a 12,3 % de chances de détecter un échantillon dont la contamination virale suit une Loi Gamma-Poisson et 1,1 % pour ceux qui suivent une loi de Poisson. En effet la probabilité d'une contamination qui s'écarte de la moyenne est plus faible pour la loi de Poisson que pour la loi Gamma-Poisson. Si la limite de détection est plus élevée, et dépasse largement la moyenne, en tenant compte du rendement de 70 %, ce qui est notre deuxième cas considéré, la probabilité d'avoir une valeur supérieure à la moyenne (et supérieure à la limite de détection en tenant compte du rendement) sera plus élevée pour la gamma-Poisson que pour la loi de Poisson. La connaissance des distributions de contamination de virus dans les eaux est donc essentielle pour estimer l'efficacité théorique d'un plan d'échantillonnage, de même que les performances des outils de détection. La Loi Gamma-Poisson s'écrit aussi sous la forme d'une loi Négative-Binomiale.

#### • Répartition homogène d'agrégats

On peut imaginer un autre dispositif qui aboutit en moyenne au même nombre de virus dans un prélèvement donné, à savoir 29,3. Dans ce cas, les agrégats seraient répartis de façon aléatoire et le nombre de ces agrégats dans les prélèvements suivrait une Loi de Poisson de moyenne 2,927. On peut imaginer que le nombre de virus dans ces agrégats suivrait une loi normale de moyenne 10 et d'écart type 1, c'est-à-dire qu'en moyenne il y aurait 10 génomes par agrégat. Ce type de dispositif pour des agrégats a été proposé par Vose (com.pers, 2004). Les résultats sont indiqués dans le Tableau 55 ci-dessous :

**Tableau 55 : probabilité de détection d'un prélèvement dont la contamination virale est en moyenne de 29 particules virales, sous différentes hypothèses de dispersion et de limite de détection, pour un rendement de la technique de détection de 70 %**

	Répartition homogène de virus (Poisson)	Répartition surdispersée de virus (Negative Binomiale)	Répartition homogène d'agrégats Poisson et Normale
LD =6 copies	100 %	20,9 %	93,1 %
LD=30 copies	1,1 %	12,9 %	21 %

#### • Répartition non homogène d'agrégats

Un dernier dispositif serait d'imaginer une répartition non homogène d'agrégats. Cela suppose de connaître, là encore, la distribution des virus dans les agrégats. On obtiendrait encore une probabilité de détection différente.

En conclusion, il est important de mieux apprécier la contamination de la ressource que l'on veut échantillonner par une pré-étude. Cela passe par l'examen d'un certain nombre d'échantillons, de travaux sur la distribution de virus dans les agrégats et la taille de ceux-ci, ainsi que les performances des outils de détection.

### B.2.4 Risque annuel d'infection et risque annuel en DALY pour Norovirus (exercice théorique) à partir d'une concentration de génomes déterminée par RT-PCR dans l'eau

La population concernée est une population adulte d'âge supérieur à 15 ans, soumise à une exposition commune par consommation d'eau du robinet non chauffée à un risque d'infection, de gastroentérite, et à un certain nombre de DALY/an à Norovirus.

#### B.2.4.1 Hypothèses principales

- Toutes les hypothèses et les valeurs prises en compte ont été explicitées dans la partie « B.2.1 De la définition des objectifs de santé au calcul des concentrations théoriques recherchées ».

#### B.2.4.2 Méthode

- La méthode est explicitée dans le Tableau 58 et la Figure 27.
- L'approche menée est une analyse de risque de second ordre séparant variabilité et incertitude (cf. Question 8), comme cela avait été mené dans le modèle (Pouillot, Beaudeau, Denis, Derouin, 2004).
- Les résultats ont été obtenus à l'aide du logiciel @risk version 4.5 (PALISADE corporation, NewField, NY). Chaque résultat a été obtenu à l'aide de 1000 itérations pour la variabilité et de 100 simulations pour l'incertitude. Le tirage au sort a été effectué grâce à un échantillonnage par Hypercube Latin, ce qui permet d'être plus efficace pour un même nombre d'itérations ou de simulations qu'un échantillonnage de Monte Carlo (Vose 2000).
- La dose-réponse utilisée, les modalités de calcul du DALY sont explicitées dans la partie « B.2.1 De la définition des objectifs de santé au calcul des concentrations théoriques recherchées » et dans la Question 8.
- L'effet d'un éventuel traitement n'a pas été pris en compte ici, mais le modèle peut en tenir compte.

#### B.2.4.3 Résultats

**Tableau 56 : résultats sur le risque annuel d'infection à norovirus/10 000 pour des consommateurs adultes d'eau du robinet en fonction d'une concentration détectée en génomes/L pour un prélèvement de 10 litres**

Conc	Moyenne		Percentiles				
			25	50	75	90	95
1000/10 L ou 100/L	Est	2641	9*10 <sup>-3</sup>	3904.58	4299.55	4475	4476
	Clinf	720.57	0	0	0	3351.23	3429
	Clsup	4207	3703	5301.5	5413	5528	5529
0/10 L	Est	604.82	0	0	0	3408	4232
	Cinf	0	0	0	0	0	0
	Clsup	1400	0	0	2817	5301.5	5376

**Tableau 57 : résultats en DALY pour norovirus/10 000 pour des consommateurs adultes d'eau du robinet/an en fonction d'une concentration détectée en génomes/L pour un prélèvement de 10 litres**

Conc	Moyenne		Percentiles				
			25	50	75	90	95
1 000/10 L ou 100/L	Est	1.15	2*10 <sup>-6</sup>	0.95	1.64	2.69	3.5
	Clinf	0.32	0	0	0	1.42	2.15
	Clsup	1.84	1.01	1.53	2.53	3.9	4.84
0/10 L	Est	0.2633	0	0	0	0.674	1.645
	Cinf	5.6*10 <sup>-2</sup>	0	0	0	0	0
	Clsup	0.67	0	0	0.825	2.165	3.16

## Question 9

- Le Tableau 56 et le Tableau 57 montrent les résultats attendus en risque annuel d'infection et en DALY pour différentes concentrations moyennes de génomes détectés dans 10 litres d'eau brute au cours de l'année, en absence de traitement de l'eau pour 10 000, pour des consommateurs adultes d'eau du robinet. Pour une même ligne de chaque tableau, pour une concentration donnée, la variabilité au sein de la population est traduite par des percentiles distincts. Par exemple, dans le tableau sur le risque d'infection, pour une concentration de 1 000 génomes/10 litres, 5 % de la population a 44,76 % de risque de contracter au moins une infection dans l'année et en moyenne le risque est de 26,41 %. Les Clinf (limite inférieure à 95 % de l'intervalle de crédibilité) et Clsup (limite supérieure à 95 % de l'intervalle de crédibilité) sont les intervalles de crédibilité à 95 % de chacun des percentiles, prenant en compte l'incertitude des paramètres. Pour une valeur nulle (absence de détection), la valeur de génomes peut être comprise entre zéro et cette limite de détection (incertitude). Il est donc logique que la valeur du Clinf en présence d'une valeur nulle soit 0. Les intervalles de crédibilité sont ici importants et traduisent l'effet des limites de connaissances. Il est même envisageable que certaines hypothèses ayant permis d'évaluer cette incertitude sont encore discutables et c'est pourquoi les résultats figurant ici doivent être considérés avec précaution ou à titre d'exercice théorique.
- **Suivant le critère sanitaire (risque d'infection-DALY), les concentrations acceptables ne seront pas les mêmes.** Le critère de  $10^{-6}$  DALY/an sera atteignable pour des concentrations plus élevées de virus, pour des maladies où le DALY/cas est faible, comme c'est le cas pour norovirus, comparé par exemple au rotavirus chez l'enfant ou au VHA chez l'adulte. Pour norovirus, le critère sur le risque d'infection/an est plus sécuritaire, plus exigeant en terme de concentration que le DALY/an. **Le critère DALY/an oblige, dans ce cas, à réfléchir à des niveaux de concentrations acceptables différents pour chaque virus, voire pour chaque classe d'âge.** Dans ce cas, deux approches sont envisageables : soit intégrer la structure démographique de la population pour une approche globale, soit garder le niveau de risque acceptable pour la population la plus fragile. L'approche en DALY, qui tient compte de la sévérité et de la durée des symptômes, est considérée comme plus informative que le risque d'infection, et est donc davantage utilisée par l'OMS dans le domaine de l'eau pour hiérarchiser les besoins en terme de gestion de risque (WHO 2004).
- Sous réserve de l'acceptation des hypothèses formulées dans la partie « B.2.1 De la définition des objectifs de santé au calcul des concentrations théoriques recherchées », **les résultats observés ici sont cohérents avec ceux obtenus avec du virus infectieux par d'autres approches AQR.** L'approche menée ici tient compte de la variabilité de la consommation, de la variabilité de la réponse entre deux individus, du fait qu'un virus infectieux est au minimum requis pour générer une infection, du caractère non cumulable d'une dose entre deux jours différents. Ces hypothèses semblent plus réalistes que celles effectuées classiquement dans les AQR publiées dans le domaine de l'eau. On observe de ce fait des résultats qui semblent moins sécuritaires que par d'autres approches AQR, utilisant notamment la relation beta-poisson comme relation dose-infection pour rotavirus si on compare dans les deux cas le risque obtenu pour une même concentration de virus infectieux (en tenant compte de la réceptivité des personnes).
- L'approche en génomes par RT-PCR **pose la question de l'acceptabilité des hypothèses sur les performances, et du ratio génomes de virus infectieux/génomes totaux.** Ce ratio a été estimé ici dans de l'eau brute, ou de l'eau de surface qui n'a pas subi de traitement. Selon le contexte ce ratio risque d'évoluer de façon considérable (cf. logigramme en Question 3). **On pourrait, comme cela est suggéré dans le logigramme essayer d'établir un lien, une corrélation quantitative entre ce ratio et un contexte donné, par exemple si celui-ci s'exprime en concentrations d'*E. coli* indicateur.**
- En dehors des hypothèses formulées dans la partie « B.2.1 De la définition des objectifs de santé au calcul des concentrations théoriques recherchées », il faut rappeler certaines limites du modèle explicité ci-dessus. Celui-ci ne prend pas en compte la transmission secondaire inter-humaine comme cela est évoqué dans la Question 8.
- L'approche peut sous estimer le nombre de DALY réels par an. En effet, de façon classique (Havelaar *et al.* 2000, Pouillot *et al.* 2004), l'estimation porte sur le risque de tomber malade au moins une fois par an (pour une personne sensible). Si l'immunité acquise au cours de cette infection est longue et dure plus d'un an, le risque annuel peut être utilisé pour estimer le nombre de cas de maladie/an (incidence annuelle) attendu sur une population de taille donnée en multipliant ce risque par la taille de la population exposée. Dans le cas des infections à norovirus, cette immunité est considérée comme très faible, du fait de l'évolution très rapide des souches en présence (cf. fiche Norovirus) et de l'absence d'anticorps protecteurs. Il est donc théoriquement possible qu'une personne puisse s'infecter et tomber malade plusieurs fois dans l'année. Le modèle ci-dessus estime le nombre de personnes qui vont tomber au moins une fois malade dans l'année et non le nombre de cas de maladie et c'est sur cette base qu'est calculé le coût sanitaire en DALY. Les approches menées par l'OMS ou le RIVM n'en tiennent pas compte non plus (Havelaar *et al.* 2000, Pouillot *et al.* 2004, WHO 2004). Enfin l'estimation de la sévérité pour le calcul du DALY ne porte que sur un seul symptôme, une diarrhée simple durant au maximum 7 jours, et certaines études évoquent d'autres symptômes plus graves ou plus longs selon les classes d'âge (Mead *et al.* 1999, Rockx *et al.* 2002). Une telle approche serait un peu délicate à mener car la

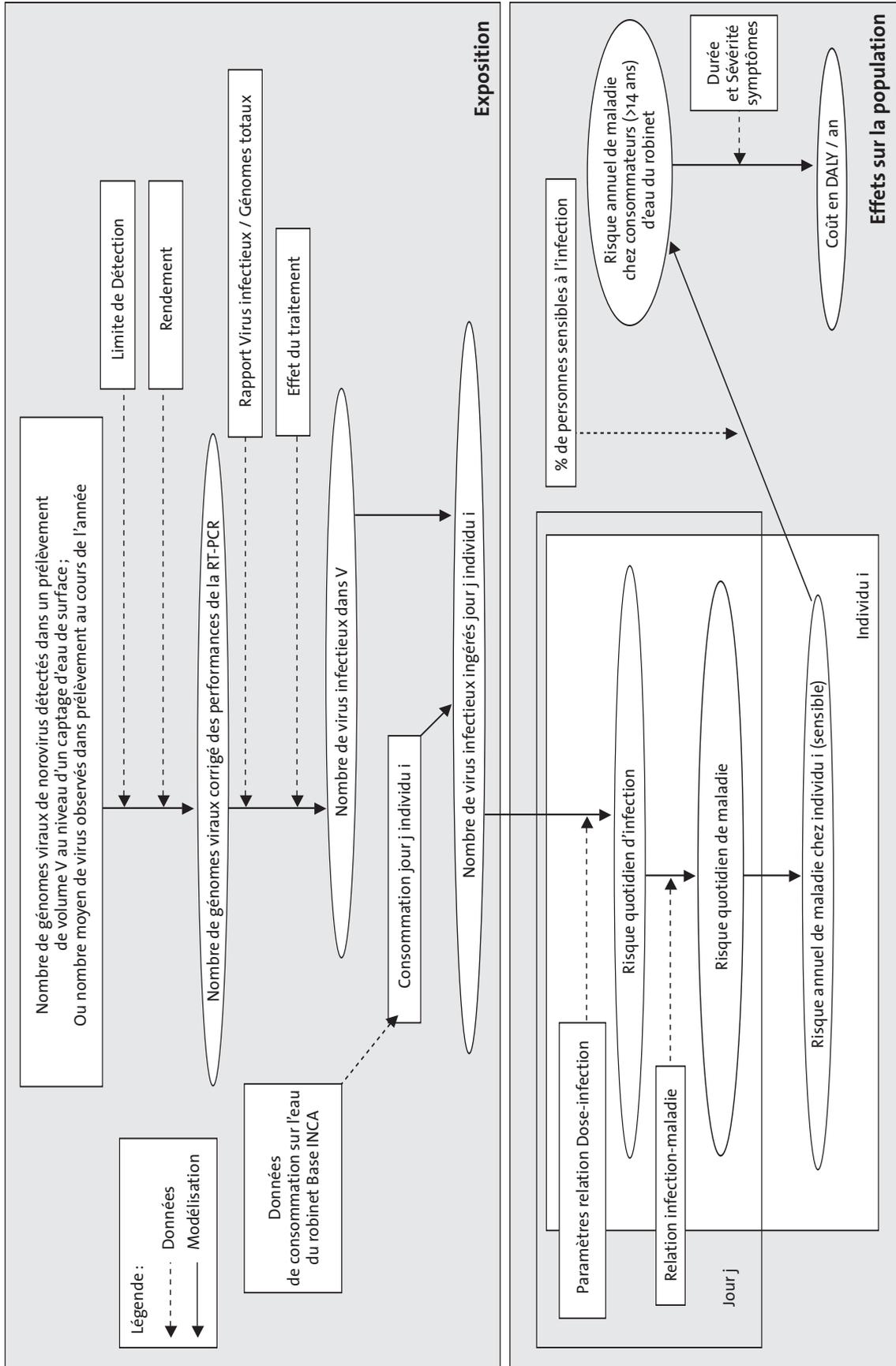
consommation d'eau n'est estimée que sur une semaine pour un individu, que l'estimation de la contamination reste théorique, et que l'immunité après l'infection devrait être documentée. Pour une période de temps courte, le modèle ci-dessus (compte tenu de toutes les autres limites évoquées plus haut) peut être considéré comme valide. Ce type d'approche serait intéressant à mener si on disposait d'éléments sur la variabilité temporelle de la contamination, sur la consommation suivie des individus sur différentes périodes de l'année, sur l'immunité acquise à norovirus et sur les variants en circulation au cours de l'année dans la ressource considérée.

**Tableau 58 : paramètres et méthode du modèle d'évaluation du risque annuel et quotidien**

Variable	Description	Distribution	Prise en compte
I	indice de l'individu	de 1 à 6000	
J	indice de la journée dans l'année	de 1 à 365	
N	nombre de génomes détectés/j ou en moyenne dans l'année	données	
VP	volume de prélèvement	données	
LD	limite de détection	$Pert(10;50;100)$	Incertitude (100 simulations)
N1	nombre de génomes effet LQ	$SI(N>LQ;N;Uniforme(0;LQ))$	
R	rendement	$Pert(0.05;0.2;0.7)$	Incertitude (100 simulations)
N2	nombre de génomes effet rendement	$N1/R$	
RGI	génomes infectieux/non infectieux	$Pert(0.001;0.01;0.02)$	Incertitude (100 simulations)
N3	nombre de génomes infectieux dans volume prélevé	$N3*RG1$	
N4	nombre de génomes infectieux après abattement X en Log lié au traitement	$N3*PUISSANCE(10,-X)$	X pris à zéro ici
VC	consommation/jour d'un buveur d'eau du robinet >14 ans en litres	Distribution empirique (Données Inca)/1000	Variabilité (1 000 itérations)
Nij	nombre de particules ingérées pour chaque consommateur i jour j	Loi Poisson( $N4*VC/VP$ )	Variabilité (1 000 itérations)
Se+	probabilité d'être sécréteur Se+ et sensible aux norovirus	Loi Beta(65,23)	Incertitude (100 simulations)
Ig-	probabilité d'être sensible par absence de réaction immunologique	Loi Beta(35,22)	Incertitude (100 simulations)
$\alpha_k$	1 000 paramètres A1 de la relation dose-infection Hypergéométrique	Données Teunis*	Incertitude (100 simulations)
$\beta_k$	1 000 paramètres A2 de la relation dose-infection Hypergéométrique	Données Teunis*	Incertitude (100 simulations)
rij	variabilité du paramètre r entre 2 relations individus-virus	Loi Beta( $\alpha;\beta$ ) avec $\alpha_k$ et $\beta_k$ pour la k <sup>ième</sup> simulation	Variabilité (1 000 itérations)
Pij	probabilité d'infection sans prise en compte de l'immunité	$(1-PUISSANCE(1-rij;Nij))$	
RIQij	risque quotidien d'infection pour 10 000 consommateurs adultes	$(1-PUISSANCE(1-rij;Nij))*(Se+)*(Ig-)*10\ 000$	
Pm	probabilité d'être malade sachant l'infection	0.5	Incertitude non estimée
RMQij	risque quotidien de maladie pour 10 000 consommateurs adultes	$RIQ*Pm$	
D	durée des symptômes en années (médiane 2 entre 1 et 7 jours)	(Lognormale(2; 2.4; Tronquée(1;7)))/365	Variabilité(1 000 itérations)
S	sévérité des symptômes	0.067	Variabilité non estimée
RAI	risque annuel d'infection pour 10 000 consommateurs	Calcul sur la semaine de consommation puis sur l'année	
RAM	risque annuel de maladie pour 10 000 consommateurs	Calcul sur la semaine de consommation puis sur l'année	
DALY	DALY/an pour 10 000 buveurs d'eau du robinet > 14 ans	$RAM*S*D$	

\* L'incertitude sur les paramètres  $\alpha$  et  $\beta$  a été estimée par Teunis (com.pers.) par la relation hypergéométrique confluyente gaussienne et avec une résolution par MCMC sur Mathematica.

Figure 27 : schéma de l'approche AQR Norovirus/eau du robinet



### B.2.5 De l'analyse qualitative à l'analyse quantitative par l'approche bayésienne

La quantification par dilution successive d'un résultat obtenu par RT-PCR est documentée (Lodder & de Roda Husman 2005). Des approches bayésiennes ont aussi été utilisées sur le sujet (Gelman *et al.* 2004).

Par contre, la quantification par la multiplication de petits prélèvements de taille identique, pour caractériser la contamination d'un réservoir ou d'une ressource à un moment donné n'est pas connue et vraisemblablement sous-utilisée. On pourra se référer pour cette approche au livre de (Vose 2000) page 365, en tenant compte de la limite de détection et du rendement de la technique de détection qui doivent être connus. La technique est relativement simple si la dispersion peut être considérée comme homogène, sinon l'estimation sera délicate, reposera sur d'autres hypothèses et l'imprécision sera encore plus forte.

Le principe de l'approche est le suivant : on a pu constater que la probabilité de détection dépend de la concentration en génomes présents dans le réservoir et du volume de prélèvement. On peut aussi concevoir intuitivement que le nombre de prélèvements trouvés positifs sur le nombre de prélèvements effectués va aussi dépendre de cette concentration (et du volume échantillonné). Et inversement, toujours de façon intuitive, il est possible d'admettre qu'il doit exister une valeur plus probable de concentration pour laquelle on maximise la probabilité d'observer un certain nombre de prélèvements positifs sur le nombre de prélèvements testés.

L'approche bayésienne permet à partir d'une loi *a priori* non informative sur les valeurs de concentration (*priori*) et à partir des données observées, d'obtenir une distribution de probabilité (dite distribution *a posteriori*) sur les valeurs de concentration.

### B.2.6 Plan d'échantillonnage pour l'évaluation des risques dans le domaine de l'eau brute : aspects temporels et spatiaux

#### B.2.6.1 Aspects temporels

Les contaminations accidentelles :

- dans la plupart des ressources on peut considérer le cas de contaminations accidentelles aiguës (traitement défectueux de l'eau par exemple, rupture de canalisation) ou chroniques (by-pass non détecté). Si ces contaminations sont responsables d'effets sanitaires constatés non négligeables, il est important d'en tenir compte. **Dans le cas de contaminations accidentelles aiguës, la fréquence et la durée de la contamination peuvent être investiguées par type d'installation. La fréquence d'échantillonnage doit permettre de détecter ces accidents pour un type d'installation, si on veut en tenir compte dans l'évaluation ;**
- l'objectif est de déterminer la distribution de la contamination de l'eau (avec ou sans contamination chronique) au cours du temps, si possible une année, avec et sans contamination aiguë, qui peut être traitée à part ou non. Le mieux est de disposer d'une pré-étude, comme c'était le cas pour *Cryptosporidium* (Pouillot *et al.* 2002). On est alors en mesure de connaître la loi qui s'ajuste le mieux aux données et le nombre de paramètres à estimer. On est alors en mesure d'estimer la fréquence d'analyse minimale pour éviter un risque de sous-estimation d'un risque sanitaire à partir des données de contamination (Pouillot *et al.* 2002). La fréquence d'échantillonnage pour *Cryptosporidium* pour caractériser une ressource était de 3 analyses par mois. **Une fréquence d'une fois par semaine serait intéressante pour une pré-étude, avec des analyses plus resserrées pour des semaines prises au hasard.** En effet, comme pour les problèmes spatiaux, la dimension temporelle est continue et peut être analysée à différentes échelles. Comme la consommation est relevée à l'échelle de la journée, la contamination peut au minimum refléter la variabilité entre deux jours. Et même là se pose la question de la variabilité temporelle à l'échelle de l'heure, si elle peut exister.

#### B.2.6.2 Aspects spatiaux

De la même façon que l'aspect temporel se pose, l'aspect spatial peut être investigué. Pour caractériser un type de ressource, il faudra vraisemblablement en analyser plusieurs, et le nombre va dépendre de la variabilité existante entre deux ressources, et donc des résultats d'une pré-étude. Au robinet, le problème est plus simple pour l'eau que pour un aliment, car un logement n'est approvisionné que par une ou un nombre limité de différentes ressources dont l'origine peut être connue.

### B.2.7 Indicateurs microbiologiques ou recherches virales pour l'évaluation des risques ?

Pour traiter cette question il faudrait disposer, parallèlement aux mesures de virus (infectieux + génomes ou seulement des génomes) des mesures d'indicateurs microbiologiques. On pourrait tester l'approche émise dans certaines AQR établissant un ratio quantitatif entre indicateurs microbiologiques et concentrations en virus infectieux (cf. Question 8) ou toute autre relation, tester la corrélation entre les 2 variables, voire en estimer la validité. On pourrait comparer ce type d'approche avec l'approche exacte, par la mesure directe de virus, et comparer les résultats obtenus pour l'évaluation des risques.

## C. Améliorations des connaissances - propositions de thématiques de recherche

### C.1 Détermination des performances des outils de quantification par RT-PCR pour chaque virus/matrice

Indépendamment des exigences nécessaires à l'interprétation en terme de risque sanitaire des résultats de RT-PCR (cf. Question 3), la connaissance des performances d'une méthode de détection et/ou de quantification et de l'incertitude des résultats apparaît nécessaire afin d'évaluer de façon précise l'efficacité d'un système de surveillance.

Il n'existe pas, dans le domaine précis de la virologie moléculaire, de référentiel décrivant les caractéristiques des méthodes à étudier ainsi que le moyen de les évaluer. Néanmoins, de récentes procédures de validation dans le domaine de la microbiologie des aliments ont été proposées et peuvent trouver assez naturellement leur application aux outils de détection des virus.

#### Question 9

Actuellement, la norme NF EN ISO 16140 est certainement celle qui fait référence en la matière. Applicable pour la validation de méthodes alternatives, elle est néanmoins suffisamment descriptive pour définir un plan d'échantillonnage et les principes de mesure de la linéarité de la réponse d'une méthode quantitative, de sa fidélité, du rendement de récupération, des limites de détection et de quantification, de la répétabilité et de la reproductibilité (dont on peut déduire l'incertitude de mesure). L'approche intègre l'ensemble des performances des outils analytiques depuis le traitement de l'échantillon, jusqu'à la détection finale du marqueur viral. Ceci devrait également simplifier les modèles mathématiques d'appréciation du risque qui, aujourd'hui encore, sont construits sur de fortes incertitudes quant à l'efficacité de chacune des étapes. D'autres procédures pourraient aboutir à des évaluations satisfaisantes. Les travaux actuels du Comité européen de normalisation (CEN/TC275/WG6/TAG4 « Detection of viruses in food ») sur la définition de protocoles d'analyse vont certainement dans ce sens. Cependant, l'exemple de modèles d'appréciation du risque lié à l'eau montre l'importance non seulement de définir des valeurs de performance pour la famille de matrices étudiée et un type de virus recherché, mais aussi de préciser la dispersion des résultats. Cette estimation de l'incertitude permet en effet de définir le degré de crédibilité d'un résultat dans un intervalle donné de valeurs.

### C.2 Détermination de la contamination des aliments et de l'eau

Comme cela a été évoqué dans la Question 8, la mesure de la contamination est le premier élément limitant, pour évaluer l'exposition, mais aussi en tant que pré-étude permettant d'évaluer l'intérêt de la mise en place d'un système de suivi virologique en plus du suivi microbiologique. Pour mesurer l'exposition, ce sont les données de contamination les plus proches possible du moment de consommation qui sont recherchées. En terme d'outil d'aide à la gestion, ce sont des données à d'autres stades de la production qui peuvent être intéressantes. La mesure de génomes viraux dans l'eau de surface est particulièrement intéressante (stratégie d'échantillonnage évoquée plus haut en paragraphes « Aspects temporels » et « Aspects spatiaux »). En effet, la présence virale sera plus facile à mettre en évidence, car les concentrations sont plus élevées, et la probabilité que le génome soit infectieux plus élevée que pour l'eau sortant d'une unité de distribution après traitement. Mais dans ce cas, pour évaluer l'exposition, il faudra être en mesure d'évaluer quantitativement l'abattement lié au traitement, sur le pouvoir infectieux des virus (et pas seulement sur la perte de génomes viraux).

La mesure doit se ramener à une mesure quantitative de génomes, par utilisation de la RT-PCR en temps réel, ou par dilutions successives ou encore en multipliant les petits échantillons sur un même prélèvement (cf. approche bayésienne), ces approches quantitatives étant plus faciles à mettre en œuvre sur des niveaux de contamination relativement élevés, comme de l'eau de surface ou dans de l'eau issue de stations d'épuration.

Des études ponctuelles sur le terrain, au cours desquelles sont recherchés les marqueurs de présence virale, ont été réalisées essentiellement sur les coquillages, moins fréquemment sur l'eau et très rarement sur les denrées végétales. Il est nécessaire de renforcer les travaux dans ces domaines et d'associer les résultats à des éléments d'interprétation du pouvoir infectieux potentiel des virus détectés.

Les informations que pourraient apporter des études ciblées en renforçant l'échantillonnage sur les denrées détectées positives seraient utiles pour apprécier soit la durée pendant laquelle une matrice est soumise à des expositions fécales de la même origine (les outils de traçabilité moléculaire pourraient contribuer à identifier cette origine commune), soit le temps nécessaire à voir disparaître un danger dans une matrice soumise aux conditions naturelles de sa production ou de sa conservation (les outils mesurant des cinétiques comme la PCR en temps réel ou la quantification du caractère infectieux seraient à privilégier).

Enfin, l'étude des propriétés d'adsorption, d'agrégation des virus, pourrait répondre aux questions sur l'hétérogénéité de la contamination des matrices alimentaires et contribuerait également à réduire l'incertitude de mesures en virologie. Ces études consisteraient, par exemple, à comparer les résultats de dilutions successives avec ou sans destruction des agrégats.

Les investigations des dernières épidémies virales liées aux aliments montrent que le plus souvent la contamination de l'aliment intervient lors des phases de préparation ou de conditionnement. En effet, les facteurs principaux de contamination sont l'eau (lors de l'irrigation ou du lavage) et le préparateur lors des transformations. Seuls les coquillages présentent une contamination naturelle par le milieu dans lequel ils sont récoltés. Dans une telle situation, la surveillance de l'eau servant à l'alimentation ou à la préparation des aliments et des coquillages semble la plus intéressante, même si cela n'exclut pas l'intérêt d'études sur des produits parfois sensibles, comme les produits maraîchers, radis, salades, et les framboises, pour évaluer l'exposition de façon plus précise pour les consommateurs (Question 5). Enfin, il faut mener de front la recherche virale et celle des indicateurs, si l'on veut mieux appréhender l'insuffisance ou l'intérêt de ces derniers.

### **C.3 Comment améliorer les connaissances permettant d'appréhender la relation génome issu de virus infectieux/non infectieux**

Récemment encore, les outils de détection des génomes viraux fournissaient des résultats qualitatifs en terme de présence ou absence d'une contamination, sans donner d'information sur le niveau de contamination (élevé ou faible) et le potentiel infectieux des virus. Les outils de PCR en temps réel ouvrent aujourd'hui des perspectives d'estimation de la quantité de virus dans les matrices. Toutefois, on peut s'interroger sur l'incertitude des résultats avec de faibles quantités de génomes viraux détectés à partir de denrées qui seraient naturellement contaminées. Cependant, nous n'avons pas aujourd'hui le recul nécessaire pour estimer si cette quantité de génomes viraux dans les matrices impliquées dans des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) est réellement faible ou pas. Deux approches méthodologiques pourraient également contribuer à associer à un résultat de biologie moléculaire, la notion d'un risque infectieux ou pas. Soit les travaux de recherche contribuent à identifier des éléments directement associés au pouvoir infectieux des virus, soit ils tentent de modéliser cette relation. Ainsi l'appréciation du risque sanitaire serait consolidée par des études sur la proportion de virus infectieux et non infectieux excrétés par les personnes infectées, la durée de cette excrétion, et le devenir des virus (génome et caractère infectieux) dans l'environnement et dans les matrices, en fonction des conditions de production. Des résultats obtenus au niveau cellulaire peuvent aussi être intéressants : l'hypothèse du single-hit, à savoir l'efficacité d'un seul virus pour produire une infection chez l'individu, peut-elle déjà être vérifiée au niveau d'une cellule ? Combien de virus seront infectieux, par exemple avec une capsidie intègre, parmi ceux qui sont produits au niveau cellulaire ? Cela pourrait servir de point de départ à l'estimation du ratio minimum entre les virus infectieux et non infectieux dans les selles de malades.

## **Question 9**

### **C.4 Survie aux traitements, survie dans le milieu extérieur, dilution**

En dépit des incertitudes existant sur le devenir des virus dans l'environnement et dans la chaîne de production d'eau ou d'aliments, il ne faut pas considérer que les mesures prises pour préserver l'hygiène des denrées ne soient pas sans efficacité sur les virus. Bien au contraire, la sensibilité des professionnels à ce danger est bien réelle. Néanmoins, il reste que l'appréciation de l'efficacité des traitements ou des processus de transformation sur les virus est capitale afin d'apprécier le danger que représente une contamination virale. Non seulement il est nécessaire d'acquérir des informations sur le devenir du pouvoir infectieux, mais également de connaître celui du génome viral cible des outils modernes de détection et de quantification des particules virales. La rapport entre virus infectieux et particules virales détectables n'est pas constant comme nous l'avons supposé dans l'exemple sur l'eau. Il évolue dans le temps et cette dynamique d'inactivation des caractéristiques des virus devrait être connue ou du moins être mieux estimée pour les couples denrée/pathogène. Le recours à des virus modèles comme les phages ARN F-spécifiques (décrits dans les Question 3 et Question 4) simplifie l'approche méthodologique et la rend accessible à un plus grand nombre de laboratoires publics mais surtout privés, afin que les processus agroalimentaires soient caractérisés.

### **C.5 Détermination de la consommation**

L'amélioration des connaissances sur la consommation a été abordée largement dans la Question 8.

### **C.6 Meilleure détermination des effets sanitaires attribuables aux aliments**

En France, la part des gastroentérites ou des hépatites A associées à la consommation d'eau et des aliments n'est pas encore très précisément estimée (cf. Rapport de l'Institut de Veille Sanitaire, 2003 et Question 8). Cette valeur est néanmoins capitale pour les gestionnaires du risque afin d'apprécier le contexte dans lequel les objectifs de santé sont définis et de préciser si le rôle de l'alimentation est suffisant pour y trouver prioritairement un volant efficace de réduction du nombre de malades par an. La variabilité des conséquences sanitaires dues aux infections virales, en fonction des populations, des classes d'âges, et d'autres facteurs susceptibles de sensibiliser un individu aux infections virales et à l'expression d'effets néfastes n'est bien souvent pas appréhendée alors qu'elle a une incidence forte sur les AQR et sur le coût effectif de ces maladies pour les

populations (cf. Question 8). Les récents résultats sur les norovirus et le rôle des hydrates de carbone du système ABO comme potentiels récepteurs viraux montrent leur intérêt aussi en terme d'identification de population sensible. Toutefois, la variabilité tant des virus à infecter un individu qu'à le rendre malade ou la variabilité de la susceptibilité des consommateurs aux virus nécessiteront encore de longues années d'étude. L'obligation de la déclaration des toxi-infections alimentaires et des cas d'hépatites A est sans aucun doute un moyen d'atteindre également cet objectif. Cependant, la mesure d'un effet sanitaire doit aussi tenir compte de l'amplification des phénomènes épidémiques directement liés à la consommation d'aliments contaminés, par les transmissions secondaires soit directement par manuportage, soit par l'incidence que peuvent avoir les malades sur la contamination de l'environnement et de là des ressources alimentaires. Les enquêtes épidémiologiques associées à la traçabilité moléculaire des virus entériques au sein des populations, dans les aliments et l'environnement devraient également permettre d'apprécier globalement l'écologie de ces agents infectieux. Enfin, le recueil d'information au cours de cas groupés serait particulièrement intéressant, une fois que l'agent ou les agents responsables sont identifiés, s'il permettait de distinguer les personnes asymptomatiques mais infectées (détection d'anticorps et/ou de virus dans les selles), et pour les cas symptomatiques, la fréquence et la durée des différents symptômes. Cette dernière information permettrait une meilleure estimation du coût sanitaire en DALY par type d'agent infectieux.

## Question 9

### C.7 Comment valider et améliorer le modèle existant

Le modèle présenté ci-dessus pourrait être amélioré par une meilleure évaluation de la caractérisation des dangers pour différents virus, comme notamment l'utilisation d'une relation dose-infection mieux connue pour les norovirus. Mais la principale limite du modèle est l'amélioration de l'évaluation du rapport génome issu de virus infectieux sur génome total détecté, en fonction d'un contexte précisé, ou élaboré de façon consensuelle entre experts de différents pays, soit par comparaison avec des cultures cellulaires, quand c'est possible, soit par analogie à d'autres virus, soit enfin en se référant à des indicateurs microbiens ou autres si la corrélation avec la présence de virus infectieux est estimée. La validation peut être obtenue si on compare les résultats du modèle aux données existantes. Cette validation peut aussi remettre en cause certaines hypothèses, et dans ce cas entraîner des modifications du modèle. Les données épidémiologiques comme l'investigation de TIAC, ou l'étude des résultats de systèmes sentinelles ou de maladies à déclaration obligatoire, les résultats d'études épidémiologiques ciblées peuvent être comparés aux résultats d'AQR, plus ou moins directement si le recueil d'information comprend des éléments sur la consommation des aliments incriminés et leur contamination.

### Conclusion

Apprécier l'état sanitaire d'une production en agroalimentaire est étroitement lié aux objectifs de santé publique que visent les pouvoirs publics ou les professionnels eux-mêmes, et aux capacités de ceux-ci à mettre en place des moyens de contrôle ou de maîtrise de la contamination virale afin d'améliorer cette situation. La définition d'un risque acceptable puis d'un objectif de sécurité alimentaire pour un aliment par les gestionnaires du risque permet de définir des fréquences de contaminations et de concentrations maximales limites, si l'approche AQR est valide, puis d'évaluer l'efficacité de différentes stratégies d'échantillonnage. Des considérations pratiques doivent aussi être prises en compte, comme la capacité analytique des laboratoires, les outils d'analyse disponibles, les ressources humaines mobilisables et les moyens financiers. L'exemple de l'eau, pris en compte dans cette étude, montre l'intérêt de mettre en place des études visant à mieux évaluer l'exposition des consommateurs d'une part, de comparer des stratégies avec ou sans contrôle virologique d'autre part, avant de mettre en place un contrôle virologique systématique sur un aliment ou à un stade de production de celui-ci, avec une stratégie d'échantillonnage *ad hoc*. Mais la mise en place de tels plans de surveillance ne se mesure plus en décennies. Vraisemblablement quelques années encore seront nécessaires pour compléter les lacunes dans les connaissances qui rendront plus précises l'appréciation quantitative d'un risque viral par l'alimentation. Ces données pourraient drastiquement changer les stratégies possibles d'échantillonnage et permettre d'identifier précisément les moyens adéquats à mettre en place. Le nombre de laboratoires français et européens engagés dans cette voie est aussi le gage de satisfaire rapidement les attentes des consommateurs, des industriels et des pouvoirs publics dans ce domaine.

## Références bibliographiques

**Beliaeff, B. & Cochard, M.L. 1995.** Applying geostatistics to identification of spatial patterns of fecal contamination in a mussel farming area (havre de la Vanlée, France). *Wat. Res.* 29 (6), 1541-1548.

**Caballero, S., Abad, F.X., Loisy, F., Le Guyader, F.S., Cohen, J., Pinto, R.M. & Bosch, A. 2004.** Rotavirus virus-like particles as surrogates in environmental persistence and inactivation studies. *Appl Environ Microbiol* 70 (7), 3904-3909.

**Canivet, N. 2005.** Application de la démarche AQR aux paramètres microbiologiques de l'eau de distribution publique. Rapport AFSSA-ENGREF-ISAA. 157 p p.

**Cheng, P.K., Wong, D.K., Chung, T.W. & Lim, W.W. 2005.** Norovirus contamination found in oysters worldwide. *J Med Virol* 76 (4), 593-597.

**Chironna, M., Germinario, C., De Medici, D., Fiore, A., Di Pasquale, S., Quarto, M. & Barbuti, S. 2002.** Detection of hepatitis A virus in mussels from different sources marketed in Puglia region (South Italy). *Int J Food Microbiol* 75 (1-2), 11-18.

**Codex Alimentarius 2003.** Projet de directive internationale sur l'échantillonnage. FAO-OMS-CODEX. 69 p.

**De Swarte, C. & Donker, R.A. 2005.** Towards an FSO/ALOP based food safety policy. *Food control* (16), 825-830.

**Fewtrell, L. & Bartram, J. 2001.** *Water quality : guidelines, standards and health. assessment of risk and risk management for water related infectious disease.* London, IWA Publishing. 424 p.

**Gassilloud, B., Schwartzbrod, L. & Gantzer, C. 2003.** Presence of viral genomes in mineral water: a sufficient condition to assume infectious risk? *Appl Environ Microbiol* 69 (7), 3965-3969.

**Gelman, A., Carlin, J., B., Stern, H., S. & Rubin, D., B. 2004.** *Bayesian data analysis*, Chapman and Hall/CRC. 668 p.

**Glass, R.I., Noel, J., Ando, T., Fankhauser, R., Belliot, G., Mounts, A., Parashar, U.D., Bresee, J.S. & Monroe, S.S. 2000.** The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis* 181 Suppl 2, S254-261.

**Gorris, L.M. 2004.** Food safety objective : an integral part of food chain management. *Food control* (16), 801-809.

**Haas, C., N., Rose, J., B. & Gerba, C., P. 1999.** *Quantitative microbial risk assessment*, John Wiley and Sons, Inc. 449 p.

**Haas, C.N. 2002.** Conditional dose-response relationships for microorganisms: development and application. *Risk Anal* 22 (3), 455-463.

**Havelaar, A.H., De Hollander, A.E., Teunis, P.F., Evers, E.G., Van Kranen, H.J., Versteegh, J.F., Van Koten, J.E. & Slob, W. 2000.** Balancing the risks and benefits of drinking water disinfection: disability adjusted life-years on the scale. *Environ Health Perspect* 108 (4), 315-321.

**Havelaar, A.H. & Melse, J.M. 2003.** Quantifying public health risk in the WHO Guidelines for Drinking-Water Quality : a burden of disease approach. RIVM. 49 p.

**Havelaar, A.H., Nauta, M.J. & Jansen, J.T. 2004.** Fine-tuning Food Safety Objectives and risk assessment. *Int J Food Microbiol* 93 (1), 11-29.

**InVS 2004.** Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France. 192 p.

**Lamothe, G.T., Putallaz, T., Joosten, H. & Marugg, J.D. 2003.** Reverse transcription-PCR analysis of bottled and natural mineral waters for the presence of noroviruses. *Appl Environ Microbiol* 69 (11), 6541-6549.

**Laverick, M.A., Wyn-Jones, A.P. & Carter, M.J. 2004.** Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Lett Appl Microbiol* 39 (2), 127-136.

**Le Guyader, F., Haugarreau, L., Miossec, L., Dubois, E. & Pommepuy, M. 2000.** Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Appl Environ Microbiol* 66 (8), 3241-3248.

**Lindesmith, L., Moe, C., Marionneau, S., Ruvoen, N., Jiang, X., Lindblad, L., Stewart, P., LePendou, J. & Baric, R. 2003.** Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med* 9 (5), 548-553.

**Lodder, W.J., Vinje, J., van De Heide, R., de Roda Husman, A.M., Leenen, E.J. & Koopmans, M.P. 1999.** Molecular detection of Norwalk-like caliciviruses in sewage. *Appl Environ Microbiol* 65 (12), 5624-5627.

### Question 9

## Question 9

- Lodder, W.J. & de Roda Husman, A.M. 2005.** Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in The Netherlands. *Appl Environ Microbiol* 71 (3), 1453-1461.
- Loisy, F., Atmar, R.L., Cohen, J., Bosch, A. & Le Guyader, F.S. 2004.** Rotavirus VLP2/6: a new tool for tracking rotavirus in the marine environment. *Res Microbiol* 155 (7), 575-578.
- Loisy, F., Atmar, R.L., Guillon, P., Le Cann, P., Pommepuy, M. & Le Guyader, F.S. 2005.** Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *J Virol Methods* 123 (1), 1-7.
- Macler, B.A. & Regli, S. 1993.** Use of microbial risk assessment in setting US drinking water standards. *Int J Food Microbiol* 18 (4), 245-256.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M. & Tauxe, R.V. 1999.** Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5 (5), 607-625.
- Monpoeho, S., Maul, A., Bonnin, C., Patria, L., Ranarijaona, S., Billaudel, S. & Ferre, V. 2004.** Clearance of human-pathogenic viruses from sludge: study of four stabilization processes by real-time reverse transcription-PCR and cell culture. *Appl Environ Microbiol* 70 (9), 5434-5440.
- Pouillot, R., Beaudeau, P., Roze, S. & Derouin, F. 2002.** Évaluation quantitative du risque sanitaire lié à la présence de *Cryptosporidium* sp dans l'eau distribuée. AFSSA. 57 p.
- Pouillot, R., Beaudeau, P., Denis, J.B. & Derouin, F. 2004.** A quantitative risk assessment of waterborne cryptosporidiosis in France using second-order Monte Carlo simulation. *Risk Anal* 24 (1), 1-17.
- Regli, S., Rose, J.B., Haas, C.N. & Gerba, C.P. 1991.** Modeling the risk from *Giardia* and viruses in drinking water. *Journal of the American Water*.
- Rockx, B., De Wit, M., Vennema, H., Vinje, J., De Bruin, E., Van Duynhoven, Y. & Koopmans, M. 2002.** Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis* 35 (3), 246-253.
- Sanaa, M. 2005.** Dose response models : some mathematical and statistical concepts. 4th international microbial risk assessment and mitigation workshop. FAO -Rome-italy.
- Sanaa, M., Cerf, O., Mohammed, H.O. & Nunes, T. 2005.** microbial risk assessment. 4th international microbial risk assessment and mitigation workshop. Rome, Italy.
- Skraber, S., Italiaander, R., Lodder, W. & de Roda Husman, A.M. 2005.** Noroviruses in archival samples. *Emerg Infect Dis* 11 (3), 489-491.
- Stringer, M. 2005.** Food safety objectives-role in microbiological food safety management. *Food control* (16), 775-794.
- Tan, M. & Jiang, X. 2005.** Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle. *Trends Microbiol* 13 (6), 285-293.
- Teunis, P.F. & Havelaar, A.H. 2000.** The Beta Poisson dose-response model is not a single-hit model. *Risk Anal* 20 (4), 513-520.
- Van den Berg, H., Lodder, W., van der Poel, W., Vennema, H. & de Roda Husman, A.M. 2005.** Genetic diversity of noroviruses in raw and treated sewage water. *Res Microbiol* 156 (4), 532-540.
- Van Schothorst, M.V. 2005.** A proposed framework for the use of FSO. *Food control* 16, 811-816.
- Vose, D. 2000.** *Risk analysis : a quantitative guide*. New York, John Wiley and sons. 418 p.
- Vose, D.J. 1998.** The application of quantitative risk assessment to microbial food safety. *Journal of Food Protection* 61 (5), 640-648.
- Walls, I. & Buchanan, R.L. 2005.** Use of food safety objectives as a tool for reducing foodborne listeriosis. *Food control* (16), 795-799.
- WHO 2001.** Guidelines, Standards, and Health :assessment of risk and risk management for water-related infectious disease. OMS-IWA. 416 p.
- WHO 2004.** *Guidelines for drinking water quality*. Geneva. 515 p.
- Zwietering, M. 2004.** Practical considerations on food safety objectives. *Food control* 16, 817-823.

## Conclusions : points clés des recommandations et axes de recherche

---

Ce rapport avait pour objectif principal d'analyser et d'évaluer les risques pour la santé publique liés à la présence de virus entériques dans les aliments et les eaux de distribution. Il a permis d'actualiser les données scientifiques et réglementaires sur les virus impliqués et les risques de contamination des denrées alimentaires. Il a aussi permis d'analyser les situations nouvelles qui sont pour partie les conséquences du développement de nouvelles technologies, notamment des méthodes de détection virale par biologie moléculaire.

### Points clés des recommandations

#### Virus d'intérêt

Les virus entériques analysés dans ce rapport peuvent être transmis à l'homme par les denrées alimentaires et les eaux. Cependant, le risque n'est pas identique pour tous ces virus. À l'heure actuelle, les risques sanitaires les plus importants sont liés à la consommation d'aliments ou d'eaux contaminés par les norovirus ou le virus de l'hépatite A responsables respectivement de gastroentérites et d'hépatites aiguës. Ces virus très résistants sont largement excrétés dans les selles et contaminent l'environnement. Ces virus n'étant pas ou difficilement cultivables, leur détection et leur quantification dans les selles, les aliments ou l'eau reposent essentiellement sur des méthodes de biologie moléculaire (RT-PCR classiques ou en temps réel).

Les rotavirus posent également un problème de santé publique. Mais ce problème est surtout lié à l'importance des épidémies hivernales récurrentes qui surviennent chez les nourrissons avec le risque de déshydratation pouvant conduire à une hospitalisation.

Quant aux autres virus, ils représentent en France un risque sanitaire moindre voire, pour certains virus, minime ou encore à démontrer.

#### Méthodes d'analyses

Les techniques d'amplification génique (RT-PCR ou PCR) sont les plus adaptées à la détection des virus dans les eaux et les aliments. Le développement des protocoles quantitatifs pour tous les virus, la validation et la standardisation des méthodes seront des arguments majeurs en faveur de l'utilisation des techniques moléculaires dans les années à venir.

Cependant, la constatation d'un génome de virus ne permet pas de témoigner de son caractère infectieux, critère majeur pour les gestionnaires du risque. Dans ce cadre, le groupe de travail a élaboré un logigramme d'interprétation d'un résultat positif, outil pratique et concret, dont il recommande l'utilisation par les gestionnaires du risque. À l'inverse, dans un échantillon considéré, l'absence de génome viral est relativement informative puisque dans les conditions d'assurance qualité adaptées, elle est synonyme de l'absence de virus infectieux.

La recherche de virus par les techniques de biologie moléculaire, en association avec d'autres indicateurs (bactériens ou phagiques) ou des données environnementales pourrait améliorer l'appréciation des risques sanitaires liés aux virus pathogènes dans les denrées alimentaires et l'eau. Néanmoins, il serait utile d'approfondir les recherches sur les indicateurs afin d'identifier, pour chaque type de matrice, le ou les indicateur(s) qui serai(en)t les plus judicieux.

#### Denrées alimentaires

Hormis les eaux de distribution, les principaux aliments sources de contamination virale sont les coquillages, et les produits végétaux consommés crus.

Une meilleure maîtrise du danger viral dans les industries agroalimentaires passe par la mise en place d'un plan HACCP qui sera d'autant plus pertinent que les données utilisées seront robustes et représentatives de la réalité de terrain (prévalence sur les matières premières, efficacité des technologies, interactions avec les constituants de l'aliment, survie dans l'environnement en contact direct avec l'aliment...).

Le champ d'investigation est donc immense. Aussi, il apparaît nécessaire de générer des données fiables pour aider les professionnels de l'agroalimentaire à prévenir le risque et à réagir le plus efficacement possible en cas d'alerte sanitaire (choix des matières premières, adaptation de la technologie, optimisation du plan de nettoyage-désinfection...). Dans ce cadre, les bactériophages sont aujourd'hui des modèles viraux simples à mesurer et le devenir de leur pouvoir infectieux peut être représentatif dans certains cas des caractéristiques générales des virus entériques.

### **Eaux destinées à la consommation humaine**

Des progrès en matière de sécurité sanitaire de la production et de la distribution d'eau destinée à la consommation humaine peuvent être assurés par la réalisation des mesures citées ci dessous :

- l'amélioration de la connaissance épidémiologique. Pour cela, les projets (i) étude écologique temporelle multicentrique « Gastroentérites et turbidité de l'eau distribuée » (ii) amélioration des investigations d'épidémies et d'accidents conduits par l'Institut de veille sanitaire (InVS) et les Cellules Inter-régionales d'épidémiologie (CIRE) doivent améliorer le recensement et la gestion des risques endémiques et épidémiques d'origine hydrique ;
- une meilleure connaissance de la qualité de la ressource, et l'amélioration de sa protection :
  - au vu du manque d'information, le groupe recommande la réalisation d'études spécifiques permettant d'obtenir un aperçu de la situation française et en tout état de cause, en amont de l'exploitation de nouvelles ressources en eau potable. Ceci ayant pour but d'évaluer la fréquence et le niveau de contamination par les virus, afin de pouvoir mettre en œuvre un traitement de potabilisation adapté, notamment pour des ressources mal protégées,
  - sachant que l'infiltration possible d'eaux parasites le long du cuvelage des puits ou du tubage des forages non dotés d'une cimentation annulaire est une cause fréquente de contamination des eaux captées (quel que soit le type de terrain), une attention particulière devrait être apportée à la cimentation des têtes d'ouvrage,
  - enfin, il semble nécessaire de prendre en compte l'influence des incidents météorologiques dans la pollution des ressources en eau et d'initier des actions préventives pour assurer leur protection ; ceci nécessite d'acquiescer, à une échelle locale, une connaissance fine des sources de virus situées en amont d'usages sensibles : alimentation en eau de consommation, zones de conchyliculture ou de pêche à pied, terrains potagers ;
- la mise en œuvre de filières de traitement des eaux adaptées à la qualité de l'eau brute, notamment des filières multibarrières garantissant un abattement suffisant, en priorité pour les ressources les plus vulnérables. Sachant qu'il n'existe pas actuellement de paramètre indicateur microbiologique et de méthodes normalisées permettant de tester *in situ* l'efficacité anti-virale des traitements, la mise en place d'une démarche qualité sur le fonctionnement de la filière reste un outil adapté pour la maîtrise de ce danger ;
- la mise en œuvre de moyens adaptés pour prévenir des retours d'eau dans les réseaux, et de règles de prévention lors des travaux de réparation et d'entretien sur les réseaux de distribution publique. L'installation de moyens de disconnexions répond à cet objectif ;
- la mise en œuvre d'une démarche globale d'évaluation et de gestion du risque de la ressource au robinet du consommateur.

### **Recommandations en matière d'hygiène destinées au consommateur pour la préparation des aliments**

L'impact d'une contamination initiale des aliments pouvant être aggravé de façon très importante par une transmission inter-humaine secondaire par voie alimentaire, il faut prendre en considération, pour limiter ce risque, les pratiques d'hygiène de base liées à la préparation des aliments. Le lavage des mains est l'une des mesures les plus importantes à adopter. Une sensibilisation de la population à ces règles d'hygiène serait souhaitable.

### **Investigations en situation d'alerte**

Le groupe de travail recommande la prise en compte du risque viral devant toute infection digestive collective d'origine alimentaire ou hydrique, prouvée ou suspectée. Ceci doit déboucher systématiquement sur la recherche des virus d'intérêt dans les selles ou autres liquides biologiques humains, et dans l'aliment ou l'eau suspecté(e). En effet, la détection du virus dans ces prélèvements peut être le seul critère permettant d'affirmer l'étiologie virale de l'épidémie.

La recherche du virus dans les aliments et l'eau doit être réalisée précocément ; pour cela, elle doit reposer sur un réseau de laboratoires experts pour l'analyse virologique dans les aliments et l'eau. Ce réseau doit être coordonné par un laboratoire de référence pour chaque matrice alimentaire d'importance ainsi que pour l'eau.

Une réponse rapide à une situation épidémique d'origine hydrique et alimentaire nécessite au niveau départemental un partenariat à compétences multiples. Cette équipe multidisciplinaire (pôle de compétence de sécurité alimentaire pour l'investigation des TIAC) ayant pour missions : (1) de déterminer un protocole adapté aux situations locales précisant les modalités de notification de contamination ou d'excès de cas ; (2) d'informer la population ; (3) de coordonner les investigations et les mesures de contrôle et de prévention ; (4) de fixer les conditions du retour à la normale et décider de la reprise de la distribution. Le groupe souligne que la transmission d'informations vers les populations concernées lors de tels épisodes est essentielle.

### **Analyse des publications dans le domaine de l'Appréciation Quantitative des Risques alimentaires liés aux virus**

Le bilan des études publiées dans ce domaine montre que les principaux aliments concernés par le risque viral et ayant fait l'objet d'études spécifiques sont l'eau, les coquillages, et les produits végétaux consommés crus. Les virus les plus souvent cités dans les publications sont les rotavirus, le VHA, le VHE et le poliovirus. Il est cependant clair que seule l'absence de relation dose-infection publiée pour les norovirus explique leur absence dans la liste.

Ces études présentent un certain nombre de faiblesses. Parmi celles-ci, l'estimation de la contamination virale pose le plus de difficultés. Les valeurs utilisées sont extrapolées à partir de données relatives à des virus cultivables (entérovirus) ou à des indicateurs bactériens pour des virus d'intérêt comme le VHA ou les rotavirus. Une autre faiblesse pénalisant l'approche est l'absence de relation dose-infection disponible pour des virus comme le VHA ou les norovirus. Enfin, la réceptivité des populations et la transmission secondaire inter-humaine ne sont pas prises en compte dans ces approches.

Ces études d'AQR sont conduites, le plus souvent, pour répondre aux questions relatives à l'efficacité d'un traitement à mettre en place pour prévenir le risque viral ou pour estimer le risque dans un objectif de hiérarchisation. Mais beaucoup d'autres questions relatives à l'évaluation ou à la gestion des risques peuvent être abordées par une démarche AQR, comme par exemple la pertinence et les modalités d'un contrôle.

Ainsi, les recommandations prioritaires sont les suivantes :

- définir les questions de gestion pouvant être abordées par une démarche d'AQR pour des couples matrice/virus ;
- améliorer les modèles d'AQR existants, en prenant en compte des approches séparant incertitude et variabilité afin de mieux identifier l'effet des lacunes de connaissances (les progrès en terme d'AQR dépendent aussi de la disponibilité des données ; cet aspect étant commenté dans la partie « axes de recherche et perspectives »).

### **Pré-requis à l'élaboration d'une stratégie d'échantillonnage d'eau et d'aliments pour évaluer une contamination virale, au regard d'une approche d'AQR**

Les pré-requis nécessaires à l'élaboration d'une stratégie d'échantillonnage adaptée pour élaborer un plan de contrôle des virus dans l'eau ou les aliments sont nombreux.

Parmi ceux-ci, la définition d'un objectif de santé, sous la forme d'un risque acceptable par virus puis pour un couple matrice/virus devrait être un préalable pour ensuite déterminer la concentration et la fréquence que l'échantillonnage doit être en mesure de détecter. Le risque acceptable peut être défini en termes de morbidité, mortalité ou de coût sanitaire exprimé en DALY. Le choix de l'indicateur aura des conséquences sur la hiérarchisation des risques viraux liés aux aliments. Ainsi, si on choisit le DALY, l'approche AQR montre que pour un même niveau de risque exprimé en DALY, il faudra alors distinguer les concentrations limites pour chaque virus d'intérêt.

De plus, il est difficile aujourd'hui d'estimer une concentration en virus infectieux à partir d'indicateurs ou de génomes. Par ailleurs, on ne dispose pas non plus de données de contaminations virales quantitatives et représentatives sur le VHA, les rotavirus ou les norovirus et d'indicateurs en regard dans l'eau et les aliments. Ces données sont un préalable à une stratégie d'échantillonnage visant à mieux évaluer l'exposition, faire le choix d'un indicateur ou d'une méthode d'analyse pertinente, puis à évaluer une stratégie d'échantillonnage visant à contrôler la contamination des aliments.

Vraisemblablement quelques années encore seront nécessaires pour compléter ces lacunes et préciser l'appréciation quantitative d'un risque viral par l'alimentation. Ces données pourraient drastiquement changer les stratégies possibles d'échantillonnage et permettre d'identifier précisément les moyens adéquats à mettre en place.

## Axes de recherche et perspectives

Les travaux du groupe ont mis en évidence des lacunes dans les connaissances qui ne permettent pas à l'heure actuelle de mener une véritable démarche d'appréciation quantitative du risque. Afin de générer des données, un certain nombre d'axes de recherche et de perspectives ont été identifiés. La dernière partie de ce rapport vise à identifier les pré-requis pour l'élaboration d'une stratégie d'échantillonnage dans l'eau et les aliments pour évaluer une contamination virale, par une approche AQR. Des propositions de thématiques de recherche sont donc détaillées en fin de la dernière question du rapport.

Il apparaît important de générer des données sur les thématiques suivantes :

### 1. Connaissance du danger

- **Amélioration des connaissances sur les relations dose-infection** : sensibilité et réceptivité des populations, comparaison de la virulence et de l'infectiosité entre des virus et des souches différentes. En effet, la relation dose-infection la plus utilisée est celle des rotavirus, qui est le plus souvent extrapolée aux autres virus, et à toutes les souches rencontrées.
- **Meilleure évaluation de la part de virus infectieux par rapport aux non infectieux.**
- **Étude du devenir de ce pouvoir infectieux en fonction des traitements** et des paramètres physico-chimiques de l'eau ou des aliments.
- **Évaluation du potentiel zoonotique des norovirus**, et surveillance particulière de la circulation des rotavirus chez les diverses espèces animales. Diverses données récentes concernant le VHE doivent également inciter à une grande vigilance et une surveillance accrue tant chez l'homme que chez les animaux.

### 2. Données épidémiologiques

- **Acquisition de données d'incidence** dans la population française concernant les infections liées aux virus d'intérêt.
- **Acquisition de données de surveillance** des souches virales en circulation au cours d'études épidémiologiques ad hoc.
- **Estimation de façon quantitative et de façon plus précise de la morbidité et de la mortalité** liées aux différents virus en vue d'une estimation du coût en DALY.
- **Amélioration des investigations épidémiologiques** en vue de recueillir davantage d'informations utilisables pour une AQR, et de valider ou infirmer les hypothèses retenues dans la modélisation.

### 3. Niveau de contamination des eaux et des aliments

- **Amélioration des connaissances sur les performances des tests** de détection des virus notamment par biologie moléculaire.
- **Étude du devenir des virus dans l'environnement**, prenant en compte les différents aspects suivants :
  - amélioration des connaissances sur l'excrétion virale des personnes symptomatiques et des porteurs asymptomatiques, de virus infectieux et de génomes, voire estimation de la variabilité de celle-ci ;
  - acquisition de données sur la contamination virale des boues, des eaux usées et des déchets (décharges, compostages) au niveau national.

Ces deux derniers points permettraient d'établir, éventuellement, des scénarios de contamination dans l'environnement.

- **Mise en place d'études visant à mieux connaître le niveau de contamination virale dans l'eau et les aliments**, et à rechercher des indicateurs pertinents s'il y a lieu : l'essentiel des données concernant les eaux de surface (y compris les eaux côtières) mais aussi des eaux souterraines vulnérables provient d'auteurs anglo-saxons (surtout Amérique du Nord) ; l'extrapolation à d'autres pays est parfois délicate et pourrait être source d'erreurs ; des études de la contamination des eaux en France seraient donc à promouvoir.

#### 4. Efficacité des traitements

Les virus entériques sont, d'une façon générale, très résistants et la dose infectieuse est faible. De fait, l'évaluation de l'efficacité des traitements est d'autant plus importante.

##### Pour les denrées alimentaires

- Amélioration des connaissances **sur l'efficacité des traitements**

Une réduction de 4 log du titre viral qualifie actuellement un traitement d'efficace. En pratique, il convient d'accumuler des données de prévalence pour adapter le niveau de réduction aux niveaux acceptables de protection des consommateurs :

- sur le plan technologique, le traitement thermique est le mieux renseigné au regard de son efficacité virucide. Cependant, les interactions avec la matrice (effet protecteur/effet synergique) sont peu connues et il convient de générer des données obtenues sur aliments avec des virus ciblés. Pour les autres technologies, les données sont peu nombreuses et à enrichir. Concernant les traitements appliqués aux coquillages et certains produits végétaux, des données doivent être générées ;

- sur le plan chimique, les données relatives aux principales molécules biocides sont peu nombreuses et sont à générer pour mieux quantifier leur impact en tant que désinfectant et en tant qu'auxiliaire technologique. Il est à noter que cette évaluation des molécules est prévue par la directive « biocides ».

##### Pour les eaux de distribution

- Amélioration des connaissances concernant **l'efficacité des traitements de potabilisation** sur les virus d'intérêt.
- Amélioration des connaissances concernant **l'intérêt des bactériophages** comme indicateurs d'efficacité de traitement.

#### 5. Données de consommation et préparation des aliments

- Amélioration des connaissances portant sur la **consommation des aliments et de l'eau** par les enfants en bas âge.
- Amélioration des connaissances portant sur les **modalités de préparation des aliments** pour les enfants en bas âge, notamment pour mieux estimer l'exposition des enfants en bas âge aux rotavirus.
- Amélioration des connaissances portant sur la **consommation de coquillages**, difficile à estimer en raison d'une forte variabilité spatiale et temporelle.
- Amélioration des **pratiques d'hygiène** notamment en cuisine, en vue d'éviter des transmissions secondaires inter-humaines.

#### 6. Perspectives

L'acquisition des connaissances complémentaires mentionnées ci-dessus devrait permettre d'affiner les hypothèses formulées dans la mise en œuvre de l'AQR présentée dans le rapport, et/ou de l'étendre à d'autres couples matrice/virus. La mise en œuvre de l'AQR pourrait alors utilement s'inscrire en appui au gestionnaire du risque.



## **Annexes I à VII**



**Annexe I : Saisine n° 2002-SA-0118 de la Direction générale de la santé  
du 23 avril 2002 relative à l'évaluation du risque sanitaire lié  
à la présence éventuelle de fragments de génome du virus  
Norwalk-like dans certaines eaux minérales, naturelles,  
européennes embouteillées**



MINISTRE DE L'EMPLOI  
ET DE LA SOLIDARITE

2002 - SA - 0118

REPUBLIQUE FRANCAISE

PARIS, le

23 AVR. 2002

DIRECTION GENERALE DE LA SANTE

Sous-direction de la gestion des risques des milieux  
Bureau des eaux et aliments  
DGS/SD7A - N° 589

Personne chargée du dossier :

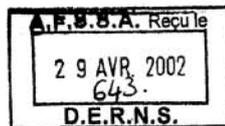
Anne NOVELLI

Téléphone : 01 40 56 48 86

LA MINISTRE DE L'EMPLOI  
ET DE LA SOLIDARITE

à

MONSIEUR LE DIRECTEUR GENERAL  
DE L'AGENCE FRANCAISE DE SECURITE  
SANITAIRE DES ALIMENTS  
23 Avenue du général de Gaulle  
BP 19  
94701 MAISONS ALFORT Cedex  
DERNS



- Objet :** Evaluation du risque sanitaire lié à la présence éventuelle de fragments de génome du virus Norwalk-like dans certaines eaux minérales naturelles embouteillées de marques européennes.
- N. Réf :** DGS/n° 020049.
- P.J. :**
- . Article paru dans le Parisien du 10 avril 2002.
  - . Article paru dans Nature du 8 avril 2002.
  - . Publication de Christian Beuret du Laboratoire Cantonal de la Nourriture de Soleure de 2002 dans Applied and Environmental Microbiology.
  - . Publication de Christian Beuret du Laboratoire Cantonal de la Nourriture de Soleure de 2000 dans Journal of Food Protection.

Le 10 avril dernier la DGS a été informée de la parution d'un article dans le Parisien du jour commentant un article paru, dans la revue Nature, du 8 avril 2002, sur les travaux de Christian Beuret (Laboratoire de contrôle alimentaire du canton de Soleure - Suisse), faisant état de la présence de fragments du génome de virus Norwalk-like (NLV) dans certaines eaux minérales naturelles embouteillées de marques européennes.

Ce constat pourrait laisser supposer que des matières fécales humaines auraient contaminé l'eau minérale naturelle embouteillée. En effet le NLV est considéré comme un témoin de contamination fécale, il serait à l'origine de 90% des gastro-entérites virales dans le monde.

Les travaux de C.Beuret peuvent se résumer comme suit :

La présence de fragments du génome de virus Norwalk-like a été mise en évidence dans 33% des échantillons de bouteilles d'eaux minérales naturelles des 11 parmi les 29 marques européennes testées (5 des 21 échantillons contaminés sont des bouteilles d'eaux minérales d'origine française). La technique utilisée (RT-PCR) ne permet pas de conclure sur l'état infectieux ou non du virus. Cette contamination est sporadique puisqu'elle n'est pas présente dans toutes les bouteilles d'un même lot. Il n'existe pas de lien entre la contamination et la saison. La contamination ne peut être corrélée avec les caractéristiques des bouteilles ou les propriétés chimiques des eaux minérales naturelles

DGS 20020419

8, avenue de Ségur - 75350 PARIS 07 SP - Tél. : 01 40 56 60 00 - Télécopie : 01 40 56 50 56

Annexe I

minéralisation, pH, présence CO<sub>2</sub>). Les fragments de génome sont présents après un an de stockage, ceci selon l'auteur laisse à penser que le virus serait protégé et serait infectieux. L'origine de la contamination (à la source, par le matériel d'emballage ou durant l'embouteillage) n'a pas pu être établie par l'étude. La présence de fragments du génome de virus Norwalk-like ne peut être corrélée à la présence d'autres témoins de contamination fécale (*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*).

Une étude multicentrique effectuée en 2000, intégrant 7 laboratoires européens dont le Laboratoire cantonal de Soleure, réalisée sous l'égide du Pr. Schwarzbrod, n'a pas révélé la présence de fragments de génome de virus Norwalk-like dans 10 eaux minérales naturelles différentes.

Un communiqué de la Fédération nationale de l'industrie des eaux embouteillées du 9 avril 2002 et un courrier de la Chambre Syndicale des Eaux Minérales du 24 novembre 2000 remettent en cause la signification des résultats des travaux de C. Beuret.

Le département santé environnement de l'InVS (M. Beaudeau), contacté par téléphone le 12 avril 2002, a précisé (sous réserve d'une revue bibliographique détaillée), qu'à sa connaissance, il n'existe pas de données épidémiologiques permettant d'associer des cas de gastro-entérites à la consommation d'eaux minérales naturelles embouteillées. Néanmoins il a évoqué une étude sur des personnes immunodéprimées présentant des troubles digestifs consommant des eaux minérales naturelles embouteillées sans relation causale entre les deux.

En conséquence, je souhaite recueillir l'avis de l'Agence, dans les meilleurs délais, quant à l'existence d'un risque sanitaire éventuel pour les consommateurs du à la présence éventuelle de fragments de génome du virus Norwalk-like dans des eaux minérales naturelles embouteillées.

**Copies :** - InVS

Pour la ministre et par délégation,  
par empêchement du directeur général de la santé  
L'adjoint au directeur général  
de la santé,

Pascal PENAUD

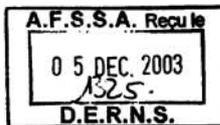
# Annexe II : Saisine n°2003-SA-0379 de la Direction générale de la santé concernant le besoin d'apporter des précisions concernant le volet analytique de la recherche des virus dans l'eau



MINISTRE DE LA SANTÉ, DE LA FAMILLE  
ET DES PERSONNES HANDICAPÉES

DIRECTION GÉNÉRALE DE LA SANTÉ  
Sous-direction de la gestion des risques des milieux  
Bureau des eaux et aliments  
DGS/SD7A - N° 1357

Personnes chargées du dossier : A. NOVELLI  
téléphone : 01 40 56 45 99  
télécopie : 01 40 56 50 56



Le Ministre de la santé, de la famille et  
des personnes handicapées

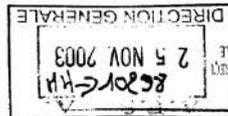
à

Monsieur le Directeur général de  
l'Agence française de sécurité sanitaire  
des aliments  
27-31 Avenue du général Leclerc  
BP 19  
94701 MAISONS ALFORT Cedex  
DERNS/UERE

→ [redacted] : microbio, à suivre.  
↳ Laqap: pour élément de  
réponse au dernier  
paragraphe -

ME 3 déc.

Paris, le 24 NOV. 2003



ME - 26053

- Objet :** Projet de protocole relatif à la recherche de virus dans le réseau d'eau de distribution publique.
- Réf :** Votre courrier du 14 octobre 2003.  
Saisine du 23 avril 2002 (n° DGS : 020049, n° AFSSA : 2002-SA-0118).
- P.J. :** Projet de protocole d'analyses relatif à la recherche de virus dans le réseau d'eau de distribution publique.

En réponse à votre courrier du 14 octobre 2003, je vous confirme que le protocole d'analyses cité ci-dessus transmis par courriel le 26 septembre 2003 correspondait à une demande initialement informelle, pour conforter une proposition élaborée par la DGS.

Le protocole a pour objectif de diffuser des lignes directrices pour la réalisation d'inventaires des niveaux de contamination par des particules virales des eaux destinées à la consommation humaine dans des réseaux de distribution publics, notamment par des virus pathogènes responsables des cas de gastro-entérites et non détectables en culture de cellules. Les éléments recueillis doivent participer à l'enrichissement des connaissances de l'état des milieux nécessaire à l'expertise. Les ouvrages et réseaux d'eau sélectionnés sont préalablement choisis par les services locaux pour leur forte vulnérabilité aux pollutions.

La transmission de ce protocole peut cependant s'inscrire dans le cadre de la saisine du ministère chargé de la santé du 29 avril 2002 mentionnée en référence concernant « l'évaluation du risque sanitaire lié à la présence éventuelle de fragments de génome du virus Norwalk-like dans certaines eaux minérales naturelles embouteillées de marques européennes ». Vous m'avez informé,

AFSSA / saisine / DGS020085-arrêté-analyses.doc

8, avenue de Ségur - 75350 Paris 07 SP - Téléphone : 01 40 56 60 00

Annexe II

qu'à la suite de cette saisine l'AFSSA a proposé de créer un groupe de travail « Virus dans les denrées alimentaires et dans l'eau ».

Le présent échange m'offre l'occasion de souligner la nécessité :

- pour le volet analytique de la recherche de virus dans l'eau : de préciser et d'apporter un consensus d'experts notamment sur les points suivants :
  - les volumes d'échantillons d'eau à analyser (100 ou 1000 litres),
  - les prescriptions en matière de prélèvement (prélèvement suivant la norme NF XP T 90-451 ou selon d'autres modalités plus précises : vérification de la qualité de la laine de verre...).
- pour l'intérêt explicatif de la présence éventuelle de virus dans l'eau ou de la vulnérabilité des ressources et compte tenu des limites des budgets disponibles d'analyses : de prioriser les types d'analyses supplémentaires présentant un intérêt concomitant d'information qu'il serait opportun de réaliser en sus de celle des virus, par exemple :
  - recherche de Cryptosporidium et Giardia suivant la méthode NF T 90-455,
  - recherche des enterovirus suivant la méthode XP T90-451,
  - recherche de bactériophages ARN F spécifiques et/ou coliphages somatiques suivant la méthode NF EN ISO 10705
  - etc...

Par ailleurs, je vous demande au titre de votre mission générale, d'identifier et de préciser à l'échelon national, les laboratoires disposant d'une compétence analytique dans le domaine de l'analyse virologique des eaux (échantillonnage, recherche dans la matrice eau, méthodes d'analyses utilisées (PCR), virus recherchés, typage...).

Pour le ministre et par délégation,  
Par empêchement du directeur général de la santé

Catherine M...  
Adjointe au sous-directeur  
de la gestion des risques des milieux

**Copies :**  
DDASS 54  
DDASS 76  
InVS

# Annexe III : Décision n° 2003-465 du 12 novembre 2003 relative à la création du groupe de travail « virus transmissibles à l'homme par voie orale »

## AGENCE FRANÇAISE DE SECURITÉ SANITAIRE DES ALIMENTS

### **Décision n°2003-465 relative au groupe de travail « Virus transmissibles à l'homme par voie orale »**

Le directeur général de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments,

Vu le code de la santé publique, et notamment ses articles L.1323-4 et R.1323-22 ;

Vu l'arrêté du 23 août 2000 relatif aux comités d'experts spécialisés placés auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu l'arrêté du 3 septembre 2003 portant nomination aux comités d'experts spécialisés placés auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu la décision du 17 juillet 2003 établissant une liste d'experts auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu le règlement intérieur de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments.

#### **DECIDE :**

**Article premier.** Il est créé sur proposition des comités d'experts spécialisés « Microbiologie » et « Eaux » lors des réunions du 22 avril 2003 et du 6 mai 2003 un groupe de travail dénommé « Virus transmissibles à l'homme par voie orale », chargé de l'évaluation des risques pour la santé publique liés à la présence de virus transmissibles à l'homme dans les aliments et les eaux destinées à la boisson.

**Article 2.** Le groupe de travail mentionné à l'article premier est composé des membres suivants :

- Membres du comité d'experts spécialisé « Microbiologie » :
  - M. Eric Dubois
  - Mme Virginie Ferré-Aubineau
- Membres du comité d'experts spécialisé « Eaux » :
  - Mme Sylvie Dubrou
  - M. Philippe Hartemann
  - M. Philippe Vilaginès
- Autres experts :

M. Jean Cohen	(INRA-CNRS - Jouy-en-Josas)
Mme Henriette De Valk	(Institut de Veille Sanitaire - Saint-Maurice)
Mme Elisabeth Dussaix	(CHU Paul Brousse - Villejuif)
M. Christophe Gantzer	(Faculté de Pharmacie - Nancy)
M. Henri Laveran	(Faculté de médecine et pharmacie- Clermont-Ferrand)
Mme Odile Legeay	(Institut Pasteur - Lille)
Mme Françoise Le Guyader	(Ifremer - Nantes)
M. Bruno Lina	(Hôpital Edouard Herriot - Lyon)
M. Pierre Pothier	(CHU - Dijon)

**Article 3.** M. Pothier est nommé président du groupe de travail mentionné à l'article premier.

**Article 4.** Les conclusions du groupe de travail seront présentées aux comités d'experts spécialisés « Microbiologie » et « Eaux » dans un délai de 12 mois.

**Article 5.** Le secrétariat du groupe de travail mentionné à l'article premier est assuré par la Direction de l'évaluation des risques nutritionnels et sanitaires.

Fait à Maisons-Alfort, le **12 NOV. 2003**

Le Directeur général de l'Agence française de  
sécurité sanitaire des aliments

  
**Martin HIRSCH**

# Annexe IV : Décision n°2004-150 du 15 avril 2004 relative au groupe de travail « virus transmissibles à l'homme par voie orale »

## AGENCE FRANÇAISE DE SECURITÉ SANITAIRE DES ALIMENTS

### Décision n°2004-150 relative au groupe de travail « Virus transmissibles à l'homme par voie orale »

Le directeur général de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments,

Vu le code de la santé publique, et notamment ses articles L.1323-4 et R.1323-22 ;

Vu l'arrêté du 23 août 2000 relatif aux comités d'experts spécialisés placés auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu l'arrêté du 4 juillet 2001 portant nomination au comité d'experts spécialisé « encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles » placé auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu la décision du 17 juillet 2003 établissant une liste d'experts auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu l'arrêté du 3 septembre 2003 portant nomination aux comités d'experts spécialisés placés auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu l'arrêté du 15 octobre 2003 modifiant l'arrêté du 3 septembre 2003 portant nomination aux comités d'experts spécialisés placés auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu le règlement intérieur de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments,

#### DECIDE :

**Article premier.** La composition du groupe de travail « Virus transmissibles à l'homme par voie orale » institué par la décision n° 2003-465 du 12 novembre 2003 est modifiée en ajoutant parmi ses membres :

M. Stéphane Bertagnoli (ENVT - Toulouse)

M. Bernard Picoche (ADRIA - Quimper)

Fait à Maisons-Alfort, le

15 AVR. 2004

Le Directeur général de l'Agence française de  
sécurité sanitaire des aliments



Martin HIRSCH



# Annexe V : Décision n°2005-06-324 du 26 juillet 2005 relative au groupe de travail « virus transmissibles à l'homme par voie orale »

## AGENCE FRANÇAISE DE SECURITÉ SANITAIRE DES ALIMENTS

### Décision n°2005-06-324 relative au groupe de travail « Virus transmissibles à l'homme par voie orale »

Le directeur général de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments,

Vu le code de la santé publique, et notamment ses articles L.1323-4 et R.1323-22 ;

Vu l'arrêté du 23 août 2000 relatif aux comités d'experts spécialisés placés auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu la décision du 17 juillet 2003 établissant une liste d'experts auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu l'arrêté du 3 septembre 2003 portant nomination aux comités d'experts spécialisés placés auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu l'arrêté du 15 octobre 2003 modifiant l'arrêté du 3 septembre 2003 portant nomination aux comités d'experts spécialisés placés auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu l'arrêté du 18 août 2004 portant nomination aux comités d'experts spécialisés placés auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu le règlement intérieur de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments,

#### DECIDE :

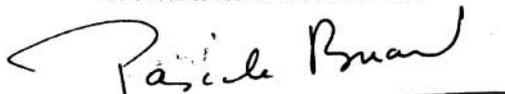
**Article premier.** La composition du groupe de travail « Virus transmissibles à l'homme par voie orale » institué par la décision n° 2003-465 du 12 novembre 2003, et modifiée une première fois par la décision n° 2004-150 du 15 avril 2004, est modifiée en ajoutant parmi ses membres :

- M. Carré Jean (ENSP - Rennes)
- Mme Déportes Isabelle (ADEME - Angers)
- M. Antoine Montiel (SAGEP - Paris)

**Article second.** Le mandat du groupe de travail « Virus transmissibles à l'homme par voie orale » institué par la décision n° 2003-465 du 12 novembre 2003 est prolongé jusqu'au 31 décembre 2005.

Fait à Maisons-Alfort, le 26 JUIL. 2005

La Directrice générale de l'Agence française  
de sécurité sanitaire des aliments



Pascale BRIAND



## Annexe VI : Questionnaire de sensibilisation à la thématique virale adressé aux professionnels de l'industrie agroalimentaire en janvier-juin 2005



DIRECTION DE  
L'EVALUATION DES  
RISQUES  
NUTRITIONNELS ET  
SANITAIRES

Objet : **demande d'informations relatives au  
groupe de travail "virus  
transmissibles à l'homme par voie  
orale"**

Maisons-Alfort, le 17 JAN. 2005

Madame, Monsieur,

Unité : UERB/URE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments s'est auto-saisie le 12 novembre 2003 sur la thématique relative aux « virus transmissibles à l'homme par voie orale ». Cette auto-saisine s'est concrétisée par la création d'un groupe de travail chargé de l'évaluation des risques pour la santé publique liés à la présence de virus transmissibles à l'homme dans les aliments et les eaux destinées à la boisson.

Dossier suivi par :  
Coralie Bultel  
Laurent Grimault

Cette réflexion fait suite à plusieurs considérations :

Ligne directe :  
01 49 77 38 33  
01 49 77 38 19

- La réception d'une saisine de l'Afssa par la DGS, le 23 avril 2002, dans le cadre du Comité d'experts spécialisé « Eaux », relative à « l'évaluation du risque sanitaire lié à la présence éventuelle de fragments de génome du virus Norwalk-like dans certaines eaux minérales, naturelles, européennes embouteillées » ;
- La réflexion sur l'inclusion des virus dans la réglementation, dans le cadre de la révision des critères microbiologiques en cours (réflexions nationale et communautaire) ;
- Des alertes sanitaires concernant la présence de calicivirus dans les framboises importées ayant eu lieu en 1998 et 2003
- Diverses sollicitations de professionnels et de particuliers, adressées à l'Afssa, sur cette thématique.

Fax direct :  
01 49 77 38 57

E-mail :  
c.bultel@afssa.fr  
l.grimault@afssa.fr

N. Réf. :

La réflexion du groupe s'articule ainsi autour de plusieurs questions structurantes, parmi lesquelles une concerne plus particulièrement les moyens mis en œuvre dans l'industrie agroalimentaire pour maîtriser le danger viral.

Afin d'enrichir les travaux du groupe, et d'établir ainsi des recommandations pertinentes, il nous serait utile de disposer des modalités de prise en compte de la problématique virale de vos adhérents dans leurs domaines d'activités respectifs : en ce sens, pouvez-vous nous indiquer :

- Si vos adhérents ont pris en compte les virus dans l'application de vos bonnes pratiques d'hygiène et de votre démarche HACCP et si oui quels virus ont été retenus ?
- Quels sont les moyens que vos adhérents ont mis en œuvre pour diminuer le risque viral ?

Vous remerciant vivement par avance pour la contribution que vous voudrez bien apporter à cette réflexion.

  
**Dr Muriel ELIASZEWICZ**  
Directrice de l'évaluation des risques  
nutritionnels et sanitaires

DERNS/Enr.18/Ind.D



## Annexe VII : Présentation des textes réglementaires du « Paquet hygiène »

---

### Les six règlements

- Règlement (CE) n° 178/2002 du Parlement européen et du Conseil du 28 janvier 2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l'Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires <sup>(49)</sup>.
- Règlement (CE) n° 852/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 relatif à l'hygiène des denrées alimentaires.
- Règlement (CE) n° 853/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale.
- Règlement (CE) n° 854/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine.
- Règlement (CE) n° 882/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 relatif aux contrôles officiels effectués pour s'assurer de la conformité avec la législation sur les aliments pour animaux et les denrées alimentaires et avec les dispositions relatives à la santé animale et au bien-être des animaux.
- Règlement (CE) n° 183/2005 du Parlement européen et du Conseil du 12 janvier 2005 établissant des exigences en matière d'hygiène des aliments pour animaux Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE.

Les règlements (CE) n° 178/2002, 852/2004 et 853/2004 font l'objet de documents d'interprétation afin de clarifier certains points.

### Les quatre règlements d'application

- RÈGLEMENT (CE) No 2073/2005 DE LA COMMISSION du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires <sup>(50)</sup>.
- RÈGLEMENT (CE) No 2074/2005 DE LA COMMISSION du 5 décembre 2005 établissant les mesures d'application relatives à certains produits régis par le règlement (CE) no 853/2004 du Parlement européen et du Conseil et à l'organisation des contrôles officiels prévus par les règlements (CE) no 854/2004 du Parlement européen et du Conseil et (CE) no 882/2004 du Parlement européen et du Conseil, portant dérogation au règlement (CE) no 852/2004 du Parlement européen et du Conseil et modifiant les règlements (CE) no 853/2004 et (CE) no 854/2004 <sup>(51)</sup>.
- RÈGLEMENT (CE) No 2075/2005 DE LA COMMISSION du 5 décembre 2005 fixant les règles spécifiques applicables aux contrôles officiels concernant la présence de *Trichinella* dans les viandes <sup>(52)</sup>.
- RÈGLEMENT (CE) No 2076/2005 DE LA COMMISSION du 5 décembre 2005 portant dispositions d'application transitoires des règlements (CE) no 853/2004, (CE) no 854/2004 et (CE) no 882/2004 du Parlement européen et du Conseil et modifiant les règlements (CE) no 853/2004 et (CE) no 854/2004 <sup>(53)</sup>.

Ces textes viennent compléter et préciser la mise en œuvre pratique de certaines mesures du « Paquet hygiène ».

(49) [http://europa.eu.int/eur-lex/pri/fr/oj/dat/2002/l\\_031/l\\_03120020201fro0010024.pdf](http://europa.eu.int/eur-lex/pri/fr/oj/dat/2002/l_031/l_03120020201fro0010024.pdf)

(50) [http://europa.eu.int/eur-lex/lex/LexUriServ/site/fr/oj/2005/l\\_338/l\\_33820051222fro0010026.pdf](http://europa.eu.int/eur-lex/lex/LexUriServ/site/fr/oj/2005/l_338/l_33820051222fro0010026.pdf)

(51) [http://europa.eu.int/eur-lex/lex/LexUriServ/site/fr/oj/2005/l\\_338/l\\_33820051222fro0270059.pdf](http://europa.eu.int/eur-lex/lex/LexUriServ/site/fr/oj/2005/l_338/l_33820051222fro0270059.pdf)

(52) [http://europa.eu.int/eur-lex/lex/LexUriServ/site/fr/oj/2005/l\\_338/l\\_33820051222fro0600082.pdf](http://europa.eu.int/eur-lex/lex/LexUriServ/site/fr/oj/2005/l_338/l_33820051222fro0600082.pdf)

(53) [http://europa.eu.int/eur-lex/lex/LexUriServ/site/fr/oj/2005/l\\_338/l\\_33820051222fro0830088.pdf](http://europa.eu.int/eur-lex/lex/LexUriServ/site/fr/oj/2005/l_338/l_33820051222fro0830088.pdf)

## Les deux directives :

- Directive 2002/99/CE du Conseil du 16 décembre 2002 fixant les règles de police sanitaire régissant la production, la transformation, la distribution et l'introduction des produits d'origine animale destinés à la consommation humaine <sup>(54)</sup>.
- Directive 2004/41/CE du Parlement européen et du Conseil du 21 avril 2004 abrogeant certaines directives relatives à l'hygiène des denrées alimentaires et aux règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché de certains produits d'origine animale destinés à la consommation humaine, et modifiant les directives 89/662/CEE et 92/118/CEE du Conseil ainsi que la décision 95/408/CE du Conseil.

---

(54) [http://europa.eu.int/eur-lex/pri/fr/oj/dat/2003/l\\_018/l\\_01820030123f00110020.pdf](http://europa.eu.int/eur-lex/pri/fr/oj/dat/2003/l_018/l_01820030123f00110020.pdf)

## **Annexe VIII**

**Fiches détaillées concernant les différents virus d'intérêt transmissibles à l'homme par voie orale**



## Sommaire

---

Virus de l'hépatite A.....	347
Virus de l'hépatite E.....	361
Norovirus.....	371
Sapovirus.....	385
Rotavirus.....	391
Astrovirus.....	411
Adénovirus.....	417
Réovirus.....	423
Entérovirus.....	429
Parechovirus.....	439



## Plan type de chaque fiche

---

1. Agent infectieux
  - 1.1. Nom scientifique
  - 1.2. Acronyme
  - 1.3. Nom usuel
  - 1.4. Caractéristiques
  - 1.5. Maladie correspondante
2. Pouvoir pathogène
  - 2.1. Physiopathologie
  - 2.2. Dose infectieuse
  - 2.3. Mode de contamination
  - 2.4. Groupes à risque
  - 2.5. Période d'incubation
  - 2.6. Manifestations cliniques
3. Stratégies du diagnostic
  - 3.1. Diagnostic chez l'homme
  - 3.2. Diagnostic dans l'environnement et les aliments
4. Épidémiologie et systèmes de surveillance
  - 4.1. Systèmes de surveillance
  - 4.2. Statut épidémiologique et prévalence
5. Mode de dissémination
  - 5.1. Réservoir
  - 5.2. Zoonose
  - 5.3. Vecteurs
  - 5.4. Mode de contamination des aliments et de l'eau
  - 5.5. Surveillance des aliments
6. Survie de l'agent infectieux
  - 6.1. Sensibilité aux médicaments
  - 6.2. Sensibilité aux traitements de désinfection
  - 6.3. Survie dans l'environnement
7. Dangers spécifiques liés à la manipulation pour le personnel de laboratoire et modalité de prévention
  - 7.1. Infections acquises au laboratoire
  - 7.2. Sources et échantillons
  - 7.3. Dangers primaires
  - 7.4. Dangers particuliers
  - 7.5. Classe de confinement
  - 7.6. Précautions particulières
  - 7.7. Déversements accidentels
  - 7.8. Élimination
  - 7.9. Entreposage
  - 7.10. Évaluation de la viabilité
8. Immunisation naturelle, vaccinale
  - 8.1. Prophylaxie spécifique
  - 8.2. Prophylaxie non spécifique
9. Modèles d'études expérimentaux
  - 9.1. *In vitro*
  - 9.2. *In vivo*

## Liste des Tableaux

---

Tableau 1 : principaux procédés d'inactivation du virus de l'hépatite A dans l'eau et les aliments .....	356
Tableau 2 : souches de référence des Norovirus humains .....	372
Tableau 3 : résumé des différentes méthodes pour détecter les norovirus dans les aliments et dans les coquillages .....	375
Tableau 4 : méthode utilisée pour la détection des virus dans les coquillages .....	375
Tableau 5 : résistance des norovirus aux produits chimiques.....	378
Tableau 6 : résistance des norovirus aux traitements physiques.....	378
Tableau 7 : comparaison de l'efficacité sur le rotavirus de certains désinfectants.....	399
Tableau 8 : classification actuelle des Picornaviridae .....	429
Tableau 9 : informations actuellement disponibles sur les relations dose-infections de différents virus .....	431
Tableau 10 : classification actuelle des Picornaviridae .....	439

## Liste des Figures

---

Figure 1 : distribution géographique de l'hépatite A.....	357
Figure 2: organisation génomique du VHE et représentation schématique des polyprotéines p-ORF1, p-ORF2 et p-ORF3.....	361
Figure 3: réplication du VHE dans l'hépatocyte .....	362
Figure 4: diversité génétique du VHE.....	363
Figure 5: évolution des paramètres biologiques au cours de l'hépatite E .....	364

## **Annexe : fiches détaillées concernant les différents virus d'intérêt**

Ces fiches détaillées concernent les virus suivants, transmissibles à l'homme par voie orale :

- Le virus de l'Hépatite A
- Le virus de l'Hépatite E
- Les Calicivirus (Norovirus et Sapovirus)
- Les Rotavirus
- Les Astrovirus
- Les Adénovirus des sous-types 40 et 41
- Les Réovirus
- Les Entérovirus et Paréchovirus

## 1. Agent infectieux

### 1.1. Nom scientifique

*Human hepatitis virus A.*

### 1.2. Acronyme

HVA.

### 1.3. Nom usuel

Virus de l'hépatite A.

### 1.4. Caractéristiques

Le virion, dépourvu d'enveloppe, est constitué d'une capsidite de 28 à 30 nm de diamètre, icosaédrique, formée de 60 protomères composés chacun de 4 protéines ; elle contient le génome viral : ARN de 7,5 kb, linéaire, monocaténaire, de polarité positive qui ne comporte qu'un seul cadre de lecture ouvert, flanqué en 5' et 3' de deux régions non codantes. L'extrémité 5', région la plus conservée du génome, renferme le site d'entrée interne du ribosome (IRES). Le cadre de lecture ouvert code un précurseur polyprotéique, subdivisé en 3 régions (P1, P2, P3) et secondairement clivé en 4 protéines structurales (région P1) et 7 non structurales (régions P2 et P3) par une protéase virale. Le VHA est l'unique représentant du genre *Hepatovirus* au sein de la famille des *Picornaviridae*.

Un seul sérotype a été identifié. Les séquences génomiques des différentes souches sont très semblables, néanmoins 7 génotypes ont pu être décrits : les génotypes I et III étant subdivisés en 2 sous-types A et B. Près de 90 % des souches humaines appartiennent au génotype I, les 10 % restant au génotype III ; Les génotypes II et VII ne sont représentés chacun que par une seule souche isolée respectivement en France et en Sierra Léone. Tout récemment, le séquençage de la totalité de la région VP1 du génome de ces deux souches laisse à penser qu'il s'agit d'un seul et même génotype (II). La souche française étant classée comme génotype IIA et la souche de Sierra Léone comme génotype IIB (Lu *et al.* 2004). Quant aux génotypes IV, V et VI, ils ont été isolés uniquement à partir de singes. Le génotype III comprend des souches humaines et simiennes. Le génotype IA, qui est mondialement répandu, prédomine aux États-Unis, au Japon et en Asie alors que le génotype IB est retrouvé dans la région méditerranéenne, l'Australie, le Japon et l'Amérique du Sud. Le génotype IIIA circule en Inde, au Népal, en Malaisie, au Panama, aux États-Unis et en Suède, le IIIB au Japon et au Danemark.

### 1.5. Maladie correspondante

Ce virus est l'agent étiologique de l'hépatite virale de type A ou hépatite A (HA).

## 2. Pouvoir pathogène

### 2.1. Physiopathologie

Le VHA pénètre habituellement dans l'organisme par voie orale. Sa résistance au pH acide lui permet de traverser l'estomac, d'atteindre les cellules de l'intestin grêle dans lesquelles il se réplique avant de gagner le foie où il se multiplie dans le cytoplasme des hépatocytes ; d'autres sites de réplication (rate, reins, amygdales et glandes salivaires) pourraient exister. Les particules virales nouvellement synthétisées sont entraînées dans la circulation générale par le sang des sinusoides hépatiques et des veines centro-lobulaires et vers l'intestin par la bile. Le virus est considéré comme étant peu cytopathique et les lésions hépatiques liées à la réponse immunitaire. Toutefois la sélection de variants cytopathogènes suite à des mutations génomiques suggère l'existence d'une éventuelle relation entre sévérité de la maladie et variabilité génomique du VHA.

## 2.2. Dose infectieuse

Inconnue mais probablement faible, elle est estimée entre 10 et 100 particules virales. Des extrapolations de données obtenues à partir d'autres virus entériques ont permis d'estimer le risque de morbidité à  $9 \times 10^{-3}$ , chez une personne consommant 60 g de coquillages crus (poids de mollusque) contaminés par 6 virus infectieux en culture de cellules.

## 2.3. Mode de contamination

L'excrétion fécale de concentrations très élevées de particules virales ( $10^8$  à  $10^{10}$ /g de selles) et leur grande résistance dans le milieu extérieur rendent compte des différents modes de contamination. **La transmission par voie féco-orale** est de loin la plus habituelle (Hollinger et Ticehurst 1996 ; Nicand 2000). La contamination par contact direct, de personne à personne, à partir d'un sujet infecté représente la modalité la plus fréquente, avec un taux d'attaque secondaire pouvant atteindre 20 à 50 % dans l'entourage du sujet infecté en cas de promiscuité et de conditions d'hygiène précaires. La contamination indirecte par ingestion d'eau ou d'aliments contaminés est plus rare. Estimée être à l'origine de 5 % des cas d'HA aux États-Unis et de 18 % en France, elle est responsable de cas isolés ou d'épidémies massives d'HA. Les cas survenant à moins de 14 jours d'intervalle correspondent généralement aux cas primaires ayant la même source alimentaire de contamination. Ceux observés au-delà de 60 jours après l'origine de l'épidémie correspondent à des cas secondaires, liés à la transmission directe du virus de personne à personne. La contamination des aliments peut survenir aux différentes étapes de la chaîne alimentaire : culture, récolte, traitement, emballage, distribution voire lors de leur préparation culinaire. L'eau peut être aussi la source d'infections, des cas d'HA ont été décrits après des baignades dans des piscines ou des lacs (De Serres *et al.* 1999). En France, une épidémie a frappé, en 1993, au moins 13 enfants de maternelle qui se sont probablement infectés en jouant dans une piscine et en ingérant l'eau d'une pataugeoire souillée et insuffisamment chlorée (Hubert *et al.* 1999). Une étude suggère la possibilité d'une infection *via* des glaçons dans un bar (Sundkvist *et al.* 2000). Les autres modes de contamination sont moins importants sur le plan épidémiologique. Bien que faible, le risque de **transmission par voie parentérale** à partir de produits sanguins labiles ou de médicaments dérivés du sang a été démontré. En effet, une virémie se produit chez les sujets infectés 1 à 2 semaines avant le pic des Alanine Aminotransférases (ALAT) et peut persister jusqu'à 79 jours. La durée moyenne serait de 95 jours (36-391j) (Bower *et al.* 2000). Cependant, la quantité de virus dans le sang est moins importante que dans les selles. Les cas d'HA observés chez les toxicomanes usagers de drogues intraveineuses seraient dus plus aux mauvaises conditions d'hygiène liées à leur marginalité qu'à une introduction par voie parentérale du virus. Il existe aussi une **transmission sexuelle** du VHA surtout dans les communautés homosexuelles, favorisée par les contacts oro-anaux (une épidémie d'HA touchant 57 homosexuels masculins a été signalée à Paris au printemps 2000 (Delarocque-Astagneau *et al.* 2001) et une possible **transmission salivaire ou urinaire** du VHA infectieux étant retrouvé dans ces deux liquides biologiques (Hollinger 1996). Cependant, dans près de la moitié des cas, aucune source infectieuse n'est retrouvée.

## 2.4. Groupes à risque

Compte tenu des modes de contamination, les facteurs de risque d'HA sont essentiellement les séjours touristiques dans les régions de haute endémie ou d'endémie intermédiaire et la vie en promiscuité avec un sujet infecté. Cela concerne particulièrement l'entourage familial, les collectivités d'enfants, le personnel des crèches et des institutions pour handicapés, le personnel soignant dans les services de Pédiatrie et d'une manière générale les adultes exerçant une activité de soins. D'autres professions sont également exposées : les employés des blanchisseries, les techniciens de laboratoires, les employés des égouts et des stations d'épuration. Les prisonniers, les toxicomanes, les homosexuels masculins constituent également des groupes à risque.

Dans un rapport des médecins du réseau « Sentinelles » datant de 1997, le voyage est le principal facteur de risque (25 %) suivi par la suspicion d'une contamination d'origine alimentaire (18 %), l'homosexualité (4 %) et l'utilisation de drogues intraveineuses (0,5 %). Cependant dans 48 % des cas aucun facteur de risque n'est retrouvé.

## 2.5. Période d'incubation

Le délai d'incubation est en moyenne de 1 mois (10-50 j).

## 2.6. Manifestations cliniques

L'hépatite A est généralement une infection aiguë et bénigne, asymptomatique dans la majorité des cas, qui évolue vers la guérison sans séquelles dans 95 % des cas. La fréquence et la sévérité des signes cliniques augmentent avec l'âge. Alors que plus de 90 % des enfants infectés avant l'âge de 5 ans sont complètement asymptomatiques, 70 à 80 % des adultes infectés ont une symptomatologie clinique. La forme ictérique avec augmentation des

ALAT représente plus de la moitié des formes symptomatiques. L'évolution est le plus souvent spontanément favorable notamment chez l'enfant. La mortalité globale liée à l'infection par le VHA est estimée entre 0,2 % et 0,4 % des cas symptomatiques mais elle dépasse 2 % après 40 ans. Elle est le fait des formes graves subfulminantes ou fulminantes qui s'observent surtout chez les adultes et en particulier ceux porteurs d'une hépatopathie chronique sous-jacente. Ces formes graves définies par l'association d'une hépatite aiguë, d'une encéphalopathie métabolique associée à un taux de facteur V < à 50 % ont un taux de létalité spontanée de 70 à 90 % ; elles peuvent conduire à une transplantation hépatique en urgence. Si l'HA n'évolue jamais vers la chronicité, des rechutes peuvent se voir 4 à 15 semaines après une HA symptomatique apparemment guérie. Quant aux manifestations extra-hépatiques, si elles aussi sont plus fréquentes chez l'adulte (manifestations neurologiques, thrombocytopénie essentielle, cryoglobulinémie), elles restent exceptionnelles.

### 3. Stratégies du diagnostic

#### 3.1. Diagnostic chez l'homme

Le diagnostic repose sur la détection en ELISA des immunoglobulines de type M spécifiques (IgM). Chez la plupart des patients les IgM anti-VHA sont détectables 5 à 10 jours avant l'ictère et persistent 3 à 6 mois, exceptionnellement 1 an. Des trousseaux pour la recherche dans le sérum des IgM et des anticorps totaux (IgG + IgM) anti-VHA sont commercialisés.

La place du diagnostic direct est limitée. Le virus est difficile à isoler *in vitro*, il ne cultive que sur des lignées cellulaires d'hépatocytes FRHK4 ou FRP3 sans aucun effet cytopathique visible. La recherche de l'antigène par technique ELISA ou radioimmunoassay est réservée à des laboratoires spécialisés. Quant à l'ARN du virus, il peut être recherché par RT-PCR à partir des selles ou du sérum du patient, mais ce type d'examen est rarement réalisé dans un but diagnostique.

L'origine alimentaire de cas sporadiques ou de quelques cas groupés est souvent difficile à prouver du fait :

- 1/ de la période d'incubation relativement longue qui ne permet pas toujours de se souvenir de tous les aliments absorbés dans les 2 à 6 semaines qui ont précédé les signes cliniques ;
- 2/ de la possibilité d'une contamination très localisée de l'aliment incriminé ;
- 3/ de l'existence de formes asymptomatiques parmi les personnes exposées, certaines d'entre elles pouvant par ailleurs être déjà immunisées par une infection antérieure ou une vaccination ;
- 4/ de la survenue simultanée de cas résultant d'une contamination directe de personne à personne. L'analyse moléculaire des souches éventuellement amplifiées à partir de l'aliment suspect et du sérum ou des selles des patients peut être alors utile.

#### 3.2. Diagnostic dans l'environnement et les aliments

La quantité de virus dans les aliments comme dans les prélèvements de l'environnement étant généralement faible, des méthodes de concentration sont souvent indispensables ; elles diffèrent en fonction des matrices utilisées.

**Eau :** Pour l'analyse de l'eau, de 1 à 100 litres est(sont) généralement nécessaire(s). Les virus sont concentrés sur des filtres possédant des charges électriques sur lesquels ils sont retenus par des liaisons électrostatiques. Les virus ont en effet des propriétés de molécules amphotères : leur capsid possède des charges électrostatiques qui varient en fonction du pH. Pour retenir les virus sur les filtres électro-négatifs, le pH de l'eau doit être acidifié ; les filtres électro-positifs sont efficaces dans une plus grande gamme de pH allant de la neutralité à pH acide. Les virus retenus sur les filtres sont récupérés grâce à des solutions basiques (pH 9 à 9,5) de plus faible volume (concentration de 100 à 1 000 fois). Une norme AFNOR (XP T 90-451) décrit une méthode de recherche des entérovirus basée sur ce principe. Une concentration secondaire est parfois réalisée par précipitation au polyéthylène glycol (PEG) ou par floculation organique afin de réduire encore le volume du concentrat (1/50 du volume du premier concentrat). Les rendements de récupération sont souvent supérieurs à 90 %.

**Aliments :** Les coquillages sont analysés entiers ou bien disséqués, seule la glande digestive est alors utilisée pour la recherche virale. Les tissus de plusieurs coquillages sont broyés dans une solution tamponnée à pH basique parfois supplémentée en acides aminés (glycine) et/ou en protéines (extrait de bœuf) permettant de détacher les virus des tissus. Après clarification, les virus sont précipités soit avec du PEG, soit par floculation organique et remis en suspension dans un volume de quelques millilitres. Le concentrat est éventuellement re-concentré avec un agent précipitant (PEG, Pro-cipitate). Les rendements de concentration sont proches de 50 %.

Peu de travaux proposent des méthodes de concentration des virus à partir d'aliments contaminés en surface, comme les denrées végétales ou les produits de traiteurs. Les protocoles comportent généralement un lavage de la surface de l'aliment et une concentration soit par filtration, soit par précipitation.

La RT-PCR est la méthode la plus sensible permettant de détecter une contamination virale de l'environnement ou d'un aliment. Elle ne permet pas toutefois d'affirmer le caractère infectieux du virus. Arnal *et al.* (1998) ont testé la stabilité du VHA dans de l'eau de mer artificiellement contaminée. Le génome viral a été détecté par RT-PCR pendant 232 j, en revanche le virus n'a pu être isolé en culture cellulaire que seulement 35 j.

Pour l'eau comme pour les aliments, les acides nucléiques sont soit extraits directement à partir des concentrats, soit obtenus après purification des virus avec des anticorps fixés sur des billes magnétiques (antigène-capture). Cette dernière méthode permet de donner une information supplémentaire sur l'intégrité structurale du virus.

La méthode d'extraction la plus simple est l'ébullition mais des solutions à base de guanidium (agents dénaturants des protéines) sont plus fréquemment utilisées pour extraire les ARN. Les ARN sont purifiés soit par simple précipitation alcoolique, et/ou par précipitation au cétyle-triammonium bromide, soit par rétention sur des billes ou gels de silice, ou encore par capture des ARN avec des sondes fixées sur des billes magnétiques (hybridation-capture). Ces techniques ont l'avantage également de concentrer les ARN.

Plusieurs couples d'amorces sont nécessaires afin de détecter et de caractériser le génome des souches de VHA. La sensibilité et la spécificité de la réaction sont accrues soit par une ré-amplification des produits de PCR en modifiant le couple d'amorce, soit par hybridation avec une sonde ciblant une région interne à la séquence amplifiée.

Des eaux inoculées avec au moins 1 à 10 VHA infectieux en culture de cellule par litre et des coquillages contaminés avec au moins 10 à 100 VHA infectieux en culture de cellule par gramme sont détectés positifs. Cependant, ce nombre correspond à au moins 10 fois plus de particules virales totales (VHA infectieux et non-infectieux).

## 4. Épidémiologie et systèmes de surveillance

### 4.1. Systèmes de surveillance

**En France :** les cas cliniques d'hépatites A étaient recensés par les médecins appartenant au réseau « Sentinelle ». Leur déclaration est devenue obligatoire depuis janvier 2006. La France dispose d'un Centre National de Référence des virus des hépatites à transmission entérique (hépatites A et E) : Laboratoire de Virologie, hôpital Paul-Brousse, Assistance publique-hôpitaux de Paris.

**En Europe :** des données épidémiologiques européennes sont collectées et diffusées *via* le site Internet « Eurosurveillance ». Un réseau regroupant 25 pays est en voie de constitution.

**Aux États-Unis :** les « Centers for Diseases Control and Prevention » (CDC) en collaboration avec le « Council of State and Territorial Epidemiologists » gèrent le « National Notifiable Diseases Surveillance System » qui collecte et analyse les données statistiques sur les maladies importantes, dont l'hépatite A.

### 4.2. Statut épidémiologique et prévalence

L'épidémiologie de l'hépatite A, comme celle de l'ensemble des maladies à transmission féco-orale, évolue parallèlement à l'élévation du niveau de vie et l'amélioration des conditions d'hygiène (Nicand 2000). Dans les pays en voie de développement, les jeunes enfants sont exposés très tôt au VHA. En Afrique, Asie et Amérique latine, le taux de séroprévalence est voisin de 100 % cependant les progrès en matière d'hygiène collective dont bénéficient surtout les populations des grandes villes conduisent à une diminution de l'incidence des infections (Gandhe 2001 ; Wang *et al.* 2001). Dans les pays industrialisés, l'amélioration des conditions sanitaires s'est accompagnée d'une diminution de l'immunité collective naturelle contre le VHA (Figure 1). En France, le taux de prévalence des anticorps anti-VHA chez les jeunes recrues du service national a diminué de façon spectaculaire en 20 ans en passant de 50 % en 1978 à 11,5 % en 1997 (Joussemet *et al.* 1999). Cette tendance épidémiologique est constatée dans l'ensemble des pays de l'Europe (Dal Re *et al.* 2000; Nicand 2000) et des États-Unis. L'augmentation de la réceptivité au VHA dans la classe adulte a entraîné, en revanche, une augmentation des formes sévères d'HA.

En fonction de l'incidence de l'infection et de la prévalence des anticorps anti-VHA, trois niveaux d'endémicité ont été définis. Les régions de haute endémicité, principal réservoir de virus, sont caractérisées par un niveau

d'hygiène bas et l'absence de réseaux d'assainissement des eaux usées. Sept cent à 1 000 cas d'HA symptomatiques pour 100 000 habitants sont enregistrés chaque année en sachant que ce chiffre est certainement sous-estimé. La maladie est le plus souvent asymptomatique et ne pose pas de problème de santé publique pour les autochtones. En revanche les voyageurs non immunisés sont particulièrement exposés. Les régions d'endémicité intermédiaire sont celles qui ont vu leurs conditions d'hygiène s'améliorer rapidement. Cinquante à deux cent cas pour 100 000 habitants sont dénombrés chaque année. Les jeunes enfants sont de moins en moins exposés, en revanche le risque d'infection augmente chez les adolescents et les adultes jeunes. Ainsi, paradoxalement alors que les conditions d'hygiène sont meilleures, l'HA devient un problème de santé publique et de fortes épidémies sont à craindre. Les régions de faible endémie avec un maximum de 15 cas d'HA recensés/an correspondent aux pays les plus développés dans lesquels la circulation du virus a quasiment disparu. Dans ces régions les populations sont particulièrement réceptives, le risque d'épidémie communautaire par importation de virus sauvage est élevé. En France, l'incidence annuelle de l'HA diagnostiquée par un médecin du Réseau Sentinelles a été estimée en 1999 à 18 cas pour 100 000 habitants soit 10 533 nouveaux cas/an dont 8 110 autochtones. Le nombre annuel de décès a été estimé à 0,4 % (42 en 1999). En 2003, 23 cas ont été diagnostiqués par ce réseau, le nombre d'hépatites A a été estimé à 7 700 (2 900-12 500) et l'incidence annuelle à 13 cas pour 100 000 (Couturier 2005). Cependant, en raison du faible nombre de cas notifiés, ces estimations ne sont qu'approximatives. Ces données placent la France à un niveau d'endémie modéré.

## 5. Mode de dissémination

### 5.1. Réservoir

L'homme est le principal réservoir de virus. Les sujets infectés sont particulièrement contagieux une à deux semaines avant l'apparition de l'ictère ou du pic des ALAT. Si la concentration de VHA infectieux dans les selles chute rapidement après l'apparition de l'ictère, une excrétion virale prolongée (jusqu'à 5 mois après l'infection) a été observée, en particulier chez les enfants et les nourrissons, (Cuthbert 2001). Les personnes infectées mais asymptomatiques (principalement les enfants) excrètent aussi le virus et sont donc également contagieuses.

### 5.2. Zoonose

Les singes en captivité ou sauvages peuvent être également infectés par le VHA mais il semblerait que l'homme soit peu réceptif aux souches simiennes, même si des cas d'hépatites A ont été rapportés chez des éleveurs ayant manipulé des singes infectés (Hollinger, 1996).

### 5.3. Vecteurs

La transmission du VHA par des insectes coprophages ou piqueurs contaminés n'a jamais été démontrée.

### 5.4. Mode de contamination des aliments et de l'eau

L'homme est la principale source de virus. La personne infectée peut propager le virus par ses mains sales ou bien contaminer les eaux usées par ses selles. Un dysfonctionnement du procédé de désinfection associé à une contamination des ressources ou une pollution accidentelle du réseau de distribution par des eaux usées peut être à l'origine de la contamination, par des matières fécales infectées, des eaux potables et secondairement des aliments lavés avec ces eaux souillées et consommés crus. Les procédés de traitement des eaux usées ne sont pas totalement efficaces sur le VHA. Le re-largage des eaux usées contaminées dans l'eau de mer peut être ainsi à l'origine d'une contamination des fruits de mer, en particulier des coquillages bivalves (palourdes, huîtres, coques et moules) qui filtrent l'eau pour se nourrir. Leurs branchies retiennent les virus adsorbés aux particules, lesquels se retrouvent ensuite concentrés dans la sphère digestive du mollusque. Une importante épidémie (plus de 800 cas) a touché, en 1992, les départements du Morbihan et de Loire-Atlantique. Les enquêtes suspectaient que des huîtres consommées crues étaient à l'origine de la contamination, cependant aucune confirmation étiologique n'a pu être établie. En 1988, une épidémie d'HA a touché 250 000 personnes à Shanghai suite à la consommation de palourdes (Halliday *et al.* 1991). La désinfection par chloration inactive les virus mais son efficacité est souvent réduite par la présence de matières organiques dans l'eau. Les eaux épurées rejetées dans l'environnement peuvent donc encore contenir des virus, en revanche les traitements de désinfection des eaux de boisson sont généralement efficaces. Une récente étude réalisée dans le sud de la France sur trois années indique que 13 % des moules issues de zones polluées par des eaux usées étaient contaminées par le VHA, alors qu'aucun VHA n'était détecté dans les coquillages issus de zones salubres.

Récemment, des palourdes (coquina clams) importées du Pérou ont été responsables d'environ 200 cas d'hépatite A dans la région de Valence (Espagne) (Bosch *et al.* 2001).

Les eaux de surfaces (rivières) et les eaux du littoral marin reçoivent les virus adsorbés à des sédiments et les transportent parfois sur de longues distances. Les particules finissent par se déposer à la surface des sédiments où la concentration virale peut être 10 à 10 000 fois plus importante que celle de l'eau sus-jacente. Une remise en suspension des particules est possible notamment en cas de tempête.

Enfin, certaines pratiques agraires sont des facteurs de dissémination, en particulier l'irrigation de cultures avec des eaux contaminées et l'amendement des sols avec des boues urbaines insuffisamment traitées qui risquent de contaminer des légumes ou des fruits consommés crus. Des denrées végétales, consommées crues et souillées par des eaux d'irrigation polluées, ont été à l'origine d'épidémies dans le monde entier. En 1997 aux États-Unis, la consommation de fraises congelées contaminées importées du Mexique a été responsable de 262 cas d'HA observés dans 36 cantines scolaires réparties sur 5 États (Hutin *et al.* 1999). L'analyse génétique des différents isolats a permis d'incriminer les fraises comme source unique de contamination. En novembre 2003, une épidémie d'hépatite A touchant plus de 700 personnes est survenue chez les clients d'un restaurant en Pennsylvanie suite à l'absorption d'oignons verts. Elle a fait 3 morts (CDC report 2003).

Si les coquillages bivalves, les fruits et les crudités ont la réputation d'être la principale source alimentaire d'HA, d'autres aliments ont été incriminés : desserts, glaces, sandwichs, 26 cas d'HA ont été rapportés en Italie suite à la consommation de sandwichs contaminés par un cuisinier infecté par un nouveau variant de génotype IB (Chironna *et al.* 2004). D'une manière générale, toute denrée manipulée sans précautions d'hygiène par une personne infectée et qui, ensuite, est consommée crue ou insuffisamment cuite peut être responsable d'HA. La transmission par les mains sales a été évaluée par des expérimentations chez des volontaires : 9 % du virus déposé sur des doigts a été transmis à des feuilles de salade par simple contact (Bidawid *et al.* 2000). Des études suggèrent que certains produits faciliteraient la transmission. Des laitues, des carottes et des fenouils ont été trempés 20 minutes dans de l'eau contaminée par du VHA puis stockés au réfrigérateur. Du virus infectieux a été isolé à partir des laitues jusqu'à 9 jours après le trempage alors qu'il n'a pu être isolé des carottes et des fenouils que 4 à 7 jours après. Le lavage des légumes réduit mais n'élimine pas complètement le virus (Crocchi *et al.* 2002).

## 5.5. Surveillance des aliments

Concernant spécifiquement la contamination des aliments par le VHA, il n'existe pas de système de contrôle. Le plus souvent ce sont des critères bactériologiques (numération des coliformes, et parfois de streptocoques fécaux et/ou de salmonelles) qui sont utilisés pour apprécier la qualité microbiologique. Dans le cas de l'eau et des boues urbaines utilisées en agriculture, la qualité virologique est évaluée en recherchant les bactériophages et les entérovirus. Quant aux boues d'épuration hygiénisées, utilisées en agriculture, elles doivent contenir moins de 3 entérovirus par 10 g. Cependant, l'absence de ces virus, comme des bactéries entériques, n'est pas un indicateur fiable de non-contamination par le VHA.

**Système de surveillance des aliments en France :** Si le VHA est responsable d'une toxi-infection alimentaire collective (TIAC), la déclaration est obligatoire. Une enquête épidémiologique et vétérinaire est alors réalisée pour identifier les aliments responsables et les facteurs favorisant et prendre des mesures spécifiques pour prévenir les récurrences.

L'Ifremer a été nommé Laboratoire National de Référence (LNR) pour le contrôle des contaminations bactériologiques et virales des mollusques bivalves et a développé les outils pour détecter ces virus dans les coquillages.

**Système de surveillance des aliments en Europe :** Le laboratoire du « Center for Environmental, Fisheries and Aquaculture Science » à Weymouth (Royaume-Uni) est désigné comme Laboratoire Communautaire de Référence (LCR) pour le contrôle des contaminations bactériologiques et virales des mollusques bivalves.

La communauté européenne dispose d'un système d'alerte rapide pour les aliments, sur lequel sont diffusées des informations relatives à la sécurité sanitaire des aliments.

**Système de surveillance aux États-Unis :** Le CDC et l'« U.S. Environmental Protection Agency » entretiennent un système de surveillance des épidémies de maladies (dont l'HA), liées à l'eau. Le CDC anime également le « Foodborne-Disease Outbreak Surveillance System » dont les objectifs sont la prévention, le contrôle et la connaissance des causes des maladies liées à l'alimentation.

## 6. Survie de l'agent infectieux

### 6.1. Sensibilité aux médicaments

Il n'existe à ce jour aucun traitement spécifique.

### 6.2. Sensibilité aux traitements de désinfection

Le VHA est connu pour sa résistance aux agents chimiques et physiques qui lui confère une survie prolongée dans le milieu extérieur (Tableau 1).

**Inactivation par les moyens chimiques :** le VHA résiste aux pH acides, aux solvants des lipides (éther à 20 %, chloroforme) en raison de l'absence d'enveloppe, aux concentrations de chlore présentes dans les eaux de piscine ou l'eau de boisson (0,1 à 0,2 ppm). De nombreux désinfectants comme l'alcool à 70°C et la chloramine T (4g.L<sup>-1</sup>, pendant 15 min à 20°C) sont inefficaces. Il n'est pas détruit par le cycle d'épuration biologique des eaux usées : en effet leur désinfection au chlore ou à l'ozone n'est pratiquée qu'en amont des zones de baignades ou des parcs conchylicoles. Le pouvoir infectieux du virus est réduit de 99,99 % après traitement avec 0,5 ppm de chlore libre en 6 min 30 sec à pH 6 ; avec 0,4 à 2 ppm d'ozone en 5 secondes. Cependant, ces études sont réalisées avec du virus purifié, en suspension dans des solutions sans matière organique. Les concentrations et/ou le temps de contact doivent être supérieurs afin d'obtenir des niveaux semblables de réduction dans de l'eau naturelle.

#### **Inactivation par des moyens physiques :**

**Action de la température :** le VHA est résistant à la chaleur, il est stable 1h à 60°C et partiellement inactivé après 10 à 12 heures à 60°C (Hollinger et Ticehurst 1996). En revanche, il est inactivé par l'autoclavage (121°C pendant 20 min), un chauffage à 100°C pendant 5 min. Cependant les conditions environnementales dans lesquelles est présent le virus peuvent influencer sa sensibilité à la chaleur :

- les virus présents dans les selles sont plus résistants à la chaleur que ceux cultivés *in vitro* ;
- l'inactivation de virus dans des coquillages nécessite des températures et des durées de cuisson plus élevées que celles nécessaires pour inactiver la même quantité de virus présente dans une suspension virale ; l'ouverture des valves, considérée traditionnellement comme un critère de cuisson des moules, ne s'accompagne pas d'une inactivation totale du virus. Il est recommandé, pour détruire le virus d'appliquer une température à cœur de 85-90°C pendant 2 minutes (Crocchi *et al.* 1999) ;
- dans une solution tamponnée, le nombre de particules infectieuses est réduit de 10<sup>6</sup> fois après 30 min à 62,8°C, 30 s à 75°C et 5s à 85°C. En revanche, en présence de 1 M de MgCl<sub>2</sub>, le virus est plus résistant et son pouvoir infectieux est conservé après 10 min à 80°C ;
- si 30 secondes à 85°C sont suffisantes pour réduire de 5 log le titre de VHA présent dans différents produits laitiers, en revanche à 80°C deux fois plus de temps sont nécessaires pour obtenir la même réduction du titre respectivement à partir de lait (42 s) et de crème à 18 % de matière grasse (1 minute 24) (Bidawid *et al.* 2000). Une pasteurisation à plus de 71°C pendant 15 s réduit de 38 fois la quantité de VHA infectieux dans le lait écrémé et seulement de 7 fois dans une crème ;
- dans des préparations sucrées à base de fraises, présentant un taux de sucre d'environ 28 %, des traitements thermiques de 1,22 min à 80°C ou 0,32 min à 90°C sont nécessaires pour réduire par 10 le titre infectieux du VHA. Ces durées sont de 8,94 min et 3 min à 80°C et 90°C respectivement lorsque le taux de sucre est de 52 %.

**Action des rayons ultraviolets (UV) :** une dose de rayons UV de 1250 J/m<sup>2</sup> réduit de plus de 4 log la quantité de VHA infectieux. Cependant les expériences ont été réalisées sur du virus en suspension dans du PBS, solution sans couleur ni turbidité qui réduit au minimum l'absorption des rayons UV (Nuanualsuwan *et al.* 2002). Des doses supérieures sont vraisemblablement nécessaires pour inactiver le virus dans des eaux naturelles.

### 6.3. Survie dans l'environnement

Le VHA ne se multiplie pas en dehors de son hôte (l'homme) mais il est très résistant aux conditions physico-chimiques rencontrées dans l'environnement naturel. La température est un paramètre déterminant : plus elle est basse, plus les virus survivent longtemps. Le virus reste infectieux de plusieurs jours à plusieurs mois au niveau des coquillages, des sols et des sédiments marins, de l'eau douce et de l'eau de mer. Des études sur la survie du VHA dans l'eau minérale et l'eau de mer contaminées expérimentalement ont montré que dans l'eau minérale l'inoculum de départ est réduit après 360 jours à 4°C de seulement 0,7 log et à température ambiante de 5 log tout en restant détectable (Biziagos *et al.* 1988). Dans l'eau de mer le virus persiste 8 semaines à 25°C, les variations de salinité ne semblant pas influencer sa survie (Garin *et al.* 1996). La stabilité du virus dans les milieux

liquides dépend en fait de nombreux facteurs : pH, degré d'ensoleillement ou d'éclairage, concentration en protéine, adsorption éventuelle sur des matériaux inertes en suspension.

Le temps d'épuration virale des coquillages semble plus long que celui nécessaire pour éliminer les coliformes fécaux (indicateurs de contamination fécale).

## **7. Dangers spécifiques liés à la manipulation pour le personnel de laboratoire et modalité de prévention**

### **7.1. Infections acquises au laboratoire**

Risque faible pour le personnel de laboratoire mais documenté pour les personnes qui manipulent des animaux et chimpanzés infectés.

### **7.2. Sources et échantillons**

Fèces et sérums des humains et des chimpanzés infectés, cultures de cellules infectées, prélèvements d'eaux de stations d'épuration.

### **7.3. Dangers primaires**

Ingestion de fèces, de suspension de selles et d'autres matières contaminées. Le danger de l'exposition aux aérosols n'a pas été démontré.

### **7.4. Dangers particuliers**

Aucun.

### **7.5. Classe de confinement**

Niveau de confinement 2 pour les travaux portant sur le matériel infecté. Animaleries de niveau de bio-sécurité 2 pour les travaux faisant appel à des chimpanzés infectés de façon naturelle ou à des fins expérimentales.

### **7.6. Précautions particulières**

Manipulation du matériel infecté sous poste de sécurité microbiologique de classe 2, port de vêtements de protection et de gants. Le personnel des animaleries doit porter gants et vêtements de protection et prendre les précautions appropriées pour éviter l'exposition par voie fécale-orale.

### **7.7. Déversements accidentels**

Laisser retomber les aérosols ; endosser des vêtements protecteurs, mettre des gants, couvrir soigneusement la substance déversée avec des serviettes de papier et appliquer de l'hypochlorite de sodium à 1 %, de la périphérie vers le centre ; laisser agir pendant une période suffisante (30 min) avant de procéder au nettoyage.

### **7.8. Élimination**

Décontaminer la substance avant de l'éliminer ; stériliser par la vapeur, incinérer, désinfecter chimiquement.

### **7.9. Entreposage**

Dans des contenants scellés étanches et résistants, étiquetés de façon appropriée.

### **7.10. Évaluation de la viabilité**

La mise en culture du virus et l'inoculation à des animaux font référence. Cependant, il est impossible d'obtenir par ces techniques des résultats rapides et fiables pour des contaminations naturelles par un virus sauvage difficilement cultivable. Des alternatives consistent à montrer la présence à la fois de marqueurs antigéniques et génomiques qui caractérisent l'intégrité de la capsidie et du génome et donc le potentiel infectieux du virus. Toutefois, la validation des études reste à faire.

## 8. Immunisation naturelle, vaccinale

Une seule infection d'HA semble générer une immunité qui dure la vie entière. Comme pour les autres entérovirus, la protection est assurée par des anticorps de type neutralisant.

### 8.1. Prophylaxie spécifique

Elle est assurée par la vaccination. Il s'agit d'un vaccin dit « tué/inactivé » administré par voie parentérale. Cette vaccination n'est pas obligatoire. Les recommandations actuelles concernent les sujets exposés professionnellement (personnels des crèches et d'internats des établissements et services pour l'enfance et la jeunesse handicapée ; personnels de traitement des eaux usées ; personnels impliqués dans la préparation alimentaire en restauration collective) et les voyageurs (adultes non immunisés et enfants au-dessus de un an) séjournant dans les pays endémiques pour le VHA, patients infectés chroniques par le virus de l'hépatite B ou porteurs d'une hépatopathie chronique, homosexuels masculins. Outre ces recommandations, d'autres indications sont actuellement discutées : vaccination dans l'entourage d'un cas, contrôle d'un épisode épidémique survenant dans une collectivité, contexte épidémiologique. En revanche, elle est pratiquée quasi-systématiquement chez les militaires.

### 8.2. Prophylaxie non spécifique

La prévention de l'hépatite A comporte les mesures habituelles d'hygiène prises dans le cadre des infections à transmission fécale :

- chez l'homme : lavage soigneux des mains, lavage soigneux des fruits et légumes susceptibles d'être contaminés. Éviter en zone endémique l'absorption de coquillages ;
- dans les laboratoires : utilisation de matériel à usage unique et destruction du matériel susceptible d'être contaminé (autoclavage du matériel, suivi d'une incinération) ;
- contrôles des sources possibles de contamination par les laboratoires d'hygiène : eaux de puits, coquillages, etc.

## 9. Modèles d'études expérimentaux

### 9.1. *In vitro*

Le VHA peut être cultivé sur des cultures primaires d'explants de foie (marmouset), de cellules rénales de singe vert africain (AGMK), des lignées cellulaires telles que les cellules hépatocytaires humaines PLC/PRF/5, les cellules rénales de fœtus de singes rhésus (FRhK4 et FRhK6) ou de singe vert africain (Véro) et les cellules dérivées de carcinome de colon humain (CaCo-2). Certaines souches de virus ont été adaptées sur des lignées fibroblastiques humaines (HEF, Wi-26) ou dérivées de cellules rénales (FRhK4, FRhK6, Véro, BSC1, BGMK). Des mutants du VHA ont été sélectionnés pour leur forte capacité à se multiplier rapidement et/ou à développer un effet cytopathique (destruction des cellules infectées). Néanmoins, les souches sauvages sont difficiles, voire impossibles, à adapter aux cultures. Les tentatives d'isolement viral nécessitent plusieurs passages à l'aveugle sur cultures cellulaires.

### 9.2. *In vivo*

Les primates non-humains comme le chimpanzé (*Pan troglodytes*), le singe de nuit (*Aotus trivigatus*), le macaque (*Macaca speciosa*), et le tamarin (*Saguinus mystax* et *S. labiatus*) sont sensibles à l'infection par le VHA. La maladie chez les singes ressemble à celle de l'homme mais les symptômes sont moins importants.

Tableau 1 : principaux procédés d'inactivation du virus de l'hépatite A dans l'eau et les aliments

Procédés d'inactivation	Produits alimentaires éventuellement concernés	Degré d'inactivation (log <sub>10</sub> )	Références
<b>Traitement thermique</b>			
100°C pendant 5 minutes	Tout aliment liquide ou solide porté à ébullition	> 4	Hollinger et Ticehurst 1996
85°C pendant 30 secondes	Produits laitiers	> 4	Bidawid <i>et al.</i> 2000
80°C pendant 15 minutes	Moules	> 4	Croci <i>et al.</i> 1999
Pasteurisation de produits solides (70°C, 2 minutes)	Paté , aliments cuits	< 2	Millard <i>et al.</i> 1987
Pasteurisation de produits liquides (HTST 71°C, 15 secondes)	Lait, glaces	< 2	Bidawid <i>et al.</i> 2000
Procédé UHT (>120°C)	Lait longue conservation et autres produits laitiers		
<b>Autres procédés physiques, chimiques, biologiques</b>			
Dessication	Laits en poudre, soupes instantanées	< 2	Abad <i>et al.</i> 1994
Congélation	Glaces, desserts glacés	< 1	Hollinger et Ticehurst 1996
Fermentation	Fromages, yaourts	pas d'information	
Acidification	Jus de fruits	pH 1 pendant 5 H : inactivation incomplète. Pas de données quantitative concernant l'inactivation	Hollinger et Ticehurst 1996
Pression hydrostatique élevée (400 megapascals pendant 1 minute)	Huîtres	> 3	Calci <i>et al.</i> 2005
<b>Procédés d'inactivation du VHA dans l'eau</b>			
Chloration : 5 ppm, 1h 10 ppm 30 min	Eau	< 1 > 4	Li <i>et al.</i> 2002
Rayons Ultra-Violet 1250J/m <sup>2</sup>	Eau	> 4	Nuanualsuwan <i>et al.</i> 2002
Ozone (0,28 à 0,38ppm)	Eau	>3	Herbold <i>et al.</i> 1989
<b>Désinfections du matériel et des surfaces</b>			
Éthanol (70 %, 10 minutes)		< 2	Abad <i>et al.</i> 1997
Chlorexidine di gluconate 0,05 %, 10 minutes		< 1	Abad <i>et al.</i> 1997
Hypochlorite de sodium 0,125 % 10 minutes		< 3	Abad <i>et al.</i> 1997
Chlorite de Na 30 % , 10 minutes		> 3	Abad <i>et al.</i> 1997

d'après Koopmans et Duizer, 2004

Figure 1 : distribution géographique de l'hépatite A



## Références

Abad FX, Pinto RM, Bosch A (1994). Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 : 3704-3710.

Abad FX, Pinto RM, Bosch A (1997). Disinfection of human enteric viruses on fomites. *FEMS Microbiol Letter.* 156 : 107-111.

Anonyme (1996). La prévention de la transmission du virus de l'hépatite A en situation épidémique. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire*, numéro 50.

Arnal C, Crance JM, Gantzer C, Schwartzbrod L, Deloince R, Billaudel S (1998). Persistence of infectious hepatitis A virus and its genome in artificial seawater. *Zent.bl Hyg. Umweltmed* 201 : 279-284.

Bidawid S., Farber J.M., Sattar S.A. (2000). Contamination of foods by foodhandlers: experiments on hepatitis A virus transfer to food and its interruption. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2759-2763.

Bidawid S., Farber J.M., Sattar S.A. Hayward S. (2000). Heat inactivation of hepatitis A virus in dairy foods. *J. Food Prot.* 63 : 522-528.

Biziagos E, Passagot J, Crance JM, Deloince R (1988). Long term survival of hepatitis A virus and poliovirus type 1 in mineral water. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 2705-2710.

Bosch A., Sanchez G., le Guyader F., Vanaclocha H., Haugarreau L, Pinto R.M. (2001). Human enteric viruses in Coquina clams associated with a large hepatitis A outbreak. *Wat. Res.* 43, 61-65.

Bower WA, Nainan OV, Han X, Margolis HS. (2000). Duration of viremia in hepatitis A infection. *J Infect Dis* 182 : 12-17.

Calci KR, Meade GK, Tezloff RC, Kingsley DH. (2005). High pressure inactivation of hepatitis A virus in oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 : 339-343.

Chironna M., Lopalco P., Prato R., Germinario C., Barbuti S., Quarto M. (2004). Outbreak of infection with hepatitis A virus (HAV) associated with a foodhandler and confirmed by sequence analysis reveals a new HAV genotype IB variant. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2825-2828.

Clover et al. (1983). Methods to detect viruses in foods testing and interpretation of results. *Journal of Food Protection*, 46 : 345-357.

- Centers for Disease Control and Prevention. (2003). Hepatitis A outbreak associated with green onions at a restaurant, Monaca, Pennsylvania. *Morb Mortal Wkly Rep.*, 52 : 1155-1157.
- Couturier E, Delarocque-Astagnaud E, Vaillant V, Desenclos JC. 2005. Surveillance de l'hépatite A en France au cours des vingt dernières années : les données actuelles ne permettent pas d'estimer le taux d'incidence. *BEH* n° 5, p19-20.
- Croci L, Ciccozzi M, De Medici D, Di Pascale S, Fiore A, Mele A, Toti L. (1999). Inactivation of hepatitis A virus in heat-treated mussels. *J. Appl. Microbiol.* 87 : 884-888.
- Croci L, De Medici D, Scalfaro C, Fiore A, Toti L. (2002). The survival of hepatitis A virus in fresh produce. *Int J Food Microbiol*; 73 : 29-34.
- Cuthbert (2001). Hepatitis A: old and new. *Clinical Microbiology Reviews*, 14 : 38-58.
- Dal-Re R, Garcia-Corbeira P, Garcia-de-Lomas J. A large percentage of the Spanish population under 30 years of age is not protected against hepatitis A. *J Med Virol.* 2000, 60 : 363-364.
- Delarocque-Astagneau E, Valenciano M, Dariosecq JM, Rousselle C, Bouvet E, Laporte A (2001). Une épidémie d'hépatite a chez des homosexuels masculins à Paris en 2000. *BEH* 44.
- Deboosere N. et al. (2004). Modelling effect of physical and chemical parameters on heat inactivation kinetics of Hepatitis A virus in a fruit model systems. *International Journal of Food Microbiology*, Vol 93, pages 73-85.
- De Serres G, Cromeans TL, Levesque B, Brassard N, Barthe C, Dionne M, Prud'homme H, Paradis D, Shapiro CN, Naiman OV, Margolis HS. (1999). Molecular confirmation of hepatitis A virus from well water : epidemiology and public health implications. *J Infect Dis* 179 : 37-43.
- Feinstone SM, Kaplan AZ, Purcell RH. (1973). Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of viruslike antigen associated with acute illness. *Science*, 182 : 1026-1028.
- Fiore A.E. (2004). Hepatitis A transmitted by food. *Clinical Infectious Diseases*, 38 : 705-714.
- Flahault et al. (1997). Six ans de surveillance des hépatites A et B en médecine générale, en France. *Eurosurveillance*, 2 : 56 à 57.
- Gandhe SS. Changing epidemiology of hepatitis A and hepatitis E in urban and rural India (1928-98). *Viral Hepat* 2001 ; 8 : 293-303.
- Gantzer et al. (1998). Indicateurs de contamination virale du milieu hydrique : mythe ou réalité ?. *Virologie*, 2 : 117 à 125.
- Garin D, Bizragos E, Crance JM, Gantzer C, Levêque F, Delance R, Schartzbrod L. Survival of infections hepatitis A virus in mineral water and sea water in Enterically – transmitted hepatitis virus. Y. Buisson, P. Coursagat, M. Kane editors. La Simarre, Joué les Tours. 1996 p48-49.
- Halliday ML, Kang LY, Zhou TK, Hu MD, Pan QC, Fu TY, Huang YS, Hu SL. (1991). An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China ? *J Infect Dis* 164 : 852-859.
- Herbold K., Flehmig B., Botzenhart K. (1989). Comparison of ozone inactivation, in flowing water, of hepatitis A virus, poliovirus 1, and indicator organisms. *Appl. Environ. microbiol.* 55 : 2949-2953.
- Hollinger FB. (1996). Comprehensive control (or elimination) of hepatitis B virus transmission in the United States. *Gut.*;38 Suppl 2:S24-30. Review.
- Hollinger et Ticehurst (1996). Hepatitis A virus. *Fields Virology*, 3rd edition, p 735 - 782.
- Hubert B, Bourderieux C, Dubois M, Marquis M. (1999). Épidémie d'hépatite A liée à la fréquentation d'une patageoire *BEH* n° 4.
- Hutin YJF, Pool V, Cramer EH, Nainan OV, Weth J, Williams IT, Golstein ST, Gensheimer KF, Bell BP, Shapiro CN, Alter MJ, Margolis HS, (1999). A multistate, foodborn outbreak of hepatitis A. National Hepatitis A investigation Team. *N engl J Med* . 340 : 595-602.
- Joussemet M, Depaquit J, Nicand E, MacNab C, Meynard JB, Teyssou R, Fabre G, Buisson Y. (1999). Effondrement de la séroprévalence de l'hépatite virale A chez les jeunes français. *Gastroenterol Clin. Biol.*, 23 : 447-452.

Koopmans M, von Bonsdorff C-H, Vinjé J, de Medici D, Monroe S. (2002). Foodborne viruses. FEMS Microbiol Reviews 26 : 187-205.

Koopmans M., Duizer E. (2004). Foodborne viruses : an emerging problem. International J. Food Microbiol. 90 : 23-41.

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

Le Guyader et al. (2000). Apports de la biologie moléculaire pour détecter les virus entériques humains dans les coquillages. Virologie, 4 : 241-247.

Li JW, Xin ZT, Wang XW, Zheng JL, Chao FH. (2002). Mechanisms of inactivation of hepatitis A virus by chlorine. Appl. Environ. Microbiol. 68 : 4951-4955.

Lu L., Ching KZ, Salet de Paula V, Nakano T Siegl G, Weitz M, Robertso BH. Characterization of the complete genomic sequence of genotype II hepatitis A virus (CF53/Berne isolate) (2004). J Gen. Virol. 85 : 2943-2952.

Metcalfe et al. (1995). Environmental virology : from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology – a trip of over 50 years. Annual Reviews of Microbiology, 49 : 461 -487.

Millard J, Appleton H, Parry JV. Studies on heat inactivation of hepatitis A virus with special reference to shellfish. Part 1. Procedures for infection and recovery of virus from laboratory-maintained cockles. Epidemiol Infect. 1987 Jun;98(3):397-414.

Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France. Rapport InVS. Juin 2003.

Nicand E (2000). Évolution de l'épidémiologie de l'hépatite A. Hépatites virales entérotransmissibles. Editions Elsevier, p33-44.

Nuanualsuwan S, Mariam T, Himathongkham S, Cliver DO (2002). Ultraviolet inactivation of feline calicivirus, human enteric viruses and coliphages. Photochemistry and photobiology. 76 : 406-410.

Rose and Sobsey (1993). Quantitative risk assessment for viral contamination of shellfish and coastal water. Journal of Food Protection, 56 : 1043-1050.

Schwartzbrod coordonnateur (1991). Virologie des milieux hydriques. Edité chez Tec & doc – Lavoisier.

Sobsey (1989). Inactivation of health-related microorganisms in water by disinfection processes. Water Science and Technologies, 21 : 179-195.

Sundkvist T, Hamilton G, Hourihan B, Hart J (2000). Outbreak of HAV spread by contaminated drinking glasses in a public house. Commun. Dis. Publ. Health, 3 : 60-62.

Wang S M, Liu CC, Huang YS, Yang YJ, Lei HY. Change in hepatitis A seroepidemiology in southern Taiwan : a large percentage of the population lack protective antibody. J Med Virol., 2001,64 : 104-108.

#### **Sites Internet :**

- Institut de Veille Sanitaire (France) : [www.invs.sante.fr](http://www.invs.sante.fr)
- Sentiweb (France) : [www.b3e.jussieu.fr](http://www.b3e.jussieu.fr)
- Eurosurveillance : [www.eurosurveillance.org](http://www.eurosurveillance.org)
- Institute of Food Science and Technology (Royaume-Uni) : [www.ifst.org](http://www.ifst.org)
- Center for Food Safety and Applied Nutrition (U.S.A.) : [www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov)
- Centers for Diseases Control and Prevention (U.S.A) : [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)

#### **Normes :**

- AFNOR XPT 90-451. (1996) Essais des Eaux - Recherche des entérovirus – Méthode par concentration sur laine de verre et détection par culture cellulaire.

#### **Réglementation**

- Décret no 99-363 du 6 mai 1999 fixant la liste des maladies faisant l'objet d'une transmission obligatoire de données individuelles à l'autorité sanitaire et modifiant le code de la santé publique. Journal Officiel de la République Française du 13 mai 1999.

- Décision du Conseil, du 29 avril 1999, relative aux laboratoires de référence pour le contrôle des contaminations bactériologiques et virales des mollusques bivalves. 1999/313/CE. Journal Officiel des Communautés Européennes du 8 mai 1999.
- Arrêté du 8 janvier 1998 fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles pris en application du décret n° 97-1133 du 8 décembre 1997 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées. Journal Officiel de la République Française du 31 janvier 1998.
- Arrêté du 13 août 1996 fixant les mesures techniques de prévention, notamment de confinement, à mettre en œuvre dans les industries et les laboratoires de recherche et d'enseignement ou les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes. Journal Officiel de la République Française du 7 septembre 1996.
- Arrêté du 18 juillet 1994 fixant la liste des agents biologiques pathogènes. Journal Officiel de la République Française du 30 juillet 1994.
- Décret n° 94-340 du 28 avril 1994 relatif aux conditions sanitaires de production et de mise sur le marché des coquillages vivants. Journal Officiel de la République Française du 30 avril 1994.
- Décret n° 89-3 du 3 janvier 1989 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine à l'exclusion des eaux minérales naturelles. Journal Officiel de la République Française du 4 avril 1989.

## 1. Agent infectieux

### 1.1. Nom scientifique

*Human hepatitis virus E.*

### 1.2. Acronyme

HEV.

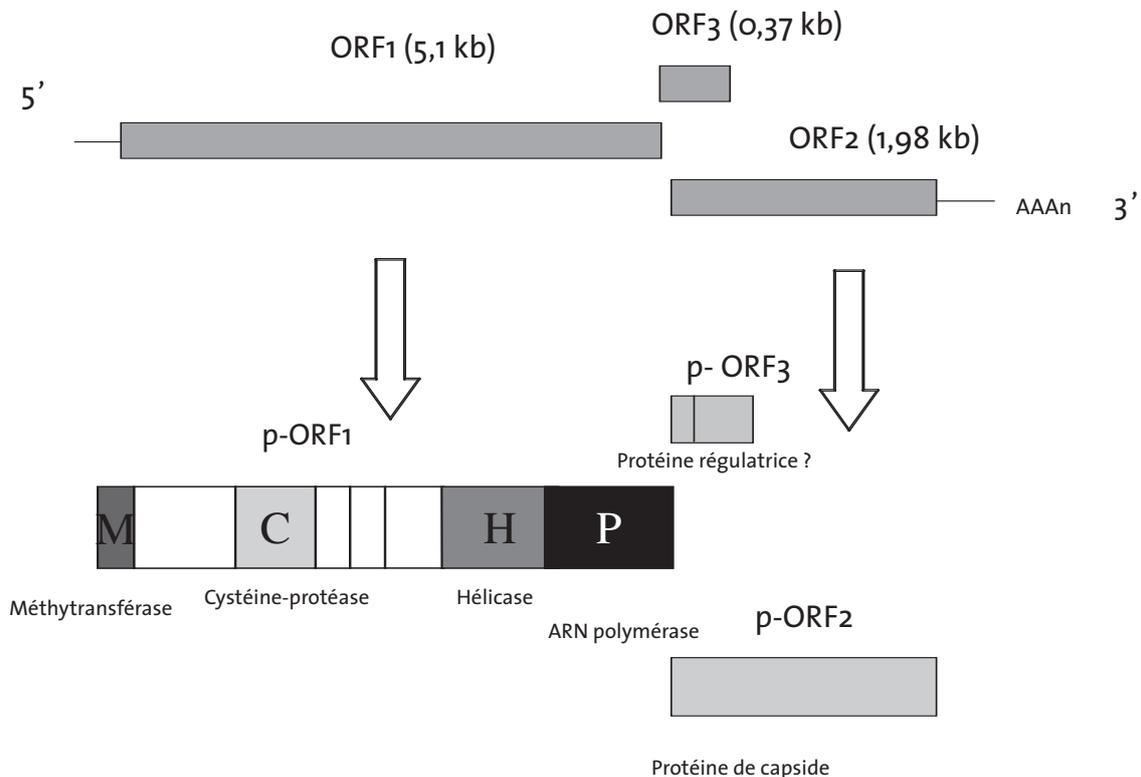
### 1.3. Nom usuel

Virus de l'hépatite E.

### 1.4. Caractéristiques

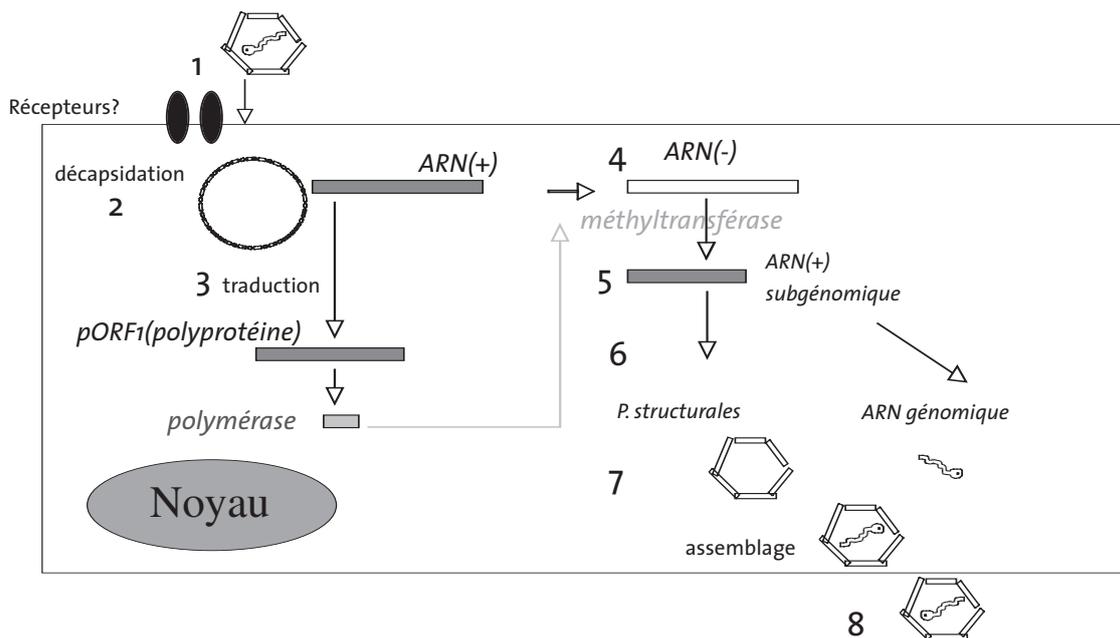
Depuis 2002, le virus de l'hépatite E est classé dans la famille des *Hepeviridae*, genre *Hepevirus* dont il est actuellement le seul représentant. Il s'agit d'un virus sphérique, non enveloppé de 27 à 33 nm de diamètre. Le génome à ARN monocaténaire à polarité positive d'une longueur approximative de 7,2 kb présente 3 cadres de lectures partiellement chevauchants encadrés à l'extrémité 5' d'une séquence non codante de 27 à 32 nucléotides et à l'extrémité 3' d'une séquence de 65 à 74 bases suivie par une extrémité polyadénylée de longueur variable selon les virus (Figure 2).

Figure 2 : organisation génomique du VHE et représentation schématique des polyprotéines p-ORF1, p-ORF2 et p-ORF3



L'ORF1 code une polyprotéine de 186 kDa, ultérieurement clivée en protéines non structurales dont une méthyl transférase démontrant que le virus est coiffé à son extrémité 5' et l'ARN polymérase ARN dépendante. L'ORF2 code la protéine de capside glycosylée (p-ORF2) de 660 aa qui présente plusieurs sites immunogènes dont un épitope immunodominant conformationnel entre les acides aminés 394 et 457 et un épitope neutralisant situé entre les acides aminés 452 et 617 (Meng *et al.* 2001). Expérimentalement, il a été démontré que les protéines obtenues à partir de p-ORF2 tronquée à son extrémité N terminale ont la capacité de former des particules pseudo-virales (VLPs) qui induisent de forts titres d'anticorps neutralisants et qui pourraient donc être une source antigénique pour un candidat vaccin. La phosphoprotéine d'un poids moléculaire de 13 kDa, codée par l'ORF3 est très variable selon les virus. Cette protéine dont le rôle reste à définir, serait impliquée dans les fonctions de régulation de la réplication virale ou dans l'assemblage de la nucléocapside (Figure 3).

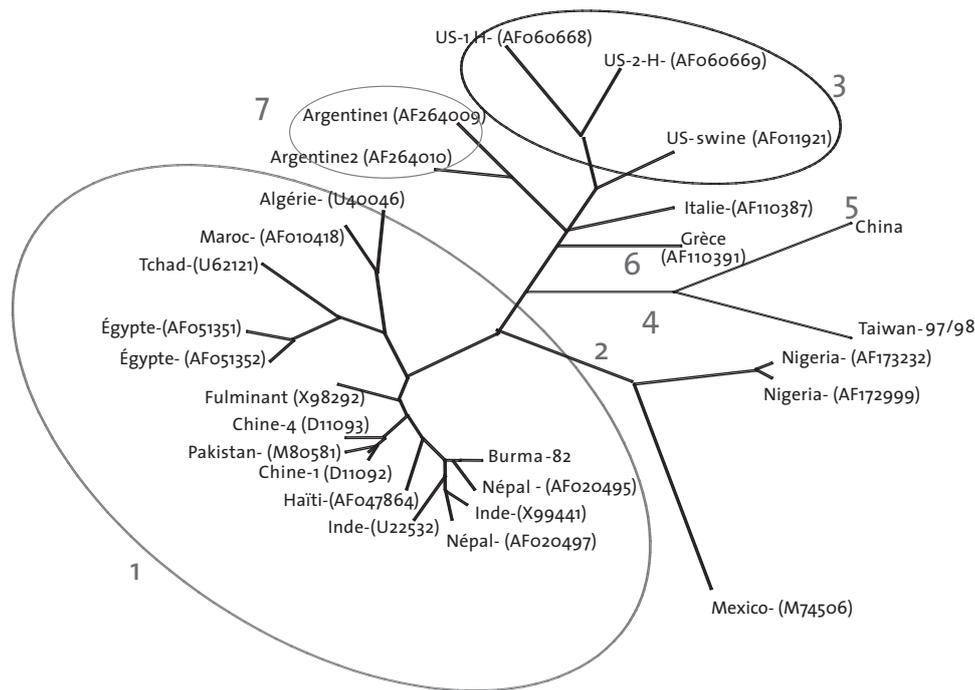
Figure 3 : réplication du VHE dans l'hépatocyte



- 1 : entrée dans l'hépatocyte ; 2 : décapsidation ; 3 : traduction de l'ORF1 ; 4 : synthèse de brin ARN négatif ;  
 5 : synthèse d'ARN positif subgénomique ; 6 : synthèse des protéines structurales ;  
 7 : assemblage du provirion ; 8 : relargage du virus à l'extérieur de l'hépatocyte.

La diversité génétique du VHE (Figure 4) fut très rapidement mise en évidence, dès l'identification des 2 premières souches prototypes, la souche *Burma* caractérisée en 1991, et la souche *Mexico*, identifiée un an plus tard, homologues à 75 % sur le plan nucléotidique et 86 % au niveau des séquences peptidiques codées par l'ORF2. Ces 2 souches ont ainsi permis de définir respectivement les génotypes 1 et 2. Actuellement 4 génotypes majeurs à 9 génotypes ont été caractérisés suivant les régions du génome séquencées (Schlauder et Mushahwar 2001). Les souches de génotype 3, identifiées à partir de cas autochtones dans les pays non endémiques pour le VHE démontrent une grande diversité génétique. Elles sont proches de souches d'origine porcine isolées dans la même région géographique que les souches humaines. Ainsi, les 2 premiers isolats humains de génotype 3 identifiés aux États-Unis partagent avec une souche porcine, 97 % d'identité avec la séquence peptidique codée par l'ORF2. De même, le génotype 4, identifié en Asie du Sud-Est (Chine, Inde, Japon, Indonésie) est proche sur le plan génétique de souches porcines, identiques de 82 à 90 % dans la région de l'ORF2 (Figure 2). Les autres génotypes ont une distribution géographique plus restreinte.

Figure 4 : diversité génétique du VHE



De plus, l'analyse moléculaire intra-patient de souches virales collectées au cours d'une même épidémie a démontré l'hétérogénéité de la population virale définissant ainsi des quasi-espèces. Cette distribution génétique a été récemment caractérisée pour d'autres virus à ARN responsables d'infections aiguës tels que les virus de l'hépatite A et de la dengue (Grandadam *et al.* 2004).

Enfin, plusieurs souches d'origine aviaire ont été caractérisées dans les élevages de poulets aux États-Unis. Les séquences nucléotidiques (ORF1) codant l'hélicase étaient identiques entre elles de 80 à 88 % (Huang *et al.* 2002) mais éloignées des souches humaines et porcines (51 à 61 % d'identité pour la région codant l'hélicase).

### 1.5. Maladie correspondante

Hépatite virale E.

## 2. Pouvoir pathogène

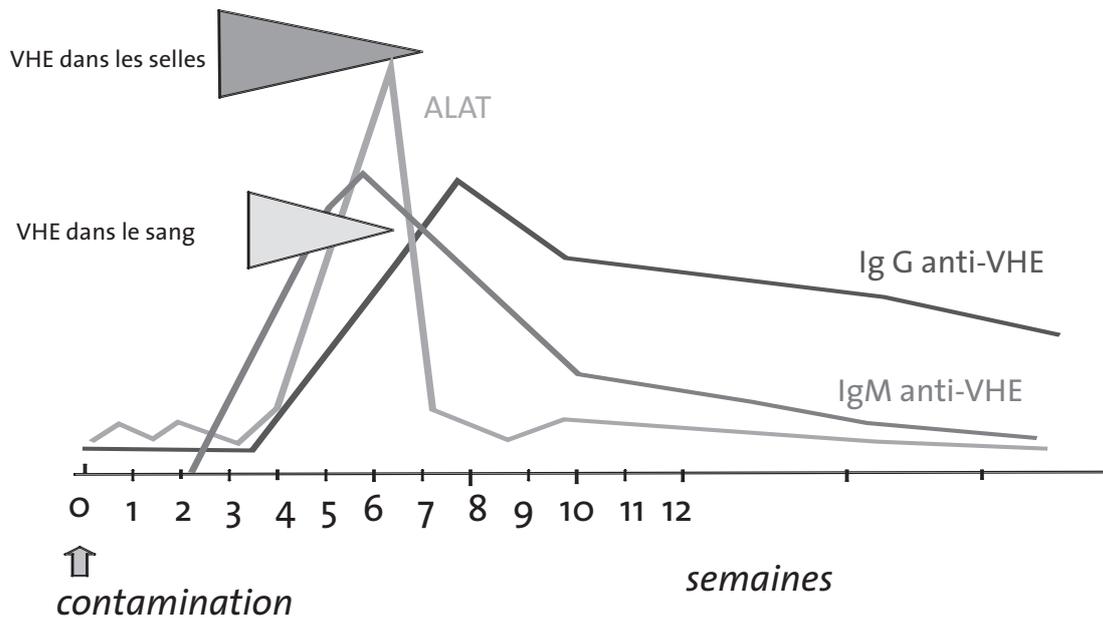
### 2.1. Physiopathologie

Le virus pénètre dans l'organisme par voie orale et gagne, par un mécanisme encore inconnu, le foie, où il se réplique dans le cytoplasme des hépatocytes. La cytolysse hépatique est marquée dès le début de la symptomatologie avec des taux d'alanine amino-transférase (ALAT) pouvant dépasser 2 000 UI/L. Le retour à des taux normaux sont observés dans un délai de 2 à 3 mois au cours de la phase de guérison.

La virémie est transitoire, précédant de quelques jours le début de la phase clinique jusqu'à 2 à 3 semaines après le début de la symptomatologie. Dans quelques cas, la virémie a pu être détectée pendant 4 à 5 semaines. Quant à l'excrétion du virus dans les selles, elle précède de 4 à 8 jours la phase ictérique et persiste pendant les 3 à 4 semaines suivantes avec une durée maximum de 50 jours démontrée au cours d'épisodes épidémiques. C'est durant cette période que le patient sera infectieux. Le titre viral dans les selles a été évalué par amplification génique à  $10^4$ - $10^8$ /g selles après inoculation expérimentale intraveineuse chez des chimpanzés (McCausland *et al.* 2000).

Quant à la réponse sérologique (Figure 5), les anticorps anti VHE de type Ig G et Ig M sont détectables dès le début de la symptomatologie avec un taux maximum au bout d'un mois pour décroître au bout de 2 à 6 mois pour les Ig M. Les Ig G persistent de 18 mois à plus de 10 ans suivant les réactifs utilisés (Nicand et Grandadam 2003).

Figure 5 : évolution des paramètres biologiques au cours de l'hépatite E



Par ailleurs, la réplication intra-hépatique du VHE n'est pas exclusive car d'autres sites de réplication ont été caractérisés par infection expérimentale de porcs, en particulier au niveau du tractus intestinal (intestin grêle, colon), et de tissus lymphatiques.

## 2.2. Dose infectieuse

La dose infectieuse a été déterminée expérimentalement à partir d'études conduites chez les primates (*Macaques cynomolgus*) et les porcs. Respectivement, l'inoculation intraveineuse de 100 particules virales pour les primates et  $10^{3.5}$  DI<sub>50</sub><sup>(1)</sup> chez les porcs est suffisante pour provoquer une infection (Williams *et al.* 2001).

## 2.3. Mode de contamination

Comme toutes les affections liées au péril fécal, le VHE est essentiellement transmis à l'homme par voie digestive par l'ingestion de particules infectieuses à partir de la contamination de l'environnement souillé par les matières fécales. C'est après la consommation d'eau souillée que la plupart des épidémies a été décrite dans les pays à faible niveau d'hygiène, telle que la première épidémie d'hépatite E décrite en 1955-1956 à New Delhi au cours de laquelle plus de 29 300 personnes ont été contaminées suite à la contamination fécale du système d'adduction d'eau potable par les crues de la rivière Yam unâ. En effet, durant la saison des pluies, une recrudescence des cas d'hépatites aiguës est observée dans les pays tropicaux par débordement des canalisations et court-circuit des réseaux d'approvisionnement d'eau propre et des structures d'assainissement des eaux usées. Les contaminations d'origine alimentaire sont plus rares (cas identifiés au Japon après la consommation de viandes crues de sangliers et de cervidés).

La contamination directe, par contact de personne à personne reste un mode de contamination accessoire avec un taux d'attaque secondaire de 0,7 à 2,2 % au sein des communautés familiales.

Dans les pays industrialisés, non endémiques pour le VHE, pour lesquels des cas autochtones d'hépatite E ont été diagnostiqués en dehors de tout séjour en zone d'endémie, le rôle potentiel des animaux domestiques comme réservoir de l'infection est suggéré par le fait que de nombreuses espèces animales sont sensibles à ce virus, en particulier les porcs (Clemente-Casares *et al.* 2003). En effet, les virus d'origine porcine sont proches sur le plan génétique des souches humaines.

(1) Dose provoquant l'apparition de l'infection dans 50 % des individus exposés.

D'autres voies de transmission ont été identifiées : la transmission verticale de la mère à l'enfant qui résulterait du passage transplacentaire du VHE, surtout au cours du 3<sup>e</sup> trimestre de la grossesse (Kumar *et al.* 2004) et la transmission parentérale, de rares cas de transmission du virus à partir de produits sanguins labiles ayant été décrits (Khuroo *et al.* 2004 ; Mitsui *et al.* 2004 ; Matsubayashi *et al.* 2004). En revanche, la transmission à partir d'autres liquides biologiques, en particulier le lait, n'a pas été rapportée.

## 2.4. Groupes à risque

Les facteurs de risque sont les séjours dans des conditions d'hygiène défavorables. Le risque d'hépatite fulminante a été observé lors de surinfection par un autre virus hépatotrope (VHB, VHC, ou VHA) ou quand l'infection survient chez un patient présentant une hépatopathie sous-jacente.

## 2.5. Période d'incubation

Période d'incubation de 3 à 5 semaines (40 jours environ).

## 2.6. Manifestations cliniques

Le VHE est responsable d'hépatites aiguës qui ne diffèrent pas sur le plan clinique des autres hépatites virales aiguës. La sévérité de l'infection est corrélée à l'âge du patient. Au cours de cas sporadiques, les formes les plus symptomatiques sont observées chez les adultes jeunes bien que toutes les classes d'âge soient atteintes.

Après la période d'incubation, la phase prodromique d'une durée de 10 jours maximum est caractérisée par un syndrome pseudo-grippal (fatigue, malaise, anorexie, fièvre à 38 - 39°C pour la majorité des cas). À la phase d'état, l'ictère est associé à des douleurs abdominales, une hépatomégalie, voire une splénomégalie. L'évolution est le plus souvent favorable dans un délai de 3 à 5 semaines. Un tableau de cholestase est observé dans 10 % des cas.

Les formes sévères avec des tableaux d'hépatite fulminante sont observées principalement au cours d'épisodes épidémiques avec une fréquence de 1 % dans la population générale pouvant atteindre 45 % chez les femmes enceintes. En effet, le VHE est le virus hépatotrope le plus à risque pour les femmes enceintes, la sévérité de l'infection étant maximum au cours du 3<sup>e</sup> trimestre de grossesse. Dans les zones endémiques, le taux de mortalité maternelle peut atteindre 30 % au cours de cette période avec un risque de transmission verticale *in utero* dans un tiers des cas et un taux de mortalité infantile de 10 à 15 % (Kumar *et al.* 2004). Les mécanismes restent mal élucidés (réponse immunitaire mal adaptée, modifications hormonales, malnutrition).

Par ailleurs, il a été démontré que la surinfection par le VHE de patients atteints d'hépatites chroniques est un facteur aggravant de la décompensation hépatique (Hamid *et al.* 2002). Mais dans aucun des cas, le VHE n'évolue vers une hépatite chronique. Dans quelques cas, des co-infections VHA-VHE ont été documentées.

## 3. Stratégies du diagnostic

Comme pour la plupart des virus hépatotropes, l'isolement du virus sur culture cellulaire n'est pas réalisé en pratique de routine.

### 3.1. Diagnostic chez l'homme

Chez l'homme, le diagnostic repose à la fois sur la détection du virus par amplification génique à partir d'échantillons de selles et de sérum, voire de bile ou de biopsie hépatique et sur la détection des anticorps anti VHE.

#### Détection de l'ARN du VHE

Le diagnostic actuel repose sur l'amplification du génome par RT-PCR, PCR nichée, ou PCR en temps réel en utilisant plusieurs couples d'amorces suivant les génotypes, à partir des régions les plus conservées du génome : ORF2, extrémité 5' de l'ORF1 codant la méthyltransférase, partie 3' de l'ORF1 codant l'ARN polymérase, région chevauchante ORF1-ORF2-ORF3. Plus récemment, des techniques de RT-PCR en temps réel utilisant des amorces consensus ont été développées (Jothikumar *et al.* 2006, Enouf *et al.* 2006). Avec un seuil de détection de 10 à 10<sup>3</sup> molécules de ADNc/réaction, suivant les techniques, l'excrétion virale dans les selles peut atteindre 10<sup>6</sup> molécules de ADNc. La caractérisation du génotype peut être réalisée dans un second temps par profil de restriction et séquençage.

Mais ces techniques sont actuellement pratiquées par un nombre restreint de laboratoires. Or, elles restent essentielles au diagnostic car il a été démontré lors de cas sporadiques survenant principalement dans des régions non endémiques pour le VHE, que la détection du virus par PCR peut être leur seul critère de diagnostic, en l'absence de détection des anticorps anti VHE, soit par manque de sensibilité des tests sérologiques soit par absence de réponse sérologique.

#### **Diagnostic sérologique spécifique**

Le principe des trousse immunoenzymatiques disponibles repose sur l'utilisation d'antigènes recombinants ou de peptides synthétiques codés par de courtes séquences d'ORF2 (positions 619 à 660) et d'ORF3 (positions 101 à 123), vis-à-vis des souches *Burma* et *Mexico*. Par ailleurs, un test immunochromatique sur bandelette dont la source antigénique est une séquence peptidique plus longue (positions 394 à 660), dérivée de la souche *Burma* a été utilisé en zone d'endémie lors d'investigation d'épidémies d'hépatites aiguës. Les performances de ces trousse, en terme de sensibilité varient de 50 à 75 % pour les Ig M et 85 à 95 % pour les Ig G. En l'absence de réponse immunitaire, la détection du génome viral dans le sérum et les selles est performante.

Dans les pays de forte endémicité, compte tenu de la séroprévalence anti VHE élevée, le diagnostic de certitude va reposer sur la détection des anticorps anti VHE de type Ig M. Or les performances de ces trousse restent insuffisantes, avec une sensibilité de 70 à 75 % des cas et une spécificité évaluée à 97 % suivant les panels de sérum testés (Lin *et al.* 2000).

### **3.2. Diagnostic dans l'environnement**

Le VHE a été détecté dans les boues résultant des étapes d'assainissement des eaux usées d'origines animale et humaine et dans l'eau de boisson. C'est ainsi que la mise en place d'un programme de surveillance de la qualité de l'eau de boisson à New Delhi a contribué à l'identification par méthode moléculaire du VHE. Mais cette technologie est parfois restreinte par la quantité d'eau nécessaire dans des régions où l'approvisionnement en eau potable est parfois difficile, avec des volumes de 10 à 500 litres suivant les protocoles. Cependant, l'amélioration des outils de diagnostic moléculaire avec une plus faible prise d'essai facilite actuellement la recherche plus systématique dans l'environnement. Mais les limites de ces techniques restent la présence d'inhibiteurs, relativement fréquents avec les matières organiques et le seuil de sensibilité de la technique, évalué de 15 à 1 000 copies/ADNc suivant les auteurs (Clemente-Casares *et al.* 2003 ; Jothikumar *et al.* 1995).

### **3.3. Diagnostic dans les aliments**

Non réalisé actuellement.

## **4. Épidémiologie et systèmes de surveillance**

### **4.1. Systèmes de surveillance**

**En France** : il n'y avait pas de surveillance particulière de l'hépatite E considérée jusqu'à peu comme une pathologie exotique d'importation. La création en 2002 du Centre National de Référence des virus des hépatites entérotransmissibles A et E (pour le VHE : service de Biologie, Hôpital d'Instruction des Armées Val de Grâce Paris) a contribué à identifier des cas d'hépatite E autochtones. Le foyer initialement identifié en Midi-Pyrénées géographiquement proche de l'Espagne où la circulation du virus a été clairement démontrée s'élargit progressivement à d'autres régions, en particulier côtières (région du pourtour méditerranéen). Ces données doivent inciter à évoquer l'hépatite E chez tout patient présentant une hépatite aiguë et pour lequel les marqueurs des autres virus hépatotropes sont négatifs. Par ailleurs, la recherche du virus chez les animaux et dans l'environnement doit être pratiquée.

**En Europe** : un réseau de plusieurs laboratoires assure la surveillance des virus transmissibles par voie alimentaire dont fait partie le VHE.

### **4.2. Statut épidémiologique et prévalence**

Le VHE est une des principales causes d'épidémies d'hépatites aiguës et de cas sporadiques dans de nombreuses régions du globe (Asie, Afrique, Amérique latine). Les études séro-épidémiologiques conduites dans la plupart des cas chez les donneurs de sang montrent que le niveau d'endémicité est corrélé au statut socio-économique avec une séroprévalence anti VHE variant de 10 à 50 % (Arankalle *et al.* 1995), suivant l'origine géographique des populations et leur âge. Dans les pays industrialisés, la séroprévalence est de 1 à 5 %, définissant ainsi des régions de faible niveau d'endémicité. En effet, la plupart des cas sporadiques d'hépatites E est rapportée après des voyages en zone d'endémie. Cependant des cas autochtones d'hépatites E ont été décrits en Amérique du Nord, en Europe en l'absence de tout séjour en zone d'endémie. La France ne fait pas exception avec la description de

cas autochtones dès 1996 (de Ledinghen *et al.* 1996 ; Mansuy *et al.* 2004 ; Coton *et al.* 2005 ; Nicand *et al.* 2004). L'analyse moléculaire de ces souches a montré leur divergence génétique par rapport aux souches isolées de régions endémiques. En effet, les virus isolés des pays industrialisés appartiennent en général au génotype 3 et sont très proches sur le plan génétique des souches porcines isolées dans les mêmes régions géographiques, alors que les isolats caractérisés dans les régions endémiques appartiennent aux génotypes 1, 2 et 4 (Schlauder *et al.* 1999).

## 5. Mode de dissémination

### 5.1. Réservoir

Dans les zones d'endémie, c'est l'homme malade et les jeunes enfants infectés qui constituent le réservoir principal.

### 5.2. Zoonose

Il est actuellement clairement démontré que l'hépatite E est une zoonose et que de nombreuses espèces animales domestiques et sauvages (porcs, sangliers, chèvres, moutons, cerfs, vaches, poulets, rats, chiens) sont infectées, dont certaines espèces constituent vraisemblablement le réservoir naturel du virus.

Des études expérimentales ont démontré la transmission inter-espèce du VHE par l'inoculation de souche humaine à des porcs et de souche porcine à des primates. Mais à ce jour, si une probable transmission à partir d'un réservoir animal (cerfs et sangliers) a été suggérée, aucun cas d'hépatite E après consommation de viande de porc n'a été rapporté.

### 5.3. Vecteurs

La transmission du VHE par des insectes coprophages ou piqueurs n'a jamais été signalée.

### 5.4. Mode de contamination des aliments et de l'eau

Dans les zones d'endémie, la source d'infection par le VHE est le plus souvent l'eau de boisson contaminée par des selles infectées suite à une contamination des ressources ou une pollution du réseau de distribution par des eaux usées. En France, les premières études conduites pour rechercher le VHE dans des extraits d'eaux usées montrent une circulation du virus mais ni la quantité de particules virales ni l'importance de la pollution n'ont été définies. Des études sur la prévalence du VHE dans différentes espèces animales, en particulier celles destinées à la consommation et dans l'environnement, sont absolument indispensables pour préciser l'origine des cas autochtones d'hépatite E. Ces derniers sont peut-être méconnus car non systématiquement recherchés par des techniques de diagnostic performantes.

## 6. Survie de l'agent infectieux

### 6.1. Sensibilité aux médicaments

Il n'existe pas à ce jour de traitement antiviral spécifique.

### 6.2. Sensibilité aux traitements de désinfection

En l'absence d'études spécifiques conduites *in vitro* et compte tenu des difficultés de réplication du virus sur cellules permissives, la résistance aux agents physiques ou chimiques a été déterminée par rapport à celles d'autres virus entériques notamment le virus de l'hépatite A. *In vitro*, il est sensible à la chaleur (autoclavage à 120°C pendant 20 minutes, chauffage à 100°C pendant 5 minutes), aux désinfectants chlorés à une concentration de chlore de 2 à 2,5 mg/L. Il est également inactivé par la  $\beta$  propiolactone. Le VHE semble moins résistant que le virus de l'hépatite A aux variations de température, privilégiant ainsi sa conservation à - 80°C. Cependant l'expérience a montré qu'il pouvait être détecté par amplification génique plus de 10 années après la collecte des échantillons conservés à - 20°C (Grandadam *et al.* 2004).

### 6.3. Survie dans l'environnement

Comme tous les virus entériques non enveloppés, le VHE est relativement résistant dans le milieu extérieur. Transmis par voie féco-orale, les particules virales sont capables de résister à l'acidité gastrique lors de leur ingestion et aux sels biliaires lors de leur excrétion, pouvant être ainsi détectées dans les eaux usées.

## **7. Dangers spécifiques liés à la manipulation pour le personnel de laboratoire et modalité de prévention**

### **7.1. Infections acquises au laboratoire**

Les risques de contamination lors de la manipulation de ce micro-organisme en laboratoire sont comparables à ceux des autres virus hépatotropes, le VHE étant difficilement cultivable *in vitro*.

### **7.2. Sources et échantillons**

Échantillons biologiques (essentiellement selles et sérum éventuellement).

### **7.3. Dangers primaires**

Ingestion de fèces, de suspension de selles et d'autres matières contaminées.

### **7.4. Classe de confinement**

Suivant la liste des agents biologiques pathogènes, le VHE est classé en groupe 3 mais avec un risque d'infection limité du fait de sa faible transmission par aérosol.

### **7.5. Précautions particulières**

Manipulation du matériel infecté sous poste de sécurité microbiologique de classe 2, port de vêtements de protection et de gants. Le personnel des animaleries doit porter gants et vêtements de protection et prendre les précautions appropriées pour éviter l'exposition par voie fécale-orale.

### **7.6. Déversements accidentels**

Laisser retomber les aérosols ; endosser des vêtements protecteurs, mettre des gants, couvrir soigneusement la substance déversée avec des serviettes de papier et appliquer de l'hypochlorite de sodium à 1 %, de la périphérie vers le centre, laisser agir pendant une période suffisante (30 min) avant de procéder au nettoyage.

### **7.7. Élimination**

L'élimination des déchets se fait en respectant le guide de bonne exécution des analyses et la filière des déchets d'activités de soins à risque infectieux.

### **7.8. Entreposage**

Comme pour tous les virus à ARN, les échantillons seront conservés de préférence à  $-80^{\circ}\text{C}$ , voire à des températures inférieures.

### **7.9. Évaluation de la viabilité**

La mise en culture du virus et l'inoculation à des animaux font référence. Cependant, il est impossible d'obtenir par ces techniques des résultats rapides et fiables pour des contaminations naturelles par un virus sauvage difficilement cultivable. Des alternatives consistent à montrer la présence à la fois de marqueurs antigéniques et génomiques qui caractérisent l'intégrité de la capsid et du génome et donc le potentiel infectieux du virus. Toutefois, la validation des études reste à faire.

## **8. Immunisation naturelle, vaccinale**

La persistance des anticorps anti VHE est variable suivant les tests pratiqués pour les détecter. Les Ig G anti VHE sont stables pendant près de 15 ans lors de l'utilisation de protéines recombinantes possédant l'épisode conformationnel. Les études de séroprévalence n'ont pas permis de déterminer la possibilité de réinfections chez des patients devenus séronégatifs.

### **8.1. Prophylaxie spécifique**

Il n'existe pas actuellement de vaccin chez l'homme.

Les essais vaccinaux conduits chez les Rhesus macaques reposent sur l'administration intraveineuse (IV) ou orale de la protéine de capsid de 56 kDa dérivée de la souche d'origine pakistanaise SAR-55 (génotype 1),

et obtenue par amputation à l'extrémité N terminale des 111 premiers acides aminés codés par l'ORF2. Après vaccination, les primates sont infectés par voie intraveineuse avec un virus de génotype 1, 2 ou 3. Les animaux sont protégés dans 70 à 80 % des cas suivant la dose vaccinale initiale, la souche utilisée lors du challenge (Li *et al.* 2004 ; Purcell *et al.* 2003).

## 8.2. Prophylaxie non spécifique

Les règles hygiéno-diététiques sont la base de la prévention non spécifique.

## 9. Modèles d'études expérimentaux

### 9.1. *In vitro*

Certaines souches de VHE ont été isolées et cultivées *in vitro* sur des lignées cellulaires continues, d'origine humaine, dérivées de poumon, rein, ou foie. Les trois ORFs ont été exprimés dans différents systèmes : *Escherichia coli*, Baculovirus et virus de la vaccine.

### 9.2. *In vivo*

La pathogénie du VHE a été étudiée tout d'abord grâce à des études conduites chez les primates puis chez les porcs. C'est ainsi qu'ont été élucidés le cycle de réplication intra et extra-hépatique du VHE, l'évolution des marqueurs biologiques spécifiques avec la durée d'élimination du virus dans les fèces.

## Références

- Arakalle VA, Tsarey SA, Chadha MS, Alling DW, Emerson SU, Banerjee K, Purcell RH. Age-specific prevalence of antibodies to hepatitis A and E viruses in Pune, India, 1982 and 1992. *J Infect Dis.* 1995 Feb;171(2):447-50.
- Clemente-Casares P, Pina S, Buti M, Jardi R, Martin M, Bofill-Mas S, Girones R. hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg Infect Dis* 2003; **9**: 448-454.
- Coton T, Delpy R, Hance P, Carre D, Guisset M. [Autochthonous hepatitis E virus in Southeastern France. 2 cases]. *Presse Med.* 2005 May 14;34(9):651-4.
- De Ledinghen V, Mannant PR, Barrioz T, Beauchant M. [Acute viral hepatitis E in the Poitou-Charentes region]. *Gastroenterol Clin Biol.* 1996 Mar;20(2):210. French.
- Enouf V, Dos Reis G, Guthmann JP, Guerin PJ, Caron M, Marechal V, Nicand E. Validation of single real-time TaqMan PCR assay for the detection and quantitation of four major genotypes of hepatitis E virus in clinical specimens. *J Med Virol.* 2006 Aug;78(8):1076-82.
- Grandadam M, Tebbal S, Caron M, Siriwardana M, Larouzé B, Koeck JL, Buisson Y, Enouf V, Nicand E. Evidence for hepatitis E virus quasispecies. *J Gen Virol* 2004; 85 pagination en cours.
- Hamid SS, Atiq M, Shehzad F, Yasmeen A, Nissa T, Salam A, Siddiqui A, Jafri W. Hepatitis E virus superinfection in patients with chronic liver disease. *Hepatology* 2002; **36**: 474-478.
- Huang FF, Haqshenas G, Shivaprasad HL, Guenette DK, Woolcock PR, Larsen CT, Pierson FW, Elvinger F, Toth TE, Meng XJ. Heterogeneity and seroprevalence of a newly identified avian hepatitis E virus from Chickens in the United States. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 4197-4202.
- Jothikumar N, Khanna P, Paulmurugan R, Kamatchiammal S, Padmanabhan. A simple device for the concentration and detection of enterovirus, hepatitis E virus and rotavirus from water samples by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Virol Meth* 1995; **55**: 401-415.
- Khuroo MS, Kamili S, Yattoo GN. Hepatitis E virus infection may be transmitted through blood transfusions in an endemic area. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; **19**: 778-784.

- Kumar A., Beniwal M, Kar P, Sharma JB, Murthy NS. Hepatitis E in pregnancy. *Int J Gynecol Obstet* 2004, **85**: 240-244.
- Li TC, Suzaki Y, Ami Y, Dhoke TN, Miyamura T, Takeda N. protection of cynomolgus monkeys against HEV infection by oral administration of recombinant hepatitis E virus-like particles. *Vaccine* 2004; **22**: 370-377.
- Lin CC, Wu JC, Chang TT, Chang WY, Yu ML, Tam AW, Wang SC, Huang YH, Chang FY, Lee SD. Diagnostic value of immunoglobulin G and M anti hepatitis E tests based on HEV RNA in an area where hepatitis E is not endemic. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 3915-3918.
- Mansuy JM, Peron JM, Abravanel F, Poirson H, Dubois M, Miedouge M, Vischi F, Alric L, Vinel JP, Izopet J. Hepatitis E in the south west of France in individuals who have never visited an endemic area. *J Med Virol.* 2004 Nov; **74**(3):419-24.
- Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, Sato S, Fukai K, Kato T, Takahashi K, Mishiro S, Imai M, Takeda N, Ikeda H. Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion.* 2004 Jun; **44**(6):934-40.
- McCaustland KA, Krawczynski K, Ebert JW, Balayan *et al.* Hepatitis E virus infection in chimpanzees: a retrospective analysis. *Arch Virol* 2000; **145**: 1909-1918.
- Meng J, Dai X, Chang JC, Lopareva E, Pillot J, Fields H, Khudyakov Y. identification and characterization of the neutralization epitopes of the hepatitis E virus. *Virology* 2001, **288**: 203-211.
- Mitsui T, Tsukamoto Y, Yamazaki C, Masuko K, Tsuda F, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. Prevalence of hepatitis E virus infection among hemodialysis patients in Japan: evidence for infection with a genotype 3 HEV by blood transfusion. *J Med Virol.* 2004 Dec; **74**(4):563-72.
- Nicand E, Caron M, Enouf V, Mansuy JM, Roque-Afonso AM, Scieux C, Hengy C, Maisonneuve L, Dussaix E. Bilan d'activité pour le virus de l'hépatite E du Centre national de référence des hépatites virales à transmission entérique. VI Journées Francophones de Virologie. *Virologie* 2004 ; **8** (numéro spécial) S30.
- Nicand E, Grandadam M. Virus de l'hépatite E. *Virologie* 2003 ; **7** : 87-96.
- Purcell RH, Nguyen H, Shapiro M, Engle RE, Govindarajan S, Blackwelder WC, Wong D, Prieels JP, Emerson SU. Pre-clinical immunogenicity and efficacy trial recombinant hepatitis E vaccine. *Vaccine* 2003; **21**: 2607-2615.
- Schlauder GG, Desai SM, Zanetti AR, Tassopoulos NC, Mushahwar IK. Novel hepatitis E virus isolates from Europe: evidence for additional genotypes of HEV. *J Med Virol* 1999; **57**:243-251.
- Schlauder GG, Mushahwar IK. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. *J Med Virol* 2001 ; **65** : 282-92.
- Virus Taxonomy, 7 th report 2002. Edited by MH van Regenmortel, CM Fauquet, DHL Bishop *et al.* Academic Press, San Diego, Wien New York.
- Williams TPE, Kasorndorkbua C, Halbur PG, Haqshenas G, Guenette DK, Toth TE, Meng XJ. Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 3040-3046.
- Zhuang H, Cao XY, Liu CB, Wang GM. (1991);Epidemiology of hepatitis E in China. *Gastroenterol Jpn* 26 (Suppl 3):135-8.

## 1. Agent infectieux

### 1.1. Nom scientifique

*Norovirus*.

### 1.2. Acronyme

NoV.

### 1.3. Nom usuel

Norovirus anciennement appelé « Winter vomiting disease », petits virus ronds non structurés (acronyme anglais = SRSV, pour « small round structured virus »), virus de type Norwalk (Norwalk-like).

### 1.4. Caractéristiques

Les NoV appartiennent à la famille des *Caliciviridae*, genre *Norovirus*.

**Capside** : le virion, dépourvu d'enveloppe, est constitué d'une capside de 30 à 34 nm de diamètre, de symétrie icosaédrique, formée de 90 dimères de la protéine VP1.

**Génome** : le génome viral est un ARN de 7,7 kb, linéaire, mono-caténaire, de polarité positive, qui comporte 3 cadres de lecture ouverts, et flanqué en 5' d'une petite protéine VPg intervenant dans l'initiation de la traduction, et en 3' d'une queue polyA.

Les trois cadres ouverts de lecture (ORF) codent respectivement :

- ORF 1: un précurseur polyprotéique, clivé en protéines non structurales dont la protéine p48, la NTPase, la protéine P22, la protéine VPg, la 3C cystéine protéase et la 3D ARN dépendante ARN polymérase ;
- ORF2: une protéine de 530 acides aminés (56,6 kDa) correspondant à la protéine de capsid VP1 ;
- ORF3: une petite protéine structurale mineure VP2, de 212 acides aminés (22.5 kDa), jouant un rôle sur l'expression et la stabilité de la protéine de capsid VP1 (Hardy 2005).

Les NoV sont caractérisés par une très grande variabilité génomique répartie en 5 génogroupes parmi lesquels seuls les génogroupes (gg) I et II concernent l'homme. A l'heure actuelle les 2 génogroupes humains comprennent 8 génotypes pour le ggl et 17 pour le ggII mais récemment 5 nouveaux génotypes ont été décrits dans le génogroupe I (Tableau 2). Les autres génogroupes concernent les bovins (gg III), les porcins (ggIV) et les murins (ggV).

### 1.5. Maladie correspondante

Ce virus est le principal agent de gastroentérite aiguë toutes classes d'âges confondues. Cette maladie est relativement bénigne, caractérisée par une apparition brutale de vomissement et/ou de diarrhée.

**Tableau 2 : souches de référence des Norovirus humains**

Génogroupe	Virus référence	Genbank no.	Génotype
GGI	Hu/NLV/Norwalk/8FIIa/1968/US	M87661	GI.1
	Hu/NLV/Southampton/1991/UK	Lo7418	GI.2
	Hu/NLV/Desert Shield 395/1990/SR	Uo4469	GI.3
	Hu/NLV/Chiba 407/1987/JP	ABO22679	GI.4
	Hu/NLV/Musgrove/1989/UK	AJ277614	GI.5
	Hu/NLV/Hesse/1997/DE	AF093797	GI.6
	Hu/NLV/Winchester/1994/UK	AJ277609	GI.7
GGII	Hu/NLV/Hawaii/1971/US	Uo7611	GII.1
	Hu/NLV/Snow mountain 1/1976/US	U75682	GII.2
	Hu/NLV/Toronto 24/1991/CA	Uo2030	GII.3
	Hu/NLV/Mexico/1989/MX	U22498	GII.3
	Hu/NLV/Lordsdale/1993/UK	X86557	GII.4
	HU/NLV/ Grimsby/1995/UK	AJ004864	GII.4
	Hu/NLV/White River/290/1994/US	AF414423	GII.5
	Hu/NLV/Baltimore/274/1993/US	AF414408	GII.6
	Hu/NLV/Leeds/1990/UK	AJ277608	GII.7
	Hu/NLV/Amsterdam/1998/NL	AF195848	GII.8
	Hu/NLV/Idaho Falls/378/1996/US	AY054299	GII.9
	Hu/NLV/Erfurt/546/2000/DE	AF427118	GII.10
Hu/NLV/Aichi 76-96/Chitta/1996/JP	ABO32758	GII.12	

## 2. Pouvoir pathogène

### 2.1. Physiopathologie

Le virus pénètre par voie orale majoritairement, traverse l'estomac où sa résistance au pH acide lui permet de résister et d'arriver dans l'intestin. Néanmoins, les connaissances sur la physiopathologie de ces virus sont limitées et essentiellement basées sur les études chez les volontaires (Graham *et al.* 1994, Hutson *et al.* 2004). Les biopsies intestinales prélevées chez ces derniers, suggèrent que la réplication interviendrait dans les entérocytes matures des villosités du petit intestin (duodenum et jejunum). Lors de pathologie, les villosités sont altérées, et une vacuolisation importante dans le cytoplasme des cellules épithéliales est observée (Hardy 1999; Green *et al.* 2001). L'utilisation de capsid recombinante (VLP) a permis de montrer une fixation sélective sur les cellules épithéliales de surface de la jonction gastro-duodénale humaine, préférentiellement sur les antigènes H type 1, Le<sup>b</sup> et dans une moindre mesure H type 3, mais les étapes de l'infection sont encore inconnues (Ruvoen-Clouet et Le Pendu 2004 ; Tan et Jiang 2005).

### 2.2. Dose infectieuse

La dose infectieuse précise n'est pas connue mais est vraisemblablement faible et variable selon les souches. On estime que moins de 10 virions sont nécessaires pour infecter un adulte sain (Moe *et al.* 1999).

### 2.3. Mode de contamination

L'excrétion fécale est élevée et varie environ de 10<sup>7</sup> à 10<sup>10</sup> particules/g de selles pendant environ 7 à 10 jours (Kageyama *et al.* 2003). Ces virus, très résistants, peuvent être transmis par plusieurs voies telles que la voie féco-orale, inter humaine, les aérosols, la nourriture et l'eau. La transmission de personnes à personnes constitue une voie majeure de transmission (la fréquence importante des vomissements et de l'aérosolisation des particules favorisant cette voie). Dans des communautés fermées, ces épidémies peuvent avoir des conséquences importantes sur le plan de

la santé humaine, mais aussi économique (ex : fermeture d'hôtel en Angleterre) ou diplomatique (ex : refus d'accostage de bateaux de croisière) (Hardy 1999 ; de Wit *et al.* 2003 ; Widdowson *et al.* 2005).

La transmission par ingestion d'eau ou d'aliments contaminés est également importante mais souvent difficile à évaluer. Les aliments peuvent être contaminés lors de leur production (par exemple framboises, coquillages) ou lors de leur transformation (Koopmans et Duizer 2004, Loisy *et al.* 2004). La présence de virus dans les fèces avant l'apparition ou après la disparition des signes cliniques est un facteur important à prendre en considération pour le secteur agroalimentaire. La transmission par voie parentérale ou voie sexuelle n'existe pas.

#### **2.4. Groupes à risque**

Les personnes stressées comme les troupes armées en mission semblent développer des pathologies plus graves (Hutson *et al.* 2004 ; Kohli *et al.* 2005). Les personnes immunodéprimées peuvent développer des gastroentérites chroniques avec excrétion du virus pendant des mois voire des années (Nilsson *et al.* 2003).

#### **2.5. Période d'incubation**

La période d'incubation varie de 24 à 48 heures, mais des délais plus courts de quelques heures ont été observés.

#### **2.6. Manifestations cliniques**

Les norovirus sont responsables de gastroentérites aiguës se présentant sous forme d'un début brutal de vomissement ou diarrhée ou les deux associés. Les symptômes les plus courants sont des nausées, vomissements, crampes abdominales et diarrhées. La symptomatologie dure environ 24 à 48 heures, mais peut parfois durer plusieurs jours. Les selles diarrhéiques sont typiquement liquides et ne présentent pas de sang, ni mucus ou leucocytes. La fièvre est rarement rapportée. Les symptômes semblent varier selon l'âge ou les souches virales avec des vomissements observés surtout chez les enfants et des diarrhées chez les adultes (Hardy 1999, Green *et al.* 2001).

La pathologie est relativement modérée et la majorité des personnes infectées guérit spontanément. Une réhydratation est parfois nécessaire chez les personnes âgées ou chez les immunodéprimés.

Cependant des données récentes suggèrent que des manifestations cliniques atypiques et des complications peuvent intervenir chez des personnes immunodéprimées ou affaiblies (Hutson *et al.* 2004). Ainsi, des cas de diarrhée chronique à NoV ont été observés chez des patients transplantés sous traitement immunosuppresseur (Kaufman *et al.* 2003, Nilsson *et al.* 2003). Des situations de stress particulières ont entraîné des symptômes plus sévères chez des adultes comme des raideurs de la nuque, ou une sensibilité à la lumière (Hutson *et al.* 2004).

Les études chez les volontaires ont montré que certains individus peuvent excréter du virus dans leurs selles, avec une augmentation d'anticorps spécifiques sans présenter de symptômes cliniques. Ces personnes peuvent, tout comme les malades, excréter du virus pendant 7 à 10 jours après l'exposition (Hutson *et al.* 2004).

#### **Critère de Kaplan**

La discrimination d'épidémie à NoV est souvent réalisée sur la base des critères suivants (Green *et al.* 2001) :

- pas de bactérie ou parasite détecté dans les échantillons cliniques ;
- vomissement observé dans plus de 50 % des cas ;
- durée moyenne de la symptomatologie de 12 à 60 heures ;
- durée moyenne d'incubation de 24 à 48 heures.

### **3. Stratégies du diagnostic**

Aucun système de multiplication *in vitro* n'a pu être développé à l'heure actuelle (Duizer *et al.* 2004). Cependant, après clonage dans un vecteur d'expression, la réplication de l'ARN viral et son encapsidation ont pu être observés (Asanaka *et al.* 2005).

#### **3.1. Diagnostic chez l'homme**

- Détection antigénique : L'existence d'épitopes communs a permis le développement de tests ELISA détectant la quasi majorité des souches circulantes et la mise sur le marché de kits présentant une bonne spécificité mais néanmoins une sensibilité inférieure aux méthodes moléculaires (Kohli *et al.* 2005).

- La détection génomique est le plus souvent réalisée après purification des acides nucléiques par des kits d'extraction (Vinje *et al.* 2004, Bon *et al.* 2004). Les principales amorces utilisées dans les différentes régions sont situées dans la région codant pour l'ARN polymérase ou dans la partie 5' de l'ORF2 codant pour la protéine de capsid (Atmar et Estes 2001, Vinje *et al.* 2003, 2004, Vennema *et al.* 2002). Si l'amplification de la région codant pour l'ARN polymérase est utile comme outil de diagnostic, son intérêt est limité en épidémiologie moléculaire en comparaison de la région située dans l'ORF2 (Atmar et Estes 2001, Vinje *et al.* 2004). En raison de la diversité des souches circulantes dans la population et pour confirmer les résultats obtenus par RT-PCR, la caractérisation des produits amplifiés est recommandée soit par la technique de RLB (Reverse Line Blotting) soit par HMA (Heteroduplex Mobility Assay) soit par séquençage (Vinje et koopmans 2000, Vinje *et al.* 2003 ; Mattick *et al.* 2000). Un kit commercial basé sur des amorces situées dans la polymérase permettant la détection de la majorité des souches de Norovirus et Sapovirus est maintenant disponible (Bon *et al.* 2004).
- Récemment l'analyse moléculaire de la région hautement conservée à l'extrémité 5' de l'ORF2 a permis la sélection d'amorces et de sondes pour la RT-PCR quantitative en temps réel (Kageyama *et al.* 2003 ; Loisy *et al.* 2004).
- La méthode NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) a récemment été proposée pour la détection des virus dans les selles (Moore *et al.* 2004).

### 3.2. Diagnostic dans l'environnement

Ces échantillons sont très résistants et persistent après rejet, entraînant la contamination de divers aliments (coquillages, eaux, fruits rouges) pouvant ensuite créer des infections alimentaires lors de leur consommation.

- Compte tenu du faible niveau de contamination, une étape de concentration des particules virales est nécessaire. Le plus souvent, une élution à pH basique ou une filtration pour l'eau sont proposées avant concentration par le polyéthylène glycol (PEG) ou par ultrafiltration (Loisy *et al.* 2004). La purification peut être améliorée par capture antigénique (Kobayashi *et al.* 2004) ou par capture spécifique de l'ARN (Loisy *et al.* 2000). Les méthodes d'extraction d'ARN proposées passent par des méthodes plus ou moins longues possédant plusieurs étapes de purification selon les matrices (Loisy *et al.* 2004). Pour les coquillages, la majorité des méthodes est basée sur l'analyse des tissus digestifs puis une concentration par le PEG (Le Guyader *et al.* 2000).
- L'ARN peut être extrait par le guanidium, la protéinase K ou un kit commercial (Sair *et al.* 2002 ; Loisy *et al.* 2004). La détection est ensuite réalisée par RT-PCR en utilisant les mêmes couples d'amorces que pour le diagnostic clinique (Atmar et Estes 2001). Cependant afin de préciser le typage des souches de NoVs, les critères de spécificité et de sensibilité étant indispensables, l'utilisation de plusieurs couples d'amorces est nécessaire (Atmar et Estes 2001; Le Guyader *et al.* 2004).
- Des techniques de RT-PCR en temps réel ont été développées pour les eaux (Laverick *et al.* 2004) et les coquillages (Nishida *et al.* 2003; Loisy *et al.* 2005).
- Différentes méthodes ont été appliquées sur des échantillons impliqués dans des épidémies et ont permis de mettre en évidence la souche épidémique dans du jambon (Schawb *et al.* 2000), des framboises (Gaulin *et al.* 1999, Le Guyader *et al.* 2004), du chou et des pâtes (Kobayashi *et al.* 2004), de l'eau (Hoebe *et al.* 2004), des huîtres (Shieh *et al.* 2003, Nishida *et al.* 2003, Le Guyader *et al.* 2003). Un tableau résume les différentes méthodes utilisées (Tableau 3).

### 3.3. Diagnostic dans les aliments

Les méthodes de diagnostic dans les aliments nécessitent l'utilisation de méthodes d'élution, de concentration et de purification des acides nucléiques qui sont propres à chaque matrice alimentaire. Ces méthodes sont présentées de façon synthétique dans les tableaux 3 et 4. Les méthodes d'amplification génomique (amorces et conditions de RT-PCR) qui suivent l'extraction des acides nucléiques sont identiques à celles précédemment décrites pour la détection des génomes de norovirus dans les selles ou l'environnement.

**Tableau 3 : résumé des différentes méthodes pour détecter les norovirus dans les aliments et dans les coquillages**

Aliment	Élution	Concentration	Purification AN	Réf
framboise	tamp*. Glycine-trisHCl	PEG	RNeasy Minikit	Dubois <i>et al.</i> 2002
framboise	PBS	ultracentrifugation	Tripure reagent	Ponka <i>et al.</i> 1999
framboise	tamp. Glycine PH9	PEG	ProtéinaseK, Phenol chloroforme	Le Guyader <i>et al.</i> 2004
framboise	Bicarbonate de sodium Cat-floc+ Pectinex	ultracentrifugation	QIAamp Viral RNA minikit	Rzezutka <i>et al.</i> 2005
laitue	tamp. Glycine,	PEG (2 fois)	QIAshredder+ trizol	Sair <i>et al.</i> 2002
laitue	PBS	PEG	Rneasy Plant kit	Le Guyader <i>et al.</i> 2004
choux, pâtes	PBS+ freon	Capture Ag	Trizol	Kobayashi <i>et al.</i> 2004
hamburger	tamp. Glycine +freon	PEG (2 fois)	QIashredder+ trizol	Sair <i>et al.</i> 2002
jambon	PBS	PEG	Trizol, phenol chloroforme	Schwab <i>et al.</i> 2000
distribution (2 000 l)	filtration, elution extrait bœuf	ultrafiltration	Trizol	Parishionkar <i>et al.</i> 2003
distribution (100 l)	Filtration, elution	ultrafiltration	SepaGeneRV-R (Tokyo)	Haramoto <i>et al.</i> 2004
distribution (0,5 l)	filtration, elution tamp glyc/ext. bœuf	ultrafiltration	Guanidium/silice	Nygaard <i>et al.</i> 2003
fontaine (100 ml)	ultrafiltration		Guanidium	Hoebe <i>et al.</i> 2004
eau (5 ml)	ultracentrifugation	capture ARN sur billes magnétiques	High-pure Viral RNA kit	Loisy <i>et al.</i> 2000

\* : tampon

grisé : échantillons impliqués dans une épidémie

**Tableau 4 : méthode utilisée pour la détection des virus dans les coquillages**

Coquillage	Élution	Concentration	Extraction ARN	Réf
huîtres tissus digestifs	Tp glycine pH9,	Ultracentrifugation	TRIzol	Myrmel <i>et al.</i> 2004
	chlorof/butanol, cat-floc	Ultracentrifugation, sucrose 30 %	QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen)	Nishida <i>et al.</i> 2003
	Tp glycine pH10	Ultracentrifugation	GITC et silice	Formiga-Cruz <i>et al.</i> 2002
	Tp glycine pH 9.5	PEG 8000, 16 %	Tri-Reagent (Sigma), + oligo dT15	Kingsley et Richards 2003
	Tp Glycine pH 7.5	Double PEG 6000, 12 %	QIAamp viral RNA mini kit	Beuret <i>et al.</i> 2003
	Tp Glycine pH 9, cat-floc	PEG 6000, 8 %	Prot. K, CTAB et precipit. éthanol	Le Guyader <i>et al.</i> 2000
	PBS, cat-floc	PEG 6000, 8 %	Prot. K, CTAB et precipit. éthanol	Atmar <i>et al.</i> 1995
huîtres coquillage entier	Adsorption acide, elution, Tp glycine pH7.6	Double PEG 8000, 8 %	QIAamp RNeasy kit	Shieh <i>et al.</i> 2003
	Adsorption acide, elution, Tp Glycine	Double PEG 8000, 8 %	GITC+ RNEasy mini kit	Mullendore <i>et al.</i> 2001
moules	Tp glycine pH9	PEG 16 %	Fast-Track kit (Invitrogen)	Di Pinto <i>et al.</i> 2003
	Ext. Bœuf pH 5.5, sonication	PEG 6000	GITC	Casas <i>et al.</i> 2001
	Tp glycine, pH 9.5	Double PEG 8000	Ultracentrifug. Chlorure Cesium	Croci <i>et al.</i> 2000
	Tp glycine pH10	Ultracentrifugation	GITC	Muniain-Mujika <i>et al.</i> 2003
coques	Ads. acide, Tp glycine pH9	Double PEG 8000	Nucleospin RNA kit	Sunen <i>et al.</i> 2004

## 4. Épidémiologie et systèmes de surveillance

### 4.1. Systèmes de surveillance

- **France** : ce n'est pas une maladie à déclaration obligatoire. Les gastroentérites (virales ou bactériennes) sont recensées par les médecins appartenant au réseau « Sentinelles ». Le Centre National de Référence des virus entériques (lab. Virologie, CHU de Dijon, Prof. P. Pothier) collecte les différentes informations d'épidémiologie moléculaire au niveau national. Le Laboratoire National de référence pour la Microbiologie des Coquillages (Ifremer, Nantes) collecte les informations liées à la consommation des coquillages.
- **Europe** : l'organisation est variable selon les pays et par exemple au Royaume Uni, un système de surveillance coordonné par le PHLS (Public Health Laboratory Service) a été établi depuis 1992. La Communauté européenne a financé un projet permettant la création d'un réseau de laboratoires pour la surveillance de ces virus et la création d'une banque de données d'épidémiologie moléculaire des souches détectées dans la population (Food Borne Virus in Europe, QLK1-CT-1999-00594), réseau perpétué dans le cadre du 6<sup>e</sup> PCRD (DIVINE, Priority area Health threats HT/2003, n° 790965) (Lopman *et al.* 2003). Le réseau des Laboratoires de Référence pour la Microbiologie des Coquillages a mis en place la collecte des données épidémiologiques liées à ces virus via le site web du Laboratoire Communautaire de Référence (LCR) (Weymouth, GB).
- **États-Unis** : la surveillance est effectuée par le CDC.

### 4.2. Statut épidémiologique et prévalence

Les Norovirus sont reconnus comme la cause majeure de gastroentérites virales toutes classes d'âge confondues. Les études de prévalence ont montré que l'acquisition des anticorps se fait dès le plus jeune âge et 50 % de la population ont des anticorps vers l'âge de 50 ans (Green *et al.* 2001). Au niveau mondial, les taux de prévalence dans la population générale varient de 11 % (Pays-Bas) à environ 20 % (France, Finlande, Japon, États-Unis) (Koopmans *et al.* 2002). Les infections à NoVs sont marquées par une saisonnalité hivernale, mais des pics épidémiques ponctuels au printemps et en été sont observés (De Witt *et al.* 2003). Le nombre particulièrement élevé de gastroentérites observées en Europe en 2002 a été relié à l'apparition d'un nouveau variant (Lopman *et al.* 2004).

Les études sur l'immunité sont parfois contradictoires, mais il est communément admis que si une immunité à court terme semble exister, l'immunité à long terme est inexistante. Les études sur volontaires réalisées aux États-Unis, ont montré que certains individus dépourvus d'anticorps développent une pathologie accompagnée d'une réponse anticorps, tandis que d'autres restent asymptomatiques, malgré une séroconversion et l'excrétion de virus. Enfin certains individus sont insensibles à l'infection et ne présentent aucun anticorps (Ruvoen-Clouet et Le Pendu 2004). La résistance aux infections à NoV est multifactorielle, et implique des facteurs génétiques particuliers. La fixation des NoV sur des glycanes des cellules digestives appartenant à la famille des groupes sanguins tissulaires (loci *ABO*, *FUT2* et *FUT3*) entraîne une corrélation entre l'expression génétiquement déterminée par un individu et sa sensibilité à une infection par les NoV (Hutson *et al.* 2004 ; Tan et Jiang 2005).

## 5. Mode de dissémination

### 5.1. Réservoir

L'homme est le seul agent de multiplication de ces virus.

### 5.2. Zoonose

La détection de Norovirus dans des fèces de veau, de porc ou autres espèces présentant ou non des symptômes de gastroentérites est fréquente (Wise *et al.* 2004). L'analyse moléculaire montre qu'ils forment leur propre génogroupe ou sous-groupe ; néanmoins, certaines souches montrent une similitude relativement importante avec les souches du génogroupe I, constituant selon certains auteurs un risque potentiel de zoonose tandis que d'autres excluent cette possibilité, soit par une différence trop importante des génomes, soit par une différence de récepteur qui pourrait constituer un marqueur d'espèce (Koopmans *et al.* 2002; Harrington *et al.* 2004). Cette question pose un important problème de santé publique auquel il est primordial de répondre.

### 5.3. Vecteurs

Aucun vecteur n'a été mis en évidence.

## 5.4. Mode de contamination des aliments et de l'eau

**Transmission par l'eau et les facteurs environnementaux :** après rejet dans le milieu extérieur, ils ne se multiplient pas mais vont s'agréger sur des particules organiques leur permettant de persister dans les rejets urbains et de résister aux traitements d'épuration (chlore, ozone, UV). Leur présence a ainsi été rapportée dans l'eau de boisson, les eaux usées et les eaux récréatives (Hoebe *et al.* 2004; Loisy *et al.* 2000; Haramoto *et al.* 2004).

**Transmission par les aliments :** la transmission de NoV par les aliments semble jouer un rôle majeur dans les épidémies. La contamination lors de la préparation des aliments a été démontrée, telle que la préparation de sandwich ou de salade (Koopmans et Duizer 2004). Au Canada et en Europe des framboises ou des laitues contaminées par l'eau d'irrigation ont provoqué des épidémies (Koopmans et Duizer 2004). Les coquillages, mollusques filtreurs, peuvent concentrer ces virus et constituer un risque sanitaire pour l'homme puisqu'ils sont le plus souvent consommés crus ou peu cuits (Lees 2000; Butt *et al.* 2004). Très peu de données sont disponibles sur la persistance de ces virus dans les aliments (Rzezutka et Cook 2004).

### Surveillance des aliments :

Comme pour les autres virus, il n'existe pas de système de surveillance ou de contrôle. Il est maintenant admis pour les coquillages que les indicateurs bactériens, même s'ils ne sont pas fiables, constituent le meilleur indice de contamination. La purification des coquillages potentiellement contaminés est encore à l'étude. Un groupe CEN/TAG4 a été constitué pour établir une méthode horizontale pour la détection des norovirus (et VHA) dans les aliments par RT-PCR en temps réel.

- **Système de surveillance des aliments en France :** si le NoV est responsable d'une toxi-infection alimentaire collective, la déclaration est obligatoire. Une enquête épidémiologique et vétérinaire est alors réalisée pour identifier les aliments responsables qui pourront être envoyés soit au LNR coquillages (IFREMER) pour les produits de la mer, soit au laboratoire de virologie des aliments (Afssa) pour tous les autres types d'aliments.
- **Système de surveillance des aliments en Europe :** à l'échelle européenne, les aliments impliqués dans des cas de gastroentérites et ayant été importés ou exportés font l'objet d'un bulletin d'alerte européenne.
- **Système de surveillance des aliments aux États-Unis :** le CDC et l'US-EPA (Environmental Protection Agency) collectent les données au niveau national.

## 6. Survie de l'agent infectieux

les NoVs sont particulièrement résistants aux variations de pH et à de nombreux produits chimiques. Ils restent infectieux après une exposition à pH 3 pendant 3h à température ambiante, une incubation à 60°C pendant 30 min, un traitement avec 20 % d'éther pendant 18 h à 4°C (Koopmans *et al.* 2003; Duizer *et al.* 2004).

### 6.1. Sensibilité aux médicaments

À ce jour aucun traitement spécifique n'a été mis au point.

### 6.2. Sensibilité aux traitements de désinfection

les NoV ne possédant pas d'enveloppe, sont très résistants aux agents physiques et chimiques qui favorisent leur dissémination dans l'environnement. Leur sensibilité ou résistance est très difficile à évaluer puisque ces virus ne peuvent pas être multipliés en culture de cellule.

- **Inactivation par les moyens chimiques** (Tableau 5) : les NoV sont très résistants aux pH acides (pH2, 30 min à 37°C) ou basiques (pH12, 30 min à 37°C).

**Tableau 5 : résistance des norovirus aux produits chimiques**

Paramètre	Souche	Traitement	Effet	Référence
Chlore	V. Norwalk	Chlore, 3,75 mg/l, 30 min 10 mg/l, 30 min monochloramine, 2 mg/l, pH8, 5°C, 3 h	5/8 malades 1/8 malade - 1 log - 2 log	Keswick <i>et al.</i> 1985 Shin et Sobsey 1993
	GII.4	6000 ppm, 10 min, 20°C	> 2 log	Duizer <i>et al.</i> 2004
	FCV	1000 ou 5000 ppm (eau de javel)	- 5 log	Doultree <i>et al.</i> 1999
	FCV	1 mg/l, 60 à 237 min	- 2 log	Thurston-Enriquez <i>et al.</i> 2003
	FCV	0,53 mg/l ClO <sub>2</sub> , pH8, 5°C 0,53 mg/l ClO <sub>2</sub> , pH6, 5°C	- 3,6 log (5 min) - 0,9 log (1 min)	Thurston-Enriquez <i>et al.</i> 2005
	FCV	0,5 mg /l chlore libre, pH6	- 3 log (5 min)	Tree <i>et al.</i> 2005
Alcool	FCV	Ethanol 80 %, 5 min.	> 4 log	Gehrke <i>et al.</i> 2004
		Propanol-1, 80 %, 5 min.	> 4 log	
		Propanol-2, 80 %, 5 min	- 2,4 log	
pH	v. Norwalk	pH 3, 3 h	persistance	Dolin <i>et al.</i> 1972
	CV félin	pH < 2 ou > 10	- 5 log	Duizer <i>et al.</i> 2004
	GII.4	pH 12, 30 min, 37°C	< 2 log	Duizer <i>et al.</i> 2004
	GII.3	pH 3,75, 4 semaines	persistance	Hewitt et Greening 2004
Ether	v. Norwalk	20 %, 18 h, 4°C	persistance	Dolin <i>et al.</i> 1972

• **Inactivation par les moyens physiques** (Tableau 6).

Les NoV sont résistants à la chaleur (37°C pendant 120 heures, ou 100°C pendant 1 min). De même il faut des doses d'UV supérieures à 10<sup>3</sup> mJ/cm<sup>2</sup> pour les inactiver (Duizer *et al.* 2004). Leur résistance aux radiations gamma font que les doses de 2 à 4 kGy souvent utilisées pour contrôler les bactéries dans l'industrie agroalimentaire pourraient ne pas être suffisantes (de Roda Husman *et al.* 2004).

**Tableau 6 : résistance des norovirus aux traitements physiques**

Paramètre	Souche	Traitement	Effet	Référence
Température	V. Norwalk CV félin	30 min/60°C	persistance	Dolin <i>et al.</i> 1972
		1 h/60°C	- 7,5 log	Doultree <i>et al.</i> 1999
		5 min/70°C	- 7,5 log	Slomka <i>et al.</i> 1998
		1 min/ébullition	- 7,5 log	Duizer <i>et al.</i> 2004
		60 jours/4°C	- 4 log	
		21 jours/Tamb. 1 jour/37°C	- 9 log - 3 log	
UV	FCV	47,85 mWs/cm <sup>2</sup> 34 mJ/cm <sup>2</sup> , 0°C	- 1 log - 3 log	Nuanalsuwan <i>et al.</i> 2003 Duizer <i>et al.</i> 2004
	GII.4	206 mJ/cm <sup>2</sup> , 0°C	< 1 log	Duizer <i>et al.</i> 2004
	FCV	120 J/cm <sup>2</sup> , Tamb	- 3 log	De Roda-Husman <i>et al.</i> 2004
	CaCV	200 j/cm <sup>2</sup> , Tamb	- 3 log	De Roda-Husman <i>et al.</i> 2004
Ozone	V. Norwalk	0,37 ml/l, pH7, 5°C	- 4 log	Shin et Sobsey 2003
Rayon gamma	FCV	200 Gy/s, Tamb	- 1,6 log	De Roda-Husman <i>et al.</i> 2004
	CaCV	200 Gy/s, Tamb	- 2,4 log	De Roda-Husman <i>et al.</i> 2004

### **6.3. Survie dans l'environnement**

Il existe très peu de données sur la persistance de ces virus en milieu extérieur. L'utilisation de calicivirus félin comme modèle montre une diminution de 1 à 3 log du titre infectieux dans une eau de mer respectivement à 4°C et 10°C en 40 jours. Le suivi sur site de coquillages ayant été impliqués dans une épidémie a montré la présence du virus pendant environ 1 mois (Le Guyader *et al.* 2003).

## **7. Dangers spécifiques liés à la manipulation pour le personnel de laboratoire et modalité de prévention**

### **7.1. Infections acquises au laboratoire**

Risque faible pour le personnel de laboratoire mais possible en raison du nombre élevé de particules dans les selles et du pouvoir infectieux du virus.

### **7.2. Sources et échantillons**

Fèces et vomissements humains, prélèvements de l'environnement, aliments.

### **7.3. Dangers primaires**

Contact avec matières biologiques contaminées. Le danger de l'exposition aux aérosols a été suspecté dans une épidémie (Marks *et al.* 2000).

### **7.4. Classe de confinement**

Niveau de confinement 2 (caractère explosif de certaines épidémies, de la grande infectivité et grande stabilité du virus).

### **7.5. Précautions particulières**

Travail du matériel infecté sous poste de sécurité microbiologique de classe 2, port de vêtements de protection (blouse) et de gants.

### **7.6. Déversements accidentels**

Laisser retomber les aérosols ; endosser des vêtements protecteurs, couvrir soigneusement la substance déversée avec des serviettes de papier et appliquer de l'hypochlorite de sodium à 1 %, de la périphérie vers le centre ; laisser agir pendant une période suffisante (30 min) avant de procéder au nettoyage.

### **7.7. Élimination**

Décontaminer la substance avant de l'éliminer ; stériliser par la vapeur, incinérer, désinfecter chimiquement.

### **7.8. Entreposage**

Dans des contenants scellés étanches et résistants, étiquetés de façon appropriée.

### **7.9. Évaluation de la viabilité**

Aucun test disponible à l'heure actuelle.

## **8. Immunisation naturelle, vaccinale**

Immunisation naturelle : il n'existe pas d'immunité à long terme.

### **8.1. Prophylaxie spécifique**

Pas de vaccin disponible à l'heure actuelle. Des recherches sont en cours sur le développement d'un vaccin comestible ou en utilisant des VLPs (Tacket *et al.* 2003). La mise en évidence récente de l'importance du domaine P2 dans la reconnaissance des glycanes, pourrait permettre d'envisager le développement d'un vaccin efficace

et permettre d'envisager de nouvelles stratégies pour le contrôle thérapeutique (Tan *et al.* 2003). Pour les nouveau-nés, l'addition de composés fucosylés du lait humain pourrait permettre de diminuer l'incidence des gastroentérites (Ruvoen-Clouet et Le Pendu 2004).

## 8.2. Prophylaxie non spécifique

La prévention des infections par les virus entériques comporte les mesures habituelles d'hygiène prises dans le cadre des infections à transmission fécale :

- chez l'homme : lavage des mains, des fruits et légumes ;
- aliments : éviter l'utilisation d'eaux contaminées pour arrosage, lavage des fruits et légumes, système d'alerte pour zone de production des coquillages ;
- dans les laboratoires : matériel à usage unique et destruction par moyen approprié du matériel susceptible d'être contaminé ;
- désinfection de toutes les surfaces par une solution de chlore de 5 à 10 %.

## 9. Modèles d'études expérimentaux

### 9.1. *In vitro*

À l'heure actuelle aucun modèle d'étude *in vivo* ou *in vitro* des norovirus murins n'est disponible. La majorité des données concernant ces virus a été acquise lors d'épidémies dans la population ou lors d'études chez les volontaires réalisées aux États-Unis.

Cependant le norovirus murin (MNV) est le premier norovirus à avoir été adapté à la culture cellulaire (Wobus *et al.* 2004) sur des cellules dérivées de macrophages (lignée RAW). Il constitue ainsi le substitut le plus intéressant en ce qui concerne l'étude des norovirus humains.

### 9.2. *In vivo*

Le norovirus murin peut être étudié *in vivo* en inoculation à des souris déficientes homozygotes pour le gène STAT1 intervenant dans la voie d'activation de l'interféron alpha et bêta (Karst *et al.* 2003).

## Références

Atmar R.L., Neill F.H., Romalde J.L., Le Guyader F., Woodley C.M., Metcalf T.G. Estes M.K. Detection of Norwalk virus and Hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995 ; 61 : 3014-3018.

Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of Noncultivable Gastroenteritis Viruses, the Human Caliciviruses. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14 : 15-37.

Asanaka M., Atmar R.L., Ruvo V. Crawford S, Neill F.H., Estes M.K Replication and packaging of Norwalk virus RNA in cultured mammalian cells. *PNAS*, 2005; 102: 10327-10332.

Beuret C, Baumgartner A, Schluep J. Virus-contaminated oysters: a three-month monitoring of oysters imported to Switzerland. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Apr;69(4):2292-7.

Bon F, Giraudon H, Sancey C, Barranger C, Joannes M, Pothier P, Kohli E. Development and evaluation of a new commercial test allowing the simultaneous detection of noroviruses and sapoviruses by reverse transcription-PCR and microplate hybridization. *J Clin Microbiol* 2004 ; 42 : 2218-20.

Butt AA., Aldridge KE., Sanders CV. Infections related to the ingestion of seafood. Part I: viral and bacterial infections. *The lancet Inf. Dis.* 2004; 4 : 201-212.

Casas N.,Sunen E. Detection of enterovirus and hepatitis A virus RNA in mussels (*Mytilus spp*) by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Appl. Microbiol.* 2001 ; 90 : 89-95.

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

De Roda Husman A-M, Bijkerk P., Lodder W., van der Berg H., Pribil W., Cabaj A., Gehringer P., Sommer R., Duizer E. Calicivirus inactivation by nonionizing (253.7 nanometer wavelength UV) and ionizing (gamma) radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70 : 5089-5093.

De Wit MAS., Koopmans MPG., van Duynhoven YTHP. Risk factors for Norovirus, Sapporo-like virus, and group A rotavirus gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9: 1563-1570.

Di Pinto A., Forte V.T., Tantillo G.M., Terio V., Buonavoglia C. Detection of hepatitis A virus in shellfish (*Mytilus galloprovincialis*) with RT-PCR. *J. Food Prot.* 2003 ; 66 : 1681-1685.

Dolin R., Blacklow N.R., Dupont H., Buscho R.F., *et al.* Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1972 ; 140 : 578-483.

Doultree J.C., Druce J.D., Birch C.J. *et al.* Inactivation of feline calicivirus , a norwalk virus surrogate. *J. Hosp. Inf.* 1999 ; 41 : 51-57.

Dubois E, Agier C, Traore O, Hennechart C, Merle G, Crucière C, Laveran H. Modified concentration method for the detection of enteric viruses on fruits and vegetables by reverse transcriptase-polymerase chain reaction or cell culture. *J Food Prot* 2002 ; 65 : 1962-5.

Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, Atmar RL, Koopmans MP, Estes MK. Laboratory effort to cultivate noroviruses. *J Gen Virol* 2004 ; 85 : 79-87.

Duizer E., Bijkerk P., Rockx B., de Groot A., Twisk F., Koopmans M. Inactivation of caliciviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70: 4538-4543.

Formiga-Cruz M., Tofino-Quesada G., Bofill-Mas S., Lees D.N., Henshilwood K., Allard A.K. *et al.* Distribution of human virus contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweden, and the United-Kingdom. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002 ; 68 : 5990-5998.

Gaulin C.D., Ramsay D., Cardinal P., D'Halevyn M-A. Epidemie de gastro-enterite d'origine virale associée à la consommation de framboises importées. *Can. J. Public Health* 1999 ; 90 : 37-40.

Gehrke C., Steinmann J., Goroncy-Bernes P. Inactivation of feline calicivirus, as surrogate of norovirus (formerly Norwalk-like viruses), by different types of alcohol *in vitro* and *in vivo*. *J. Hosp. Inf.* 2004 ; 56 : 49-55.

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

Green KY, Chanock RM, Kapikian AZ. Human caliciviruses. In Knipe DM, Howley PM, Griffin DE *et al.* eds. *Fields Virology*, 4th ed., New York : Raven Press, 2001 : 841-74.

Haramoto E, Katayama H, Ohgaki S. Detection of noroviruses in tap water in Japan by means of a new method for concentrating enteric viruses in large volumes of freshwater. *Appl Environ Microbiol* 2004 ; 70 : 2154-60.

Hardy ME. Norwalk and Norwalk-like viruses in epidemic gastroenteritis. *Clin. Lab. Med.* 1999; 19: 675-690.

Hardy ME. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett.* 2005 Dec 1;253(1):1-8. Epub 2005 Sep 6. Review.

Harrington PR, Vinje J, Moe CL, Baric RS. Norovirus capture with histo-blood antigens reveals novel virus-ligand interactions. *J Virol* 2004 ; 78 : 3035-45.

Hewitt J., Greening G.E. Survival and persistence of norovirus, hepatitis A virus, and feline calicivirus in marinated mussels. *J. Food Prot.* 2004 ; 67 : 1743-1750.

Hoebe CJ, Vennema H, de Roda Husman AM, van Duynhoven YT. Norovirus outbreak among primary schoolchildren who had played in a recreational water fountain. *J Infect Dis* 2004 ; 189 : 699-705.

Hutson AM, Atmar RL, Estes MK. Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends Microbiol* 2004 ; 12 : 279-87.

Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2003 ; 41: 1548-57.

- Karst SM, Wobus CE, Lay M, Davidson J, Virgin HW. STAT1-Dependent Innate Immunity to a Norwalk-Like Virus. *Science* 7 March 2003 ; 299 : 1575-1578.
- Kaufman SS, Chatterjee NK., Fuschino ME. *et al.* Calicivirus enteritis in an intestinal transplant recipient. *Am. J. Transp.* 2003; 3 : 764-768.
- Keswick B.H., Satterwhite T.K., Johnson P.C., *et al.* Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985 ; 50 : 261-264.
- Kingsley D.H., Richards G.P. Persistence of hepatitis A virus in oysters. *J. Food Prot.* 2003 ; 66 : 331-334.
- Kobayashi S, Natori K, Takeda N, Sakae K. Immunomagnetic capture RT-PCR for detection of norovirus from foods implicated in a foodborne outbreak. *Microbiol Immunol* 2004 ; 48: 201-4.
- Kohli E., Bon F., Ballay K. Pothier P. Les calicivirus humains, une cause majeure de gastro-entérites aiguës. *Virologie*, 2005; 9: 93-106.
- Koopmans M, von Bonsdorff CH, Vinje J, de Medici D, Monroe S. Foodborne viruses. *FEMS Microbiol Rev* 2002 ; 26 : 187-205.
- Koopmans M., Vennema H., Heersma H., van Strien E., van Duynhoven Y., Brown D., Reacher M., Lopman B. Early identification of common-source foodborne virus outbreaks in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9: 1136-1142
- Koopmans M, and Duizer E. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int J food Microbiol* 2004 ; 1 :23-41
- Laverick MA., Wyn-Jones AP., Carter MJ. Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Let. Appl. Microbiol.* 2004;
- Le Guyader F., Estes MK., Kopecka H., Le Cann P., Pommepuy M.. Apport de la biologie moléculaire pour détecter les virus entériques humains dans les coquillages. *Virologie* 2000; 4: 241-247.
- Le Guyader F, Mittelholzer C, Haugarreau L, Hedlund KO, Alsterlund R, Pommepuy M, Svensson L. Detection of Noroviruses in raspberries associated with a gastroenteritis outbreak. *Int J Food Microbiol* 2004; 97: 179-186.
- Le Guyader FS, Neill FH, Dubois E, Bon F, Loisy F, Kohli E, Pommepuy M, Atmar RL. A semiquantitative approach to estimate Norwalk-like virus contamination of oysters implicated in an outbreak. *Int J Food Microbiol* 2003 ; 87 : 107-12.
- Le Guyader FS, Schultz AC, Haugarreau L, Croci L, Maunula L, Duizer E, Lodder-Verschoor K, von Bonsdorff CK, Suffredini E, van der Poel WMM, Reymundo R, Koopmans M. Round-robin comparison of methods for the detection of human enteric viruses in lettuce. *J Food Prot* 2004; 67: 2315-2319.
- Lees D. Viruses and bivalve molluscs. *Int J Food Microbiol* 2000; 59: 81-116.
- Loisy F, Le Cann P, Pommepuy M, Le Guyader F. An improved method for the detection of Norwalk-like caliciviruses in environmental samples. *Lett Appl Microbiol* 2000 ; 31 : 411-5.
- Loisy F., Estes MK., Koopmans M., Le Guyader FS. Les norovirus : du nouveau? *Virologie*, 2004; 8:435-443.
- Loisy F, Atmar RL, Guillon P, Le Cann P, Pommepuy M, Le Guyader SF. Real-time RT-PCR for Norovirus screening in shellfish. *J Virol Meth.* 2005; 123 :1-7.
- Lopman BA., Reacher MH., Van Duynhoven Y., Hanon F-X., Brown D., Koopmans M. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9 : 90-96
- Lopman B, Vennema H, Kohli E, Pothier P, Sanchez A, Negredo A, Buesa J, Schreier E, Reacher M, Brown D, Gray J, Iturriza M, Gallimore C, Bottiger B, Hedlund K O, Torven M, von Bonsdorff C H, Maunula L, Poljsak Prijatelj M, Zimsek J, Reuter G, Szucs G, Melegh B, Svensson L, van Duynhoven Y, Koopmans M. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet* 2004 ; 363 : 682-8.
- Marks PJ, Vipond IB, Carlisle D, Deakin D, Fey RE., Caul E.O. Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiol. Infect.* 2000; 124 : 481-487.
- Mattick KL., Green J., Punia P., Belda FJ., Gallimore CI., Brown DWG. The heteroduplex mobility assay (HMA) as a pre-sequencing screen for Norwalk-like viruses. *J. Virol. Meth.* 2000; 87: 161-169.

- Moe CL, Sobsey MD, Stewart PW, Crawford-Brown D. Estimating the risk of human calicivirus infection from drinking water. First International Calicivirus Workshop, Atlanta, GA, March 1999.
- Moore C, Clark EM, Gallimore CI, Corden SA, Gray JJ, Westmoreland D. Évaluation of a broadly reactive nucleic acid based amplification assay for the detection of noroviruses in faecal material. *J Clin Virol* 2004 ; 29 : 290-6.
- Mullendore J., Sobsey M.D., Shieh Y.S.C. Improved method for the recovery of hepatitis A virus from oysters. *J. Virol. Meth.* 2001 ;94 : 25-35.
- Muniain-Mujika I., Calvo M., Lucena F., Girones R. Comparative analysis of viral pathogens and potential indicators in shellfish. *Int. J. Food Microbiol.* 2003 ; 83 : 75-85.
- Myrmel M., Berg E.M.M., Rimstad E., Grinde B. Detection of enteric viruses in shellfish from the Norwegian coast. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004 ; 70 : 2678-2684.
- Nilsson M, Hedlund KO, Thorhagen M, Larson G, Johansen K, Ekspong A, Svensson L. Evolution of human calicivirus RNA *in vivo*: accumulation of mutations in the protruding P2 domain of the capsid leads to structural changes and possibly a new phenotype. *J Virol* 2003 ; 77 : 13117-24.
- Nishida T, Kimura H, Saitoh M, Shinohara M, Kato M, Kukuda S, Munemura T, Mikati T, Kawamoto A, Akiyama M, kato Y, Nishi K, Kozawa K, Nishio O. Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters. *Appl Environ Microbiol* 2003 ; 69 : 5782-6.
- Nuanualsuwan S., Cliver D.O. Capsid functions of inactivated human picornaviruses and feline calicivirus. *Appl Environ Microbiol* 2003 ; 69 : 350-357.
- Nygard K, Torven M, Anker C, Knauth SB, Hedlund KO, Giesecke J, Andersson Y, Svensson L. Emerging genotype (GGIIB) of norovirus in drinking water, Sweden. *Emerg Infect Dis* 2003 ; 9 : 1548-52.
- Parshionkar S.U., William-True S., Fout G.S., Robbins D.E., Seys S.A., cassay J.D., Harris R. Waterborne outbreak of gastroenteritis associated with a norovirus. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003 ;69 : 5263-5268.
- Ponka A., Maunula L., Von Bonsdorff C.H., Lyytikainen O. An outbreak of calicivirus associated with consumption of frozen raspberries. *Epidemiol. Infect.* 1999 ; 123 : 469 –474.
- Rzezutka A., Cook N. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiol. Rev.* 2004; 28 : 441-453.
- Rzezutka A., Alotaibi M., D'Agostino M., Cook N. A centrifugation-based method for extraction of norovirus from raspberries. *J. Food Prot.* 2005; 68: 1923-1925.
- Ruvoen-Clouet N, Le Pendu J., Fixation des norovirus sur des glycannes : conséquences biologiques et perspectives prophylactiques. *Virologie* 2004 ; 8 : 425-434.
- Sair AI, D'Souza DH, Moe CL, Jaykus LA. Improved detection of human enteric viruses in foods by RT-PCR. *J Virol Meth* 2002 ; 100 : 57-69.
- Schwab KJ, Neill FH, Fankhauser RL, Daniels NA, Monroe SS, Bergmire-Sweat DA, Estes MK, Atmar RL. Development of methods to detect "Norwalk-like viruses" (NLVs) and hepatitis A virus in delicatessen foods: application to a food-borne NLV outbreak. *Appl Environ Microbiol* 2000 ; 66 : 213-8.
- Shieh YC, Baric RS, Woods JW, Calci KR. Molecular surveillance of enterovirus and norwalk-like virus in oysters relocated to a municipal-sewage-impacted gulf estuary. *Appl Environ Microbiol* 2003 ; 69 : 7130-6.
- Shin and Sobsey 1993.
- Shin G-A., Sobsey M.D. Reduction of Norwalk virus, poliovirus and bacteriophage MS2 by ozone disinfection of water. *Appl Environ Microbiol* 2003 ; 3973978.
- Slomka M.J., Appleton H. Feline calicivirus as a model system for heat inactivation studies of small roud structured viruses in shellfish. *Epidemiol. Infect.* 1998 ; 121 : 401407.
- Sunen E., Casa N., Moreno B., Zigorraga C. Comparison of two methods for the detection of hepatitis A in clam samples (Tapes spp.) by reverse transcription-nested PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 2004 ; 91 : 147-154.
- Tacket CO, Sztein MB, Losonsky GA, Wasserman SS, Estes MK. Humoral, mucosal, and cellular immune responses to oral Norwalk virus –like particles in volunteers. *Clin Immunol* 2003 ; 108 : 241-7.

- Tan M., Huang P., Meller J., Zhong W., Farkas T., X. Jiang. Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket. *J. Virol.* 2003 ; 77 : 12562-12571.
- Tan M. and Jiang X. Norovirus and its histo-blood group antigen receptors : an answer to a historical puzzle. *Trends in Microbiol.* 2005 ; 13 : 285-293.
- Thurston-Enriquez J.A., Haas C.N., Jacangelo J., Riley K., Gerba C.P. Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003 ; 69 : 577-582.
- Thurston-Enriquez J.A., Haas C.N., Jacangelo J., Gerba C.P. Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by chlorine dioxide. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005 ; 71 : 3100-3105.
- Tree J.A., Adams M.R., Lees D.N. Disinfection of feline calicivirus (a surrogate for norovirus) in wastewaters. *J. Appl. Microbiol.* 2005 ; 98 : 155-162.
- Vennema H., De Bruin E., Koopmans M. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J. Clin. Virol.* 2002; 25 : 233-235.
- Vinje J. and Koopmans M. Simultaneous detection and genotyping of norwalk-like viruses by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. *J Clin Microbiol* 2000 ; 38: 530-536.
- Vinje J, Raditijo A, Hamidjaja A, Sobsey MD. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J Virol Meth* 2004 ; 116 : 109-17.
- Vinje J, Vennema H, Maunula L, von Bonsdorff CH, Hoehne M, Schreier E, Richards A, Green J, Brown D, Beard SS, Monroe SS, de Bruin E, Svensson L, Koopmans MP. International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses. *J Clin Microbiol* 2003 ; 41 : 1423-33.
- Widdowson M-A., Sulka A., Bulens S.N., Beard R.S., *et al.* Norovirus and foodborne disease, United States, 1991-2000. *Emerg. Inf. Dis.* 2005; 11: 95-102.
- Wise AG, Monroe SS, Hanson LE, Grooms DL, Sockett D, Maes RK. Molecular characterization of noroviruses detected in diarrheic stools of Michigan dairy calves: circulation of two distinct subgroups. *Virus Res* 2004 ; 100 : 165-77.
- Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, Chang KO, Sosnovtsev SV, Belliot G, Krug A, Mackenzie JM, Green KY, Virgin HW. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol.* 2004 ; 2 (12) : e432.

## 1. Agent infectieux

### 1.1. Nom scientifique

*Sapovirus*.

### 1.2. Acronyme

SaV.

### 1.3. Nom usuel

Sapovirus, anciennement appelé sapporo-like virus ou calicivirus humains typiques.

### 1.4. Caractéristiques

Les SaV appartiennent à la famille des *Caliciviridae*.

**Capside** : le virion, dépourvu d'enveloppe, est constitué d'une capsid de 30 à 34 nm de diamètre, de symétrie icosaédrique, formée de 90 dimères de la protéine VP1. La forme typique de calicivirus avec l'apparence en Étoile de David les différencie des norovirus (Green *et al.* 2001).

**Génome** : le génome viral est un ARN de 7,7 kb, linéaire, mono-caténaire, de polarité positive, qui comporte deux cadres de lecture ouverts, et flanqué en 5' d'une petite protéine VPg intervenant dans l'initiation de la traduction, et en 3' d'une queue polyA.

Les deux cadres ouverts de lecture (ORF) codent respectivement :

- ORF 1 : un précurseur polyprotéique, clivé en protéines non structurales dont la protéine p48, la NTPase, la protéine P22, la protéine VPg, la 3C cystéine protéase, la 3D ARN dépendante ARN polymérase, et la protéine de capsid (561 aa) ;
- ORF2 : une petite protéine structurale mineure (165 aa).

Toutes les souches de sapovirus sauf la souche London/g2, contiennent un troisième ORF, localisé au niveau de la région 5' du gène de la capsid codant vraisemblablement une protéine fonctionnelle (Green *et al.* 2001).

Les SaV sont répartis en 5 génogroupes incluant 9 groupes génétiques. Quatre génogroupes concernent l'homme, et seul le génogroupe III (GIII) comprend des souches porcines (PEC) (Schuffenecker *et al.* 2001; Farkas *et al.* 2004).

### 1.5. Maladie correspondante

Ce virus est responsable de gastroentérites surtout chez les jeunes enfants et les personnes âgées. Leur impact est encore mal évalué.

## 2. Pouvoir pathogène

### 2.1. Physiopathologie

Comme pour les NoV, après pénétration par voie orale, le site de réplication est vraisemblablement dans l'intestin supérieur, avec une destruction des villosités intestinales. Chez les porcs infectés par la souche porcine de SaV, la muqueuse intestinale montre des images comparables à celles observées chez les volontaires humains infectés avec du virus de Norwalk (Green *et al.* 2001).

## 2.2. Dose infectieuse

La dose infectieuse précise n'est pas connue mais est vraisemblablement faible.

## 2.3. Mode de contamination

Comme pour les norovirus, l'excrétion fécale est sans doute élevée, mais *a priori* aucune concentration n'a été publiée à l'heure actuelle. Ces virus, très résistants, peuvent être transmis par plusieurs voies telles que la voie féco-orale, inter humaine, les aérosols, la nourriture et l'eau, mais il existe très peu de données. Le contact avec une personne contaminée constitue une voie majeure de transmission (de Wit *et al.* 2003).

## 2.4. Groupes à risque

Les jeunes enfants (< 3 ans) et les personnes âgées.

## 2.5. Période d'incubation

La période d'incubation varie de 24 à 48 h.

## 2.6. Manifestations cliniques

Les SaV sont principalement responsables de gastroentérites chez l'enfant, nécessitant rarement une hospitalisation ou même une consultation médicale. Des épidémies sont observées dans des institutions, crèches ou service de pédiatrie (Chiba *et al.* 2000, Okada *et al.* 2002; Farkas *et al.* 2004, Kohli *et al.* 2005).

## 3. Stratégies du diagnostic

Aucun système de multiplication *in vitro* n'a pu être développé à l'heure actuelle.

### 3.1. Diagnostic chez l'homme

- La détection génomique est le plus souvent réalisée après purification des acides nucléiques par des kits d'extraction comme pour les norovirus. Les principales amorces utilisées dans les différentes régions sont situées dans la région codant pour la RNA polymérase ou dans la partie 5' de l'ORF2 codant pour la protéine de capsid (Vinje *et al.* 2000, Atmar et Estes 2001; Okada *et al.* 2002).
- Un kit commercial basé sur des amorces situés dans la polymérase permettant la détection de la majorité des souches de Norovirus et Sapovirus est maintenant disponible (Bon *et al.* 2004).
- Le développement de kit ELISA est en cours (Hansman *et al.* 2005).

### 3.2. Diagnostic dans l'environnement

*A priori* les méthodes utilisées pour détecter les norovirus doivent être applicables pour détecter les sapovirus.

### 3.3. Diagnostic dans les aliments

/

## 4. Épidémiologie et systèmes de surveillance

### 4.1. Systèmes de surveillance

- **France** : Ce n'est pas une maladie à déclaration obligatoire. Les gastroentérites (virales ou bactériennes) sont recensées par les médecins appartenant au réseau « Sentinelles ». Le Centre National de Référence des virus entériques (lab. Virologie, CHU de Dijon, Prof. P. Pothier) collecte les différentes informations d'épidémiologie moléculaire au niveau national.
- **Europe** : mise en place d'une réseau européen dans le cadre d'un projet européen DIVINE (Koopmans, RIVM).
- **États-Unis** : la surveillance est effectuée par le CDC.

## 4.2. Statut épidémiologique et prévalence

Les études réalisées dans divers pays montrent une prévalence variant de 0,3 à 9 % (Green *et al.* 2001). Quelques études ponctuelles ont été réalisées dans certains pays. Ainsi, au Mexique ces virus représentent 40 % des diarrhées chez l'enfant de moins de deux ans (Farkas *et al.* 2000). Comme pour les norovirus, de nombreuses souches peuvent circuler au sein d'une même communauté (Farkas *et al.* 2004). Au Japon, une étude réalisée chez des enfants de moins de deux ans a montré que les SaV sont très largement présents, et vraisemblablement sous estimés faute de méthode de détection appropriée (Nakata *et al.* 2000). Aux Pays-Bas, 98 % des selles collectées chez des jeunes enfants étaient positives en SaV contre 57 % des selles collectées chez des personnes de plus de deux ans (Vinje *et al.* 2000). Lors d'un suivi pendant 3 ans d'une population au sud-ouest de l'Angleterre, 27 selles (parmi 20 000 analysées) ont été trouvées positives en SaV (Robinson *et al.* 2002). En France, entre 1998 et 2004, le CNR a détecté 7 souches de SaV chez des enfants âgés de 2 à 5 ans (Bon *et al.* 2005).

## 5. Mode de dissémination

### 5.1. Réservoir

L'homme est le seul agent de multiplication de ces virus.

### 5.2. Zoonose

Les porcs peuvent être infectés par des SaV (G III) mais aucune donnée n'existe sur le risque de zoonose. Les SaV sont plus proches génétiquement des calicivirus animaux que des souches humaines (Matson *et al.* 1995). De même, une étude récente montre des homologies structurales plus fortes entre les SaV et vesivirus qu'avec les NoV (Chen *et al.* 2004).

### 5.3. Vecteurs

Aucun vecteur n'a été mis en évidence.

### 5.4. Mode de contamination des aliments et de l'eau

*A priori*, au vu des communautés de structure entre les SaVs et les NoVs, leurs résistances doivent être similaires et les SaVs pourraient donc résister dans l'environnement.

- Transmission par les aliments : la transmission de SaV par les aliments est peu connue.
- Surveillance des aliments : comme pour les autres virus il n'existe pas de système de surveillance ou de contrôle.
- Système de surveillance en France : identique à celui mis en place pour les NoV.
- Système de surveillance en Europe : mise en place de la détection de ces virus dans le réseau d'alerte DIVINE (Koopmans, RIVM).
- Système de surveillance aux États-Unis : le CDC et l'US-EPA (Environmental Protection Agency) collectent les données au niveau national.

## 6. Survie de l'agent infectieux

### 6.1. Sensibilité aux médicaments

À ce jour aucun traitement spécifique n'a été mis au point.

### 6.2. Sensibilité aux traitements de désinfection

Les SaV ne possédant pas d'enveloppe, ils sont très résistants aux agents physiques et chimiques, ce qui favorise leur dissémination dans l'environnement. Leur sensibilité ou résistance est très difficile à évaluer puisque ces virus ne peuvent pas être multipliés en culture de cellule. Aucune donnée précise n'est disponible.

### 6.3. Survie dans l'environnement

Il existe très peu de données sur la persistance de ces virus en milieu extérieur mais leur homologie de structure avec les NoV permet vraisemblablement d'étendre les données obtenues pour ces derniers en attendant des études plus spécifiques.

## **7. Dangers spécifiques liés à la manipulation pour le personnel de laboratoire et modalité de prévention**

### **7.1. Infections acquises au laboratoire**

Risque faible pour le personnel de laboratoire mais possible en raison du nombre élevé de particules dans les selles et l'infectiosité du virus.

### **7.2. Sources et échantillons**

Fèces et vomissements humains, prélèvements de l'environnement, aliments.

### **7.3. Dangers primaires**

Contact avec matières biologiques contaminées.

### **7.4. Classe de confinement**

Niveau de confinement 2 (caractère explosif de certaines épidémies, la grande infectivité et grande stabilité du virus).

### **7.5. Précautions particulières**

Travail du matériel infecté sous poste de sécurité microbiologique de classe 2, port de vêtements de protection (blouse) et de gants.

### **7.6. Déversements accidentels**

Laisser retomber les aérosols ; endosser des vêtements protecteurs, couvrir soigneusement la substance déversée avec des serviettes de papier et appliquer de l'hypochlorite de sodium à 1 %, de la périphérie vers le centre ; laisser agir pendant une période suffisante (30 min) avant de procéder au nettoyage.

### **7.7. Élimination**

Décontaminer la substance avant de l'éliminer ; stériliser par la vapeur, incinérer, désinfecter chimiquement.

### **7.8. Entreposage**

Dans des contenants scellés étanches et résistants, étiquetés de façon appropriée.

### **7.9. Évaluation de la viabilité**

Aucun test disponible à l'heure actuelle.

## **8. Immunisation naturelle, vaccinale**

**Immunisation naturelle** : l'acquisition d'anticorps dès les deux premières années de la vie semble être protectrice même à l'âge adulte. Plus de 90 % des adultes possèdent des anticorps dirigés contre le virus sapporo (HuCV/Sa/82/1) (Numata *et al.* 1997). La protection de l'adulte semble être meilleure que celle observée pour les NoV, au regard du peu d'épidémies reportées à ces virus (Kohli *et al.* 2005).

**Vaccin** : aucun vaccin n'est disponible à ce jour.

### **8.1. Prophylaxie spécifique**

Pas de vaccin disponible à l'heure actuelle.

## 8.2. Prophylaxie non spécifique

La prévention des infections par les virus entériques comporte les mesures habituelles d'hygiène prises dans le cadre des infections à transmission fécale :

- chez l'homme : lavage des mains, des fruits et légumes ;
- aliments : éviter l'utilisation d'eaux contaminées pour arrosage, lavage des fruits et légumes, système d'alerte pour zone de production des coquillages ;
- dans les laboratoires : matériel à usage unique et destruction par moyen approprié du matériel susceptible d'être contaminé ;
- désinfection de toutes les surfaces par une solution de chlore de 5 à 10 %.

## 9. Modèles d'études expérimentaux

### 9.1. *In vitro*

À l'heure actuelle aucun modèle d'étude *in vitro* n'est disponible.

### 9.2. *In vivo*

À l'heure actuelle aucun modèle d'étude *in vivo* n'est disponible.

## Références

Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of Noncultivable Gastroenteritis Viruses, the Human Caliciviruses. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14 : 15-37.

Bon F, Giraudon H, Sancey C, Barranger C, Joannes M, Pothier P, Kohli E. Development and evaluation of a new commercial test allowing the simultaneous detection of noroviruses and sapoviruses by reverse transcription-PCR and microplate hybridization. *J Clin Microbiol* 2004 ; 42 : 2218-20.

Bon F, Ambert-balay K., Giraudon H., *et al.* Molecular epidemiology of caliciviruses detected in sporadic and outbreak cases of gastroenteritis in France from december 1998 to february 2004. *J. Clin. Microbiol* 2005 ; 43 : 4659-4664.

Chen R., Neill JD., Noel JS., Hutson AM., Glass RI, Estes MK, Prasad BVV. 2004. Inter- and intragenous structural variations in caliciviruses and their functional implications. *J. Virol.* 78: 6469-6479.

Chiba S., Nakata S., Numata-Kinoshita K., Honma S. 2000. Sapporo virus: history and recent findings. *J. Inf. Dis.* 181 (Suppl2): 303-308.

De Witt MAS., Koopmans MPG., van Duynhoven YTHP. Risk factors for Norovirus, Sapporo-like virus, and group A rotavirus gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9: 1563-1570.

Farkas T, Jiang X, Guerrero ML, Zhong W, Wilton N, Berke T, Matson DO, Pickering LK, Ruiz-Palacios G. Prevalence and genetic diversity of human caliciviruses (HuCVs) in Mexican children. *J Med Virol.* 2000 Oct;62(2):217-23.

Farkas T, Zhong WM, jing Y, Huang PW, Espinosa SM, Martinez N, Morrow AL,, Ruiz-Palacios GM, Pickering LK, Jiang X. Genetic diversity among sapoviruses. *Arch. Virol.* 2004; 149: 1309-1323.

Green KY, Chanock RM, Kapikian AZ. Human caliciviruses. In Knipe DM, Howley PM, Griffin DE *et al.* eds. *Fields Virology*, 4th ed., New York : Raven Press, 2001 : 841-74.

Hansman G.S., Guntapong R., Pongsuwanna Y., Natori K., Katayama K., Takeda N. development of an antigen ELISA to detect sapovirus in clinical stool specimens. *Arch. Virol.* 2005, on line.

Kohli E., Bon F., Ballay K. Pothier P. Les calicivirus humains, une cause majeure de gastro-entrites aigue. *Virologie*, 2005; 9: 93-106.

Matson D.O., Zhong W.M., Nakata S., Numata K., Jiang X., Pickering L.K., Chiba S., Estes M.K. Molecular characterization of a human calicivirus with sequence relationships closer to animal caliciviruses than other known human caliciviruses. *J. Med. virol.* 1995 ; 45 : 215-222.

Nakata S., Honma S., Kinoshita-Numata K., *et al.* Members of the family caliciviridae (Norwalk virus and Sapporo virus) are the most prevalent cause of gastroenteritis outbreaks among infants in Japan. *J. Infect. Dis.* 2000 ; 181 : 2029-2032.

Numata K, Hardy ME, Nakata S, Chiba S, Estes MK. 1997. Molecular characterization of morphologically typical human calicivirus Sapporo. *Arch. Virol.* 142: 1537-1552.

Noel JS, Liu BL, Humphrey CD, Rodriguez EM, Lambden PR, Clarke IN, Dwyer DM, Ando T, Glass RI, Monroe SS. Parkville virus: a novel genetic variant of human calicivirus in the Sapporo virus clade, associated with an outbreak of gastroenteritis in adults. *J. Med. Virol.* 1997; 52: 173-178.

Okada M, Shinozaki K, Ogawa T, Kaiho I. 2002. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of Sapporo-like viruses. *Arch. Virol.* 147: 1445-1451.

Robinson S., Clarke I.N., Vipond I.B., Caul E.O., Lambden P.R. Epidemiology of human sapporo-like caliciviruses in the south west of England : molecular characterisation of a genetically distinct isolate. *J. Med. Virol.* 2002 ; 67 : 282-288.

Schuffenecker I, Ando T, Thouvenot D, Lina B, Aymard M. 2001. Genetic classification of sapporo-like viruses. *Arch. Virol.* 146: 2115-2132.

Vinje J., Deijl H., van der Heide R , *et al.* Molecular detection and epidemiology of sapporo-like viruses. *J. Clin. Microbiol.* 2000 ; 38 : 530-536.

## 1. Agent infectieux

### 1.1. Nom scientifique

*Rotavirus*.

### 1.2. Acronyme

HRV (HRV-A : Human rotavirus A).

### 1.3. Nom usuel

Rotavirus.

### 1.4. Caractéristiques

#### • Classification

Les rotavirus appartiennent à la famille des *Reoviridae* et sont classés en groupes eux-mêmes divisés en sérotypes.

**On distingue 7 groupes (A à G)**, sans communauté antigénique ; ils sont définis par les caractéristiques de la protéine VP6. Seuls, les groupes A, B et C sont impliqués dans des infections humaines et animales et le groupe A (divisé lui-même en 2 sous-groupes) est responsable de la plupart des gastroentérites à rotavirus.

La différenciation en sérotypes implique les deux protéines externes, VP7 et VP4. On distingue ainsi, en fonction de la protéine :

**14 génotypes ou sérotypes G** définis par la séquence du gène 9 ou par la protéine VP7 ; 10 d'entre eux ont été déterminés sur des rotavirus isolés chez l'homme.

20 génotypes définis par l'analyse de la séquence du gène 4. A ce jour, seulement 12 ont été corrélés à un sérotype (sérotype P définis par la protéine VP4). Comme il n'y a pas de concordance entre génotypes et sérotypes, on écrit par convention le sérotype entre parenthèses (P) et le génotype entre crochets [P].

Les sérotypes sont définis par séroneutralisation, mais en pratique le « typage » repose sur les caractéristiques ou l'analyse de la séquence des gènes codant les protéines (segment 9 pour VP7 et 4 pour VP4).

#### • Caractéristiques

##### **Morphologie**

Les rotavirus sont des virus **non-enveloppés**, d'un diamètre d'environ 70 nm, dont la capsid a une **symétrie icosaédrique**. Ils sont constitués d'une triple capsid qui renferme le génome et les enzymes nécessaires à la production d'ARNm. Leur morphologie caractéristique, en forme de roue, les rend facilement reconnaissables en microscopie électronique par coloration négative et leur a donné ce nom.

##### **Génome**

Il est constitué de **11 segments d'ARN double brin** numérotés selon leur taille de 1 (3 302 paires de bases) à 11 (667 pb). Chacun de ces segments comprend une séquence non-codante aux extrémités 5' et 3' portant des signaux moléculaires « d'identification » entourant un gène monocistronique codant une protéine virale. Au total, **6 protéines structurales** (VP1 à 6) et **6 protéines non-structurales** (NSP1 à 6).

Le réassortiment de segments entre différentes souches d'un même groupe a été l'un des premiers outils pour l'identification des fonctions associées aux gènes viraux (ségrégation de segments associée à un phénotype). La capacité des gènes à réassortir entre différentes souches est par ailleurs actuellement exploitée pour la mise au point de vaccins.

##### **Structure de la capsid**

Trois types de particules peuvent être facilement distinguées par microscopie électronique : (1) la particule entière, lisse capsid à trois couches, infectieuse (en abrégé TLP pour Triple Layered Particle), (2) la particule à deux couches, d'aspect rugueux, dépourvue de la capsid externe, non infectieuse (en abrégé DLP pour Double Layered Particle) et (3) le core dépourvu de la couche intermédiaire.

La **capside externe** se compose de la protéine VP7 (260 trimères) ainsi que de la protéine VP4, qui forme des spicules s'étendant vers l'extérieur de la particule (60 dimères). La **capside intermédiaire** ou deuxième couche de la capsid du virion est constituée par la seule **protéine VP6** (260 trimères). Les deux couches externes de la capsid obéissent aussi à une symétrie icosaédrique (nombre de triangulation T=13). Le **core**, la couche la plus interne est constitué par la protéine **VP2** (60 dimères par virion) qui a une symétrie icosaédrique (nombre de triangulation T=1). Cette protéine entoure deux protéines minoritaires, **VP1** et **VP3** ainsi que le génome.

#### **Les protéines et caractères antigéniques.**

Les 11 segments du génome codent les **protéines structurales** (VP1 à VP7) et les protéines non structurales (NSP1 à NSP6).

Les **protéines structurales VP7** et **VP4** forment la couche externe et déterminent les **sérotypes G et P** du virus. La protéine **VP7** (masse moléculaire 38 kDa), codée par le segment 9, est une protéine glycosylée et est l'**antigène majeur de neutralisation**. La protéine VP7 détermine la spécificité de type G (G pour glycosylated protein). La détermination du type peut être réalisée par des méthodes immunologiques (sérotype) ou de biologie moléculaire (génotype). Les sérotypes (ou les génotypes) sont au nombre de 14, mais seulement 10 d'entre eux (G1 à G10) peuvent infecter l'homme.

La protéine **VP4** (88 kDa), codée par le segment 4, forme à la surface du virus 60 spicules ayant des fonctions importantes dans l'**attachement** du virus aux cellules, la **neutralisation** et la **virulence**. La protéine VP4 est clivée en 2 fragments, VP5\* (60 kDa) et VP8\* (28kDa) et ce clivage augmente la pénétration du virus dans les cellules. La protéine VP4 détermine la spécificité de type P (P pour protease cleaved protein). Neuf sérotypes P humains ont été caractérisés par des méthodes immunologiques, mais la comparaison moléculaire des séquences du gène 4 qui définit des génotypes a permis d'établir une autre classification. Le manque de concordance entre sérotypes et génotypes entraîne des difficultés de nomenclature. La majorité des souches humaines est de génotype P[8] et P[4] (respectivement sérotype 1A et 1B).

La **protéine VP6** (41 kDa) est codée par le segment 6. Elle est fortement immunogène et porte les **antigènes de groupe et de sous-groupe**. Elle est la protéine majeure du virion (51 % de la masse protéique virale) et, bien qu'elle n'ait pas de rôle enzymatique propre, elle est indispensable à l'activité transcriptase des particules virales.

La protéine majoritaire du core, **VP2** (94 kDa), et les deux protéines minoritaires, **VP1** (125 kDa) et **VP3** (88 kDa) sont respectivement codées par les segments 2, 1 et 3. La protéine VP2 fixe les acides nucléiques. Synthétisée isolément par recombinaison génétique, elle peut s'auto-assembler, s'associer avec des molécules de VP6 et former une pseudo-particule virale. La protéine VP1 a une activité **d'ARN polymérase**. La protéine VP3 a une activité guanylyl-transférase impliquée dans la formation de la coiffe à l'extrémité 5' des brins ARN+. Ces trois protéines du core permettent la **transcription** et la **réplication**.

**Les protéines non structurales**, NSP1 à NSP6, apparaissent durant le cycle de multiplication, elles ne sont pas présentes dans le virus mature. **NSP4** est une protéine glycosylée qui a un rôle important dans la maturation du virus et dans le mécanisme de la diarrhée comparable à celui d'une **entérotoxine** (Ball *et al.* 1996).

#### **Variabilité génétique et antigénique**

Les rotavirus présentent une grande diversité génétique et antigénique reflétant les différentes pressions et mécanismes orientant leur évolution. Les mécanismes génétiques à l'origine de cette diversité sont au nombre de trois : l'arrangement génétique, les mutations et les réassortiments.

L'arrangement génétique entraîne des modifications de la longueur des segments génomiques par association ou excision de fragments. En général ces modifications ne portent pas sur les Cadres Ouverts de Lecture (ORF) mais sur des régions non codantes et n'ont aucune répercussion sur les protéines virales.

Le taux de mutations est élevé pour les virus à génome ARN. Pour les rotavirus, le taux de mutations est approximativement de  $5 \times 10^5$  par nucléotide et par cycle de réplication (Blackhall *et al.* 1996). Ces mutations peuvent avoir une incidence sur la détermination du génotype et/ou le sérotype. Dans ce dernier cas, les modifications peuvent générer des mutants d'échappement voire l'émergence d'une nouvelle souche comme ce fut le cas en 1993 à Taiwan avec pour conséquence une épidémie causée par un rotavirus G2 muté (Zao *et al.* 1999).

La segmentation du génome et les infections mixtes permettent le réassortiment entre les génomes de différents rotavirus. Ces réassortiments s'effectuent entre génomes de rotavirus humains mais également entre génomes de différentes espèces, par exemple humaines et animales (voir ci-dessous). Ils sont à l'origine de l'émergence de nouveaux génotypes humains comme par exemple le rotavirus G9 qui est actuellement rencontré sur l'ensemble du globe.

### **1.5. Maladie correspondante**

Les rotavirus sont la cause principale des gastroentérites chez l'enfant. Dans les pays tempérés, ces infections évoluent par épidémies hivernales responsables d'un grand nombre d'hospitalisations. Dans les pays en voie de développement, ces infections sont très graves et responsables d'une mortalité élevée.

## 2. Pouvoir pathogène

### 2.1. Physiopathologie

#### • Les facteurs de virulence

Liés au virus : la virulence a été associée à plusieurs gènes ou protéines du rotavirus. Les plus importantes sont la protéine VP4 impliquée dans l'attachement et la pénétration du virus dans la cellule et la protéine non structurale NSP4 qui agit comme une entérotoxine.

Liés à l'hôte : l'âge, la majorité des infections survenant après 2 ans sont asymptomatiques. L'immunosuppression favorise l'apparition et la persistance des diarrhées.

#### • Tropisme et histopathologie

Les rotavirus se multiplient dans les entérocytes matures de l'intestin grêle. On observe une vacuolisation, une lyse puis une desquamation des entérocytes. Cette destruction cellulaire entraîne une atrophie des villosités. Cette diminution des cellules responsables de l'absorption s'accompagne d'une hypertrophie et d'une augmentation des cellules sécrétoires au niveau des cryptes. Ces lésions apparaissent 24 heures après l'infection et sont maximum jusqu'à la 72<sup>e</sup> heure.

#### • Mécanisme de la diarrhée

(Lundgren & Svensson 2001 ; Anderson et Weber 2004; Ramig 2004)

Les rotavirus infectent les entérocytes de l'intestin grêle et provoquent une diarrhée selon un mécanisme complexe et multifactoriel associant une **malabsorption** et une **composante sécrétoire**. L'infection virale, le virus lui-même et sa protéine NSP4 sont responsables, directement ou *via* un messenger, d'une activation du système nerveux entérique (SNE) et d'une augmentation du calcium intracellulaire ( $[Ca^{2+}]_i$ ) provoquant une succession d'événements conduisant à une fuite de chlore, une désorganisation de l'architecture de la cellule et à sa lyse.

La **malabsorption** touche essentiellement les entérocytes du sommet des villosités. Les entérocytes détruits sont remplacés par des cellules cryptiques immatures et les fonctions d'absorption des villosités s'en trouvent altérées (Davidson *et al.* 1977 ; Boshuizen *et al.* 2003). On distingue :

- **les altérations structurales de la surface d'absorption** liées à l'infection virale des entérocytes et leur lyse, entraînent une atrophie et une destruction des microvillosités conduisant à une diminution de l'absorption. Cependant, il y a une dissociation entre les lésions histologiques et l'apparition de la symptomatologie, ce qui suggère que ce phénomène de lyse cellulaire n'est probablement pas l'élément majeur de la diarrhée ;
- **les altérations fonctionnelles de la digestion** jouent certainement un rôle plus important. L'infection virale provoque une **diminution de l'activité enzymatique** au niveau de la bordure en brosse de la muqueuse (peptidase, **disaccharidases** : lactase, saccharase-isomaltase, maltase). Ces altérations s'accompagnent d'une **diminution de l'activité des systèmes de transport** : co-transport sodium-glucose (SGLT1) et sodium-leucine. Ces perturbations sont liées directement au virus et/ou à sa protéine NSP4. Il résulte de ces altérations fonctionnelles une absence de digestion des nutriments, une diminution de leur absorption et leur fermentation entraîne une augmentation de la pression osmotique intraluminaire et une diarrhée de type osmotique.

**Altération de la perméabilité paracellulaire** : Le virus et la protéine NSP4, directement ou *via* l'augmentation du calcium intracellulaire, désorganisent l'architecture cellulaire en agissant sur les protéines du cytosquelette (F-actine, villine et tubuline) et également en altérant les protéines associées aux jonctions serrées. Le résultat est une augmentation de la perméabilité transépithéliale aux macromolécules.

**Une ischémie** des villosités liée à la libération de substances vaso-actives réduisant la microcirculation intestinale pourrait altérer les fonctions des entérocytes sans provoquer leur lyse. Ce mécanisme, retrouvé uniquement dans le modèle murin, est discuté par certains auteurs.

**Une composante sécrétoire liée à l'entérotoxine du rotavirus, NSP4**, participe aux mécanismes de la diarrhée. Cette protéine se lie à un récepteur membranaire au niveau des cellules des cryptes qui par une cascade d'activation impliquant la phospholipase C puis l'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) induit une augmentation du calcium intracellulaire. Un des résultats est l'ouverture d'un canal chlore calcium dépendant (différent du CFTR) responsable d'une fuite d'ions Cl<sup>-</sup> et d'eau (Ball *et al.* 1996).

**Le système nerveux entérique (SNE)** est connu pour jouer un rôle important dans la diarrhée du choléra. Dans l'infection à rotavirus, l'activation du SNE pourrait être secondaire à (1) l'action de médiateurs libérés des myofibroblastes et des cellules inflammatoires lors de l'infection, (2) la sécrétion de peptides et d'amines à partir des cellules paracrines à la suite d'une augmentation intracellulaire de calcium (Lundgren *et al.* 2000). Ce mécanisme pourrait expliquer qu'un faible nombre d'entérocytes infectés au sommet des villosités peut entraîner une importante sécrétion d'eau et d'électrolytes.

## 2.2. Dose infectieuse

A partir des fèces, **1 particule sur 50 000 est capable d'infecter des cellules** de rein de singe en culture monocouche et après plusieurs passages, 1 particule sur 6 600 (Ward *et al.* 1984). A partir de ces données, **la dose infectieuse minimale a été évaluée chez l'homme (Ward *et al.* 1986) comme chez l'animal (Graham *et al.* 1987) à 1pfu<sup>(2)</sup>.**

## 2.3. Mode de contamination

L'excrétion fécale est estimée à **10<sup>11</sup> particules virales par gramme de selle** (Flewett et Woode 1978 ; Ansari *et al.* 1988 ; Ward *et al.* 1984). Le virus est éliminé en 5 à 12 jours, sauf chez les sujets immunodéprimés où l'excrétion virale est prolongée voire chronique.

Les rotavirus ont une transmission féco-orale. Une transmission aérienne est possible, notamment lors des vomissements. La résistance des rotavirus et les quantités importantes de virus excrétés facilitent la transmission de personne à personne, directement ou par l'intermédiaire des surfaces ou objets contaminés.

## 2.4. Groupes à risque

Il n'y a pas à proprement parler de groupe à risque, tous les individus peuvent être infectés par les rotavirus. Cependant, les enfants ont une infection symptomatique alors qu'elle est plutôt asymptomatique chez les adultes.

La morbidité et la mortalité de ces infections sont plus importantes dans les **pays en voie de développement**. Cette sévérité est liée à plusieurs facteurs, une moins bonne prise en charge médicale, mais également l'association fréquente d'une malnutrition et d'une infestation entérique bactérienne.

Chez les **immunodéprimés**, les infections à rotavirus sont prolongées. Elles se manifestent par une diarrhée fébrile prolongée ou simplement une **excrétion chronique du virus** dans les selles - six semaines à deux ans - avec une diarrhée intermittente.

## 2.5. Période d'incubation

Elle est en moyenne de 3 jours.

## 2.6. Manifestations cliniques

### • **Forme classique de l'enfant**

L'enfant présente, après une période d'incubation de 2 à 3 jours, une diarrhée d'allure variable allant de la simple selle molle à l'émission de liquide à peine teinté de matières fécales et dont l'abondance est facilement sous-estimée. Une teinte verdâtre des selles est classiquement retrouvée, ainsi qu'une odeur aigrelette bien connue des infirmières puéricultrices. Plus rarement peuvent apparaître quelques filets sanglants mêlés à la diarrhée aqueuse. L'intensité de la diarrhée est extrêmement variable puisque la fréquence d'émission des selles peut osciller de 1 à 2 selles par 24 heures jusqu'à 15 voire 20 selles par 24 heures. Le maximum de la diarrhée est atteint en 48 heures et les selles se normalisent spontanément en 5 à 8 jours.

D'autres signes digestifs peuvent être associés : **vomissements, ballonnement abdominal, douleurs abdominales**. Il est classique chez un nourrisson de plus de 1 an de voir apparaître des symptômes digestifs sans diarrhée (vomissements, ballonnement) avant la survenue de la débâcle fécale. La **température** est parfois élevée, mais le plus souvent inférieure à 38,5°C.

L'ensemble de ces signes cliniques est évocateur mais non spécifique d'une diarrhée aiguë d'origine virale. Cependant, la grande majorité des diarrhées d'origine bactérienne se distingue par l'émission de selles glaireuses, sanglantes dans un tableau souvent sévère avec altération de l'état général (fièvre, syndrome septicémique) et douleurs abdominales paroxystiques (Huet 2002 ; Staat *et al.* 2002 ; Zvidic *et al.* 2004).

Les infections chez les **nouveau-nés** sont particulières. Elles peuvent se présenter sous forme d'infections nosocomiales survenant de façon sporadique dans les maternités. Généralement, ces infections sont asymptomatiques ou modérées. Mais, rarement, des gastroentérites sévères peuvent survenir marquées par une déshydratation importante, des douleurs abdominales, il peut même s'agir d'une gastroentérite hémorragique. Exceptionnellement elles peuvent prendre la forme d'**entéocolites nécrosantes**, se compliquant parfois d'une perforation intestinale mortelle.

(2) PFU : Particles forming units - plage formant une unité (unité infectieuse).

L'infection à rotavirus reste le plus souvent localisée aux cellules de la muqueuse intestinale, elle peut cependant avoir une diffusion générale et quelques cas sévères ont été décrits.

Les manifestations extra digestives (hépatite, convulsions...) des infections à rotavirus sont exceptionnelles et font l'objet de controverses.

- **Signes extradiigestifs**

**Atteinte neurologique** : la littérature médicale est riche en description de localisations neurologiques associées à une gastroentérite d'origine virale. Ces observations concernent le plus souvent le rotavirus. On a ainsi décrit des convulsions fébriles (Pang *et al.* 1996), des convulsions bénignes sans fièvre (Imai *et al.* 1999 ; Abe *et al.* 2000 ; de Villiers *et al.* 2003), des encéphalites (Hongou *et al.* 1998 ; Yoshida *et al.* 1995), une exacerbation de l'association apnée-bradycardie chez les nouveau-nés (Riedel *et al.* 1996). Parfois ces localisations neurologiques ont été rapportées avec identification de l'ARN viral dans le liquide céphalorachidien. Des signes d'atteinte périphérique du système nerveux sont également colligés : syndrome de Guillain-Barré (Smeets *et al.* 2000), syndrome pseudo poliomyélitique (Chou *et al.* 1998). Enfin, plusieurs atteintes musculaires (myosites) sont décrites (Bonno *et al.* 1998).

**Atteinte abdominale** : pancréatite aiguë (De La Rubia *et al.* 1996).

**Atteinte cutanée** : syndrome de Gianotti-Crosti (Di Lernia 1998).

### 3. Stratégies du diagnostic

#### 3.1. Diagnostic chez l'homme

Le diagnostic d'une infection à rotavirus ne repose pas sur le classique isolement de virus sur culture de cellules, trop délicat, ni sur l'examen sérologique pour rechercher des anticorps spécifiques.

**L'examen par microscopie électronique** selon une technique de coloration négative a l'avantage de rechercher l'ensemble des virus responsables de gastroentérites, ceux-ci ayant une morphologie caractéristique (Flewett 1978 ; Rao 1995). Cependant, il s'agit d'une méthode peu sensible, coûteuse et fastidieuse, inadaptée au diagnostic de routine.

**La recherche des antigènes viraux**, directement dans les extraits de selles, est la technique de choix pour le diagnostic de routine. Les tests d'agglutination latex ou les tests immuno-chromatographie unitaires sont utilisables sans appareillage et donc accessibles à de nombreux laboratoires de routine.

**La recherche du génome viral** dans les selles après amplification spécifique d'un gène (**RT-PCR**) est une technique utilisée dans les investigations épidémiologiques notamment pour préciser le génotype du rotavirus.

#### 3.2. Diagnostic dans l'environnement

La RT-PCR est la technique de choix pour détecter les virus dans les aliments ou l'environnement : eau, aliments, coquillages, boues et produits d'épandage. La quantité de virus y est généralement faible et nécessite le prélèvement de grand volume et une étape préalable de concentration. Cette étape diffère selon la matrice d'origine et les prélèvements environnementaux posent d'importants problèmes liés la présence d'inhibiteurs qu'il est parfois difficile d'éliminer totalement.

#### 3.3. Analyse de la variabilité génétique

Le génotypage des rotavirus par RT-PCR vise à caractériser les gènes codant les deux protéines de capsid VP4 (génotypage P) et VP7 (génotypage G) qui portent les déterminants antigéniques de type. Le principe repose sur l'amplification spécifique des régions variables des gènes 4 ou 9 (Gentsch *et al.* 1992 ; Gouvea *et al.* 1990). Le génotypage se déroule en deux étapes : un ADN complémentaire des gènes 4 ou 9 est amplifié par RT-PCR grâce à deux amorces spécifiques de régions conservées localisées aux extrémités 3' et 5' du génome. Une PCR est ensuite effectuée sur les fragments amplifiés avec une amorce conservée et un mélange d'amorces spécifiques de type. Les fragments d'ADN obtenus ont une taille caractéristique et facilement identifiable sur gel d'agarose. Ainsi, pour le génotypage G, l'ADN complémentaire du gène 9 (VP7) est amplifié à l'aide d'un mélange comprenant une amorce conservée (RVG9) et plusieurs amorces spécifiques des types de rotavirus humains G1 à G4, G8 et G9, éventuellement G5 et G10. Les génotypes identifiés par cette technique sont superposables aux sérotypes déterminés à l'aide d'anticorps. Pour le génotypage P, l'ADN complémentaire du gène 4 (VP4) est amplifié à l'aide d'un mélange comprenant une amorce conservée (con3) et 4 amorces spécifiques des types de rotavirus humains P[4], P[6], P[8] et P[9]. Les génotypes identifiés par cette technique ne sont pas superposables aux sérotypes déterminés à l'aide d'anticorps.

L'électrophorétype du génome et l'analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP) permettent de différencier deux souches de même génotype. Pour la RFLP, les produits de PCR du gène 9 sont incubés séparément avec des enzymes de restriction. Après digestion, les profils de migration des produits sont analysés (Gouvea *et al.* 1993 ; Dubois *et al.* 1997 ; Das *et al.* 1993).

### 3.4. Diagnostic dans les aliments

La RT-PCR est la technique de choix pour détecter les virus dans les aliments. La quantité de virus y est généralement faible et nécessite le prélèvement de grand volume et une étape préalable de concentration. Cette étape diffère selon la matrice d'origine.

## 4. Épidémiologie et systèmes de surveillance

### 4.1. Systèmes de surveillance

**France** : les gastroentérites (virales ou bactériennes) sont recensées par les médecins appartenant au réseau « Sentinelle ». Leur déclaration n'est pas obligatoire. Les Directions Départementales des Actions Sanitaires et Sociales (DDASS) devraient être alertées lorsque surviennent en collectivité des cas groupés de gastroentérites afin d'entreprendre une enquête épidémiologique et virologique pour en déterminer l'origine et caractériser l'agent pathogène impliqué. L'enquête épidémiologique est conduite par l'InVS et leurs Cellules d'Intervention Régionale en Épidémiologie. Les investigations virologiques sont faites par les Centres Nationaux de Référence. Le Centre National de Référence des virus entériques (Laboratoire de virologie, CHU de Dijon) caractérise les virus impliqués dans les épidémies de gastroentérite, notamment les rotavirus. Par ailleurs, il collecte différentes informations d'épidémiologie moléculaire de façon à connaître la répartition des différents génotypes circulants en France. Le Laboratoire National de Référence pour la Microbiologie des Coquillages (IFREMER, Nantes) collecte les informations liées à la consommation des coquillages et conduits des études d'épidémiologie moléculaire pour détecter et caractériser les virus polluant l'environnement marin.

**Europe** : l'organisation est variable selon les pays. L'Union européenne finance un réseau de laboratoires pour la surveillance des virus entériques, dont les rotavirus. Ce réseau représente 11 pays européens. Une surveillance moléculaire des souches de rotavirus est organisée de façon à connaître précisément la répartition moléculaire des souches de rotavirus et d'en suivre l'évolution durant la vaccination.

**Afrique** : la surveillance est assurée par le réseau African Rotavirus Network.

**États-Unis** : la surveillance est effectuée par le CDC d'Atlanta dans le cadre d'un réseau : National Rotavirus Strain Surveillance Program.

**Australie** : la surveillance est assurée par le réseau Australian Rotavirus Surveillance Program.

**Asie** : la surveillance est assurée par le réseau Asian Rotavirus Surveillance.

Surveillance des aliments : il n'existe pas de système spécifique de système de contrôle de la contamination des aliments par les rotavirus. Le plus souvent le contrôle est indirect en utilisant des critères bactériologiques ou des phages.

### 4.2. Statut épidémiologique et prévalence

Les rotavirus sont responsables d'épidémies survenant chaque hiver et sont la principale cause de gastroentérites chez l'enfant de moins de 5 ans. Plus de 50 % des gastroentérites hospitalisées sont dues au rotavirus et semblent être responsables des diarrhées les plus sévères.

## 5. Mode de dissémination

### 5.1. Réservoir

**L'homme** est le réservoir des rotavirus humains. Il contamine son environnement et le virus est présent en quantité importante dans l'environnement et les eaux usées (Dubois *et al.* 1997).

**Les animaux** sont les réservoirs de leurs rotavirus spécifiques. La contamination de l'environnement humain est un facteur permettant leur transmission à l'homme. Il existe de nombreuses données montrant la fragilité de la barrière d'espèce.

Les coquillages, notamment les huîtres, filtrent un important volume d'eau et ainsi peuvent concentrer les particules virales qui y sont présentes, mais ils ne permettent pas la multiplication du virus (Le Guyader *et al.* 1994 ; 2000). Les coquillages peuvent être à l'origine de contaminations humaines mais ne sont pas un réservoir des rotavirus.

## 5.2. Zoonose

Les rotavirus peuvent infecter de nombreuses espèces. En général, cette infection sera la cause d'une diarrhée chez les nourrissons et les jeunes animaux (veaux, porcelets et poulains) ; au contraire, chez les félins et canins les rotavirus sont le plus souvent responsables d'une infection asymptomatique ou d'une diarrhée modérée. Les rotavirus semblent aussi spécifiques de leur espèce d'origine avec des caractéristiques moléculaires qui permettent de reconnaître leur origine. En réalité, si certains rotavirus semblent associés à une espèce, il existe des arguments expérimentaux et épidémiologiques en faveur d'une transmission inter espèce (pour revue Theil 1990 ; Cook *et al.* 2004). Il est en effet possible d'infecter expérimentalement un animal avec une souche hétérologue. Cela a été montré pour de nombreuses espèces dont le porc qui peut être infecté par la souche humaine Wa et la souche bovine PP-1 (Hall *et al.* 1976 ; Bridger et Brown 1984 ; El-Attar *et al.* 2001). Par ailleurs, les caractérisations moléculaires des gènes et leur analyse phylogénétique ont montré que certaines souches de rotavirus isolées de selles humaines possèdent des segments génomiques habituellement trouvés dans des rotavirus animaux. Il en est ainsi certaines souches de génotype G3 (canins et félins) ou G9 (rotavirus porcins (Okada *et al.* 2000) et ovins), des génotypes G5 (habituellement rotavirus porcins ou équins), G6 (rotavirus bovins surtout mais aussi ovins et caprins), G8, G10 et G12 (provenant de rotavirus bovins) (Adah *et al.* 2001 ; Griffin *et al.* 2002), P[3] (génotype de rotavirus habituellement retrouvés chez le chat et le chien), P[9] (chat), P[11] (rotavirus principalement bovins) et P[14] (rotavirus chez le lapin). Ce phénomène peut résulter du passage d'une souche animale à l'homme ou d'un mécanisme de réassortiment génétique entre souches animales et humaines.

La première description d'une souche animale transmise à l'homme est le rotavirus AU-1 de génotype P[3]G3 dont les 11 segments génomiques ont une forte homologie avec ceux de la souche féline FRV-1 (Li *et al.* 1994 ; Nakagomi et Nakagomi 1989 ; Nakagomi *et al.* 1990 ; 1993 ; Shirane et Nakagomi 1994). Le sens de la transmission du chat vers l'homme repose sur le fait que les souches génétiquement proches du rotavirus AU-1/FRV-1 ne représentent que 1 % des souches humaines et 50 % des souches isolées du chat (revue dans Nakagomi et Nakagomi 2002) et dans le cas décrit, la source de contamination était probablement le chat de la maison. Un autre exemple de transmission d'une souche animale – canine cette fois – à l'homme est celui d'une souche de génotype G3 (Nakagomi *et al.* 1992). Plus récemment, ce mécanisme de transmission a été suspecté pour une souche de rotavirus P[14]G3 isolée chez un enfant et dont les gènes codant les protéines VP4, VP7 et NSP4 présentaient une forte homologie avec des rotavirus de lapin (De Leener *et al.* 2004).

À côté de la transmission d'un virus complet entre espèces, essentiellement décrite pour les rotavirus félins et canins, le phénomène le plus fréquemment observé est le réassortiment génétique favorisé par les infections doubles impliquant des virus d'espèces différentes (Nakagomi *et al.* 1994). Ainsi, l'analyse moléculaire de la souche bovine PPV-1 précédemment citée montre qu'elle possède des protéines VP7 (génotype G3) et NSP1 d'origine bovine mais des protéines VP4 (génotype P[7]) et NSP4 provenant d'une souche porcine (El-Attar *et al.* 2001). Mais certains rotavirus peuvent avoir une origine plus diverse, l'analyse génétique d'une souche inhabituelle P[14]G8 isolée chez un enfant égyptien a montré qu'elle provenait d'un réassortiment entre souches de rotavirus humains, bovins et de lapin (Holmes *et al.* 1999).

Plusieurs études ont montré que ce phénomène peut avoir une importance épidémiologique. À la fin des années 1980, la circulation d'une souche de rotavirus responsable d'infections asymptomatiques a été observée chez les nouveau-nés de la région de Bangalore en Inde. La caractérisation du génome de la souche type I321 a montré qu'elle était très proche de la souche bovine B233 (génotype P[11]G10) à l'exception des gènes codant NSP1 et NSP3 (Das *et al.* 1993 ; Dunn *et al.* 1993, 1994). Par la suite, d'autres souches P[11]G10 ont été retrouvées dans la région de Vellore en Inde, mais elles étaient alors associées à des infections symptomatiques. Il n'est pas clairement démontré que ces dernières souches soient identiques à la souche non pathogène I321 (Iturriza-Gómara *et al.* 2004). Quoi qu'il en soit, il est très probable que ces souches d'origine bovine se soient adaptées à l'homme à la suite de phénomènes de réassortiment avec des rotavirus humains. (Aijaz *et al.* 1996 ; Varshney *et al.* 2002). Des infections sporadiques dues à des souches de même génotype G10 et d'origine bovine ont été observées au Japon ou au Royaume-Uni. Cependant, ces souches isolées en dehors de l'Inde sont génétiquement différentes de la souche I321 et résultent d'introductions humaines différentes. Identifiée en Inde concomitamment aux souches de type I321, une souche de rotavirus (116E) possédant une protéine VP4 (P[11]) d'origine bovine génétiquement très proche de la souche précédente était également responsable d'infections asymptomatiques chez des nouveau-nés (Cunliffe *et al.* 1997 ; Das *et al.* 1993 ; 1994). Cette souche P[11]G9 résulterait d'un phénomène de réassortiment entre un virus bovin pour le gène 4 et un virus humain pour les autres gènes dont VP7 (Glass *et al.* 2005). Depuis 1994, la prévalence de ce génotype G9 n'a cessé d'augmenter

dans de nombreux pays (pour revue Santos et Hoshino 2005) et est devenue ces dernières années l'une des plus importantes dans de nombreux pays y compris en Europe (Arista *et al.* 2004 ; Banyai *et al.* 2004, Clark *et al.* 2004 ; Iturriza-Gómara *et al.* 2000 ; Rahman *et al.* 2005 ; Ramachandran *et al.* 2000 ; Santos *et al.* 2005). L'analyse de ces souches G9 montre que les souches nouvelles sont relativement éloignées sur le plan génétique de la souche 116E et également qu'au sein d'un même génotype il y a une diversité génétique et antigénique suffisamment importante pour y distinguer des lignages ayant un comportement différent vis-à-vis de sérums neutralisants hétérologues (Hoshino *et al.* 2004).

Ce phénomène de réassortiment entre souches humaines et animales a été également observé pour les génotypes G5 d'origine porcine et G8 d'origine bovine. Il a entraîné l'émergence de souches ayant une importance épidémiologique régionale telles que P[8]G5 en Afrique (Adah *et al.* 2001 ; 2003 ; Cunliffe *et al.* 1999), P[4]G8 et P[6]G8 au Brésil (Gouvea *et al.* 1994; Leite *et al.* 1996).

### 5.3. Vecteurs

La transmission du rotavirus par des insectes coprophages ou piqueurs contaminés n'a jamais été démontrée.

### 5.4. Mode de contamination des aliments et de l'eau

La présence et la persistance du virus sur les mains permettent sa transmission directe par contact (Ansari *et al.* 1988 ; 1989). De même, le rotavirus peut persister longtemps sur les surfaces poreuses ou non et dans l'environnement. Ainsi, toutes les surfaces de travail (paillasses et tables à langer) dans les hôpitaux et les crèches, les lavabos, les poignées de porte d'une part, les vêtements (blouses...) et couches d'autre part sont des relais possibles dans la transmission du virus (Abad *et al.* 1994 ; Ryder *et al.* 1977 ; Halvorsrud et Orstavik 1980 ; Akhter *et al.* 1995). Enfin, la transmission aérienne par aérosol est possible et pourrait participer à la **diffusion du virus de personne à personne** (Ijaz *et al.* 1985b ; 1994).

La **contamination des aliments** s'effectue lors de leur préparation. Les coquillages lorsqu'ils sont consommés crus ont été à l'origine de gastroentérites (Lees 2000). Les sandwiches et d'autres aliments ont été impliqués (Morb Mortl Weekly Rep, March-April and Dec 2000 ; Japan Ministry of Health and Welfare report 2000 ; Mikami *et al.* 2004). Les rotavirus sont moins fréquemment impliqués que les norovirus dans les gastroentérites d'origine alimentaire.

La **stabilité du virus dans l'eau** et sa résistance aux traitements physicochimiques, notamment dans les traitements des eaux usées peuvent avoir pour conséquence la présence du virus dans les eaux de boisson (Van Zyl *et al.* 2004 ; Gratacap-Cavallier *et al.* 2000) et les eaux récréatives qui peuvent alors être une source de contamination. Les rotavirus ont été impliqués dans de nombreuses épidémies de gastroentérites d'origine hydrique (Ansari *et al.* 1991 ; Hopkins *et al.* 1984 ; Hung *et al.* 1984 ; Kukkula *et al.* 1997) ; on retrouve souvent comme cause de contamination un dysfonctionnement du réseau de distribution de l'eau.

## 6. Survie de l'agent infectieux

### 6.1. Sensibilité aux médicaments

Il n'existe aucun traitement antiviral spécifique.

### 6.2. Sensibilité aux traitements de désinfection

Virus sans enveloppe, les rotavirus sont résistants aux agents chimiques et physiques, ce qui leur confère une survie prolongée dans le milieu extérieur notamment sur les surfaces. D'une façon générale, les rotavirus sont moins sensibles aux désinfectants sur les surfaces non poreuses qu'en suspension ; de même, la présence de matières fécales protège de l'inactivation (Abad *et al.* 1997).

#### 6.2.1. Inactivation par les moyens chimiques

##### Inactivation par le chlore et dérivés

###### • Inactivation par le chlore libre

Les résultats de l'inactivation dépendent de la souche test utilisée, du pH, de la température et du temps de contact. Certains auteurs observent une inactivation (diminution de 4 à 5 log) du rotavirus (souches simienne SA11 et humaine Wa) par le chlore libre lorsque la concentration est supérieure à 0,3mg/L. Le temps nécessaire est de 15 à 20 secondes. L'inactivation est plus rapide et complète à pH6 qu'à pH10 (Vaughn *et al.* 1986 ; Berman

et Hoff 1984). Pour d'autres auteurs, ces concentrations permettent au mieux une diminution de moins de 2 log après une exposition de 5 à 10 min (Abad *et al.* 1994) et si l'on se replace dans les conditions normales de chloration de l'eau, c'est-à-dire 0,05mg/L à la sortie du robinet ou 0,75mg/L à la sortie du traitement, on n'observe pas une réduction suffisante des titres de virus (Sattar *et al.* 1984b). Ces différences sont dues aux conditions expérimentales, les rotavirus en suspension monodispersée sont beaucoup plus sensibles au chlore que dans les conditions naturelles où ils sont plutôt agrégés et parfois protégés par de la matière fécale (A. Bosch communication personnelle).

- **Inactivation par le Monochloramine**

Le monochloramine ne permet pas une inactivation du rotavirus. Utilisé à une concentration de 10mg/L (pH8 et + 5°C) la quantité de virus purifié (souche SA11) décroît de 2 log en 6,75h, (plus de 10h si le virus est associé à des cellules) (Berman et Hoff 1984).

- **Inactivation par le dioxyde de chlore**

À des concentrations comprises entre 0,2 et 0,5mg/L les rotavirus humains (souche Wa) et simiens (souche SA11) sont inactivés (réduction de 4 à 5 log) en 15 secondes à pH alcalin (>pH8) et à +4°C. L'inactivation est plus lente voire incomplète à pH neutre ou acide (Berman et Hoff 1984; Harakeh et Butler 1984 ; Chen et Vaughn 1990).

- **Eau de Javel**

L'eau de Javel dosée à 800 ppm de chlore libre (solution d'hypochlorite de sodium à 6 %) permet une diminution de 98 % si le contact a été de 10 minutes.

### Inactivation par d'autres désinfectants

- **Inactivation par l'ozone**

Les rotavirus humains (souche Wa) et simiens (souche SA11) sont rapidement inactivés par un traitement à l'ozone : réduction du titre infectieux de 5 log en 10 secondes à des concentration de 0,25mg/L (Vaughn *et al.* 1987 ; Khadre et Yousef 2002).

- **Comparaison de l'efficacité sur le rotavirus de certains désinfectants**

Les résultats sont exprimés en concentration active par temps (CT). CT est la concentration de désinfectant en mg/L par le temps de contact en minutes pour obtenir une diminution du virus (de 2 log dans le Tableau 7).

**Tableau 7 : comparaison de l'efficacité sur le rotavirus de certains désinfectants**

	Désinfectant (inhibition de 99 % à 5°C, résultats exprimés en CT)			
	Chlore libre pH 6 à 7	Chloramines pH 8 à 9	Dioxyde de Chlore pH 6 à 7	Ozone pH 6 à 7
<b>Polio 1</b>	1.1 - 2.5	768 - 3 740	0.2 - 6.7	0.1 - 0.2
<b>Rotavirus</b>	0.01 - 0.05 ou 2,3*	3806 - 6 476	0.2 - 2.1	0.006 - 0.06

Tableau adapté de Hoff 1986.

\* Résultats publiés par Caballero *et al.* 2004.

Parmi les autres désinfectants, l'éthanol à 70 %, l'isopropanol à 70 %, les solutions phénoliques permettent une diminution du titre infectieux de 95 à 99,9 % (Ward *et al.* 1991; Sattar *et al.* 1994 ; Ansari *et al.* 1989).

Le formaldéhyde 1 %, le Lysol 2 %, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 % sont également efficaces après un contact d'une heure (Meng *et al.* 1987).

Par contre le gluconate de chlorhexidine, le cetrimide et les autres ammoniums quaternaires, le savon liquide sont peu efficaces (Sattar *et al.* 1994 ; Ansari *et al.* 1989).

### 6.2.2. Inactivation par les moyens physiques

- **Inactivation par les UV**

Les doses UV nécessaires pour obtenir une diminution de l'infectivité se situent entre 25/30 mJ/cm<sup>2</sup> pour une réduction de 3 log et 36 à 50 mJ/cm<sup>2</sup> pour une réduction de 4 log (Battigelli *et al.* 1993 ; Chang *et al.* 1985 ; Snicer *et al.* 1998 ; Wilson *et al.* 1992).

- **Traitement par les hautes pressions**

Un traitement à 300 MPa durant 2 minutes à 25°C permet une inactivation de 8log<sub>10</sub>, mais une fraction de la population virale sera résistante à ce traitement et persistera (Khadre et Yousef 2002).

Les traitements par les champs électriques pulsés sont inefficaces sur les rotavirus.

### 6.3. Survie dans l'environnement

La survie du rotavirus dans l'environnement est influencée par le « conditionnement », le type de support : poreux, non poreux ou en aérosol par la température, le pH et l'importance de l'humidité.

L'importance de l'humidité dans la survie du rotavirus est discutée et dépend probablement des conditions expérimentales ; pour certains le degré d'humidité n'influence pas la survie du virus (Abad *et al.* 1994) alors que pour d'autres ce facteur joue un rôle (Moe et Shirley 1982 ; Ijaz *et al.* 1985b ; 1994 ; Sattar *et al.* 1984a ; 1986 ; 1994).

Le rotavirus est stable à des pH compris entre 3 et 11 et aux températures inférieures à 20°C. Le pouvoir infectieux du rotavirus est peu affecté par des cycles de congélation-décongélation. Lyophilisé, il reste infectieux au moins 17 jours. Par contre, à 37°C son pouvoir infectieux décroît de 2 à 3 log<sub>10</sub> après 4 ou 7 jours d'incubation, il perd une grande partie de son pouvoir infectieux après 4 jours de dessiccation à l'air ambiant et à une température de +20°C (Meng *et al.* 1987).

Les rotavirus sont capables de survivre longtemps sur **différentes surfaces poreuses ou non** : vêtements en coton, papier, aluminium, porcelaine, carrelage, gant en latex, polystyrène. Par exemple, 90 % de l'inoculum infectieux est retrouvé après 60 jours et sur ces supports, la survie du rotavirus n'est pas affectée par la dessiccation ou en atmosphère moyennement ou très humide (Abad *et al.* 1994 ; Sattar *et al.* 1986). Par contre, la présence de matières fécales protège le virus et augmente sa persistance sur les surfaces non poreuses (Abad *et al.* 1997).

Les rotavirus survivent plusieurs heures (plus de 4h) **sur les mains** (Ansari *et al.* 1988).

La survie des rotavirus **en aérosol** (lors des vomissements) atteint 9 jours à +20°C (Sattar *et al.* 1984a ; 1994 ; Ijaz *et al.* 1985a).

**Dans l'eau du robinet** : à 20°C, on constate une perte de 2 log<sub>10</sub> après 64 jours ; à 4°C la perte est de 0,7 log<sub>10</sub> durant même période (Sattar *et al.* 1984b ; 1986 ; 1988 ; Raphael *et al.* 1985a). Le rotavirus s'avère ainsi plus résistant que le poliovirus et l'adénovirus.

## 7. Dangers spécifiques liés à la manipulation pour le personnel de laboratoire et modalité de prévention

### 7.1. Infections acquises au laboratoire

Le risque est faible pour le personnel de laboratoire à condition de respecter correctement les mesures d'hygiène.

### 7.2. Sources et échantillons

Fèces, prélèvements d'eaux et de boues de station d'épuration.

### 7.3. Dangers primaires

Ingestion de matières contaminées. Exposition aux aérosols lors des vomissements.

### 7.4. Classe de confinement

Niveau de confinement 2.

### 7.5. Précautions particulières

Manipulation de matériel contaminé selon les règles d'hygiène : gants et vêtements de protection.

### 7.6. Déversements accidentels

Laisser retomber les aérosols, mettre gants et vêtements de protection, appliquer de l'eau de Javel de la périphérie vers le centre, laisser en contact 30 minutes avant de nettoyer.

### 7.7. Élimination

Les déchets contaminés doivent être éliminés en suivant le circuit septique et être incinérés.

## 7.8. Entreposage

Les contenants doivent être scellés, étanches, résistants et étiquetés correctement.

## 7.9. Évaluation de la viabilité

L'évaluation de la viabilité peut se réaliser par des tests de culture cellulaire.

# 8. Immunisation naturelle, vaccinale

## 8.1. Prophylaxie spécifique

### Les vaccins anti-rotavirus :

L'argumentaire d'une vaccination anti-rotavirus repose principalement sur la constatation que l'infection naturelle confère une protection contre les infections ultérieures sévères (Velasquez *et al.* 1996). Certes, Gorrell et Bishop (Gorrell et Bishop 1999) ont montré que chez l'homme une infection par un rotavirus induisait des anticorps capables de neutraliser plusieurs types de virus (neutralisation hétérotypique), mais le mécanisme d'une protection hétérotypique est encore méconnu. C'est un des points qui devra faire l'objet d'une attention particulière dans le suivi de l'efficacité des vaccins.

Le premier vaccin commercialisé aux États-Unis en 1998 (Rotashield®) était constitué à partir d'un virus simien (G3) recombiné avec un segment génomique de virus humains exprimant les antigènes des types G1, G2 ou G4. Les essais cliniques avaient montré une efficacité satisfaisante dans la prévention des diarrhées sévères (Perez-Schael *et al.* 1997) et il a reçu l'autorisation de mise sur le marché par la FDA en 1998. Mais une année plus tard il fut rapidement retiré après la constatation d'une augmentation du nombre d'invaginations intestinales aiguës (Centers for Disease Control and Prevention, 1999). Deux vaccins seront prochainement disponibles en France (Fischer *et al.* 2004, Glass *et al.* 2004). Ces vaccins résultent de deux approches différentes, l'un est monovalent (RotaRix®, GlaxoSmithKline) et provient d'une souche humaine atténuée de génotype G1P[8] (ou sérotype G1P1A). Il est administré par voie orale en deux doses à l'âge de 2 et 3 mois. Le second est pentavalent (RotaTeq®, Sanofi Pasteur MSD) ; il est composé d'un virus bovin recombinant exprimant des protéines de surface de rotavirus humains (VP7) de sérotype G1, G2, G3, G4 et VP4 de génotype P[8] (sérotype P1A). Il est administré par voie orale en trois doses à l'âge de 2, 3 et 4 mois. Les premiers essais cliniques de grande ampleur (environ 70 000 inclusions pour chacun de ces essais) ont montré l'innocuité de ces deux vaccins. L'efficacité de ces deux vaccins, évaluée pour chacun d'entre eux sur 6000 inclusions, est de 85 et 98 % pour la protection des diarrhées sévères (Bressee *et al.* 2005 ; Ruiz-Palacios *et al.* 2006 ; Vesikari *et al.* 2006).

Les résultats d'efficacité sont très encourageants vis-à-vis des souches les plus répandues en Europe et aux États-Unis, notamment la souche G1P[8] largement représentée dans les populations étudiées. Leur efficacité vis-à-vis des souches plus rares ou inhabituelles provenant d'Asie ou d'Afrique, non incluses dans le vaccin, est à démontrer sur le long terme. La moindre efficacité du vaccin monovalent (G1P[8]) sur la souche G2P[4] pourrait le faire craindre (Glass et Parashar 2006; Ruiz-Palacios *et al.* 2006). Les rotavirus présentent une très grande diversité moléculaire et antigénique et les études d'épidémiologie moléculaire ont révélé l'émergence de certains types autrefois rares.

Plusieurs autres candidats vaccins sont en développement plus ou moins avancé :

- tout d'abord le vaccin chinois préparé par « Lanzhou Institute of Biological Products ». C'est un vaccin vivant monovalent ovin Chine. Aucune étude clinique prouvant son efficacité et son innocuité n'est disponible ;
- le vaccin bovin développé par le NIH est quadrivalent (G1 à G4) composé d'un réassortiment génétique avec des gènes 9 humains. Testé en Finlande, il est bien toléré et s'avère induire une protection efficace. Il est destiné aux pays en voie de développement où il pourrait être une alternative moins coûteuse aux vaccins Merck et GSK ;
- les droits du vaccin original simien Rotashield® ont été acquis par une société de biotechnologie, Bio Virx qui envisage une commercialisation dans les pays en voie de développement avec une argumentation faisant état d'une surestimation du risque d'invagination aiguë et d'un rapport bénéfice/risque largement en faveur du vaccin ;
- plusieurs souches « néonatales » sont également des candidats vaccins mais aucune n'a démontré son efficacité lors d'essais cliniques ; il s'agit de la souche Australienne RV3, des souches Indoues précédemment citées, 116E et I321. Les nouveau-nés infectés par ces virus étaient asymptomatiques et protégés d'une infection sévère ultérieure. Ces souches « néonatales » auraient l'avantage de se multiplier chez l'enfant y compris chez le nouveau-né en dépit de la présence d'anticorps maternels. Cependant, l'efficacité vaccinale de ces souches après leur adaptation en culture reste à démontrer ;
- les autres approches de vaccination anti-rotavirus restent du domaine de la recherche : vaccin ADN, pseudo-particules virales et protéines recombinantes.

## 8.2. Prophylaxie non spécifique

Mesures d'hygiène classique : lavage des mains avec des solutions hydroalcooliques, changement de blouse ou utilisation de surblouse à usage unique, utilisation de gants, nettoyage des surfaces et isolement des enfants ayant une gastroentérite (Jusot *et al.* 2003 ; Zerr *et al.* 2005). Le problème se situe dans l'observance de ces mesures.

## 9. Modèles d'études expérimentaux

### 9.1. *In vitro*

Les rotavirus du groupe A ont été principalement cultivés sur les lignées MA 104 (lignée de cellules de rein de singe rhésus) et Caco-2 (lignée provenant d'un adénocarcinome du colon). Les cultures s'effectuent à 37°C sous 10 % de CO<sub>2</sub>. Avant l'inoculation du virus, les cellules sont cultivées 24 heures sans sérum. Le virus est incubé avec de la trypsine (0,5µg/ml) à 37°C durant 30 minutes. Les cellules sont infectées à une multiplicité d'infection (MOI) de 0,002 pfu/cellule pour la production sur cellules MA104 et une MOI de 10 pfu/cellule pour les travaux de biologie cellulaire sur cellules Caco-2. Le virus laissé adsorbé 1 heure à 37°C puis l'inoculum est retiré et remplacé par du milieu frais (Ward *et al.* 1984 ; Brunet *et al.* 2000). L'effet cytopathique peut être observé au microscope optique ou révélé par des méthodes d'immunofluorescence ou d'immunoperoxydase.

Les rotavirus du groupe B ont pu être cultivés sur cellules MA104 ou Caco-2. Le virus doit être incubé à 37°C durant 60 minutes avec 100µg/ml de pancréatine (Sanekata *et al.* 1996).

Les rotavirus ont pu être cultivés sur MA104 dans les mêmes conditions que les rotavirus du groupe A (Tsunemitsu *et al.* 1991) ou sur cellules primaires de rein de porc (PPK) dans du milieu EMEM le virus étant incubé avec de la pancréatine (Terrett et Saif 1987).

L'expression de protéines recombinantes de rotavirus a été effectuée dans différents modèles. Le plus utilisé est le système baculovirus-cellules d'insecte (cellules *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9), ou mieux cellules High Five) (Crawford *et al.* 1994 ; Bertolotti-Ciarlet *et al.* 2003). L'expression de protéines recombinantes en système bactérien a également été utilisée (Choi *et al.* 2004).

Par ailleurs, des plantes transgéniques ont été développées pour l'expression de protéines virales. Les plantes qui ont été utilisées sont la pomme de terre (Matsumura *et al.* 2002 ; Choi *et al.* 2005) et la luzerne *Medicago sativa* (Dong *et al.* 2005).

### 9.2. *In vivo*

Beaucoup d'études ont été effectuées chez de nombreuses espèces animales soit pour étudier la réponse immune, soit pour étudier la physiopathologie de la maladie. Chaque modèle présente ses particularités et les résultats expérimentaux peuvent être différents d'une espèce à l'autre. D'une façon générale les animaux adultes peuvent être infectés mais les signes pathologiques comme la diarrhée ne s'observent que chez les jeunes animaux ou les nouveau-nés. En dehors de quelques modèles expérimentaux, les infections sont symptomatiques si le modèle animal-virus est homologue.

Les animaux de petite taille, rat, lapin et surtout souris sont les plus utilisés car d'utilisation plus facile, le coût des expérimentations est moindre et les réactifs disponibles sont plus complets. Dans le modèle murin, l'infection commence dans l'intestin proximal et progresse vers l'intestin terminal. Elle est limitée aux villosités et épargne les cryptes. Deux jours après l'infection, les entérocytes du sommet des villosités se vacuolisent, ces dernières sont émoussées. Mais il n'y a pas d'hyperplasie des cryptes et la réaction inflammatoire est limitée, contrairement aux observations faites dans le modèle lapin. Chez la souris immunocompétente l'infection est limitée à l'intestin et au tissu lymphoïde intestinal, mais chez la souris immunodéprimée l'infection peut être extensive et par exemple atteindre le foie. Le modèle murin est largement utilisé pour étudier la réponse immune après infection ou immunisation par différents antigènes réplicatifs ou non. Ce modèle est également utilisé dans des expérimentations ayant pour but de comprendre les mécanismes complexes de la protection immunitaire (Burns *et al.* 1996 ; Feng *et al.* 1997 ; Franco et Greenberg 1999) ou d'élaborer des stratégies vaccinales, notamment avec des antigènes non réplicatifs (ADN recombinant, protéines ou pseudo-particules virales).

Les animaux de grande taille, veau, porcelet, agneau et primates non humains sont des modèles d'utilisation plus limitée. Le veau et surtout le porcelet ont été les plus utilisés. Chez le veau et le porcelet, l'infection concerne l'ensemble de l'intestin grêle (et le colon pour le porcelet). Les altérations histologiques sont sévères avec des villosités atrophiées, entérocytes vacuolisés, et on observe une infiltration de la *lamina propria* par des cellules mononuclées. Le porcelet est également utilisé pour étudier la réponse immune et les mécanismes de protection (Saif *et al.* 1996 ; Yuan et Saif 2002).

## Références

### Pour en savoir plus :

#### Sites Internet :

<http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/gastro/rotavirus.htm>  
<http://www.rotavirusvaccine.org/>  
<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap33.html>  
[http://www.hpa.org.uk/infections/topics\\_az/rotavirus/menu.htm](http://www.hpa.org.uk/infections/topics_az/rotavirus/menu.htm)

#### Bibliographie générale

Gastroentérites virales Aspects cliniques et thérapeutiques. Gastroentérites aiguës virales. Ed. Elsevier. Coordinateurs : Jean Cohen, Antoine Garbarg-Chenon et Pierre Pothier. 2002

Viral gastroenteritis. Desselberger U. and Gray J. Editors. Elsevier, 2003.

#### Bibliographie

Abad FX, Pinto RM, Bosch A. Disinfection of human enteric viruses on fomites. *FEMS Microbiol Lett.* 1997 ; 156 : 107-11.

Abad FX, Pinto RM, Diez JM, Bosch A. Disinfection of human enteric viruses in water by copper and silver in combination with low levels of chlorine. *Appl Environ Microbiol.* 1994 ; 60 : 2377-83.

Abe T, Kobayashi M, Araki K, Kodama H, Fujita Y, Shinozaki T, Ushijima H. Infantile convulsions with mild gastroenteritis. *Brain Dev* 2000 ; 22 : 301-6.

Adah MI, Nagashima S, Wakuda M, Taniguchi K Close relationship between G8-serotype bovine and human rotaviruses isolated in Nigeria. *J Clin Microbiol.* 2003 ; 41 : 3945-50.

Adah MI, Wade A, Taniguchi K. Molecular epidemiology of rotaviruses in Nigeria: detection of unusual strains with G2P[6] and G8P[1] specificities. *J Clin Microbiol.* 2001 ; 39 : 3969-75.

Aijaz S, Gowda K, Jagannath HV, Reddy RR, Maiya PP, Ward RL, Greenberg HB, Raju M, Babu A, Rao CD. Epidemiology of symptomatic human rotaviruses in Bangalore and Mysore, India, from 1988 to 1994 as determined by electropherotype, subgroup and serotype analysis. *Arch Virol.* 1996 ; 141 : 715-26.

Akhter J, al-Hajjar S, Myint S, Qadri SM. Viral contamination of environmental surfaces on a general paediatric ward and playroom in a major referral centre in Riyadh. *Eur J Epidemiol.* 1995; 11: 587-90.

Anderson EJ, Weber SG. Rotavirus infection in adults. *Lancet Infect Dis.* 2004; 4 : 91-9.

Anonymous. Foodborne outbreak of Group A rotavirus gastroenteritis among college students--District of Columbia, Morb Mortal Weekly Rep. 2000; 49 : 1131-3.

Ansari SA, Sattar SA, Springthorpe VS, Wells GA, Tostowaryk W. Rotavirus survival on human hands and transfer of infectious virus to animate and nonporous inanimate surfaces. *J Clin Microbiol.* 1988 ; 26 : 1513-8.

Ansari SA, Sattar SA, Springthorpe VS, Wells GA, Tostowaryk W. washing agents against viruses and bacteria: experiments with rotavirus and Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol.* 1989 ; 55 : 3113-8.

Ansari SA, Springthorpe VS, Sattar SA. Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks. *Rev Infect Dis.* 1991 ; 13 : 448-61.

Arista S, Giammanco GM, De Grazia S, Migliore MC, Martella V, Cascio A. Molecular characterization of the genotype Gg human rotavirus strains recovered in Palermo, Italy, during the winter of 1999-2000. *Epidemiol Infect.* 2004 ;132 : 343-9.

Ball JM, Tian P, Zeng CQ, Morris AP, Estes MK. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science.* 1996 ; 272 : 101-4.

Banyai K, Gentsch JR, Schipp R, Jakab F, Bene J, Melegh B, Glass RI, Szucs G. Molecular epidemiology of human P[8],G9 rotaviruses in Hungary between 1998 and 2001. *J Med Microbiol.* 2004 ; 53 : 791-801.

Battigelli, D.A., Sobsey, M.D. and Lobe, D.C. (1993). The inactivation of Hepatitis A virus and other model viruses by UV irradiation. *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 27, No. 3-4, pp. 339-342.

- Berman D, Hoff JC. Inactivation of simian rotavirus SA11 by chlorine, chlorine dioxide, and monochloramine. *Appl Environ Microbiol.* 1984 ;48 : 317-23.
- Bertolotti-Ciarlet A, Ciarlet M, Crawford SE, Conner ME, Estes MK. Immunogenicity and protective efficacy of rotavirus 2/6-virus-like particles produced by a dual baculovirus expression vector and administered intramuscularly, intranasally, or orally to mice. *Vaccine.* 2003 ; 21 : 3885-900.
- Blackhall J, Fuentes A, Magnusson G. Genetic stability of a porcine rotavirus RNA segment during repeated plaque isolation. *Virology.* 1996 ; 225 : 181-90.
- Bonno M, Higashigawa M, Nakano T, Miyahara M, Azuma E, Komada Y, Ito M, Sakura M. Acute myositis with transient decrease of albumin, immunoglobulins and complement following rotavirus gastroenteritis. *Acta Paediatr Jpn* 1998 ; 40 :82-4.
- Boshuizen JA, Reimerink JH, Korteland-van Male AM, van Hamp VJ, Koopmans MP, Buller HA, Dekker J and Einerhand AW. Changes in small intestinal homeostasis, morphology, and gene expression during rotavirus infection of infant mice. *J Virol.* 2003, 77: 13005-16.
- Bresee JS, Parashar UD, Widdowson MA, Gentsch JR, Steele AD, Glass RI. Update on Rotavirus Vaccines. *Pediatr Infect Dis J.* 2005 ; 24 : 947-52.
- Bridger JC, Brown JF. Antigenic and pathogenic relationships of three bovine rotaviruses and a porcine rotavirus. *J Gen Virol.* 1984 ; 65 : 1151-8.
- Brunet JP, Cotte-Laffitte J, Linxe C, Quero AM, Geniteau-Legendre M, Servin A Rotavirus infection induces an increase in intracellular calcium concentration in human intestinal epithelial cells: role in microvillar actin alteration. *J Virol.* 2000 ; 74 : 2323-32.
- Burns JW, Siadat-Pajouh M, Krishnaney AA, Greenberg HB. Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science,* 1996; 272 : 104-7.
- Caballero S, Abad FX, Loisy F, Le Guyader FS, Cohen J, Pinto RM, Bosch A. Rotavirus virus-like particles as surrogates in environmental persistence and inactivation studies. *Appl Environ Microbiol.* 2004 ; 70 : 3904-9.
- Centers for Disease Control and Prevention. Withdrawal of rotavirus vaccine recommendation. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1999; 48: 1007.
- Chang JC, Ossoff SF, Lobe DC, Dorfman MH, Dumais CM, Qualls RG, Johnson JD. UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms. *Appl Environ Microbiol.* 1985 ; 49 : 1361-5.
- Chen YS, Vaughn JM. Inactivation of human and simian rotaviruses by chlorine dioxide. *Appl Environ Microbiol.* 1990 ; 56 : 1363-6.
- Choi AH, Basu M, McNeal MM, Bean JA, Clements JD, Ward RL. Intranasal administration of an Escherichia coli-expressed codon-optimized rotavirus VP6 protein induces protection in mice. *Protein Expr Purif.* 2004 ; 38 : 205-16.
- Choi NW, Estes MK, Langridge WH. Synthesis and assembly of a cholera toxin B subunit-rotavirus VP7 fusion protein in transgenic potato. *Mol Biotechnol.* 2005 ; 31 : 193-202.
- Chou IC, Tsai CH, Tsai FJ. Rotavirus associated with poliomyelitis-like syndrom. *Pediatr Infect Dis J* 1998 ; 17 :930-1.
- Clark HF, Lawley DA, Schaffer A, Patacsil JM, Marcello AE, Glass RI, Jain V, Gentsch J. Assessment of the epidemic potential of a new strain of rotavirus associated with the novel G9 serotype which caused an outbreak in the United States for the first time in the 1995-1996 season. *J Clin Microbiol.* 2004 ; 42 : 1434-8.
- Cook N, Bridger J, Kendall K, Iturriza Gomara M, El-Attar L, Gray J. The zoonotic potential of rotavirus. *J Infection.* 2004 ; 48 : 289-302.
- Crawford SE, Labbe M, Cohen J, Burroughs MH, Zhou YJ, Estes MK. Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J Virol.* 1994 ; 68 : 5945-52.
- Cunliffe NA, Das BK, Ramachandran M, Bhan MK, Glass RI, Gentsch JR. Sequence analysis demonstrates that VP6, NSP1 and NSP4 genes of Indian neonatal rotavirus strain 116E are of human origin. *Virus Genes,* 1997 ; 15 : 39-44.
- Cunliffe NA, Gondwe JS, Broadhead RL, Molyneux ME, Woods PA, Bresee JS, Glass RI, Gentsch JR, Hart CA. Rotavirus G and P types in children with acute diarrhea in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1998: predominance of novel P[6]G8

strains. *J Med Virol.* 1999, **57**: 308-12.

Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, Woods PA, Gupta A, Ramachandran M, Kumar R, Bhan MK, Glass RI. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J. Clin. Microbiol.* 1994 ; 32 : 1820-22.

Das BK, Gentsch JR, Hoshino Y, Ishida S, Nakagomi O, Bhan MK, Kumar R, Glass RI. Characterization of the G serotype and genogroup of New Delhi newborn rotavirus strain 116E. *Virology.* 1993 ; 197 : 99-107.

Das M, Dunn SJ, Woode GN, Greenberg HB, Rao CD. Both surface proteins (VP4 and VP7) of an asymptomatic neonatal rotavirus strain (1321) have high levels of sequence identity with the homologous proteins of a serotype 10 bovine rotavirus. *Virology.* 1993 ; 194 : 374-9.

Davidson GP, Gall GL, Petric M, Butler D, Hamilton JR. Human rotavirus enteritis induced in conventional piglets. *J Clin Invest.* 1977; 60: 1402-9.

De La Rubia L, Herrera MI, Cebrero M, De Jong JC. Acute pancreatitis associated with rotavirus infection. *Pancreas* 1996 ; 12 :98-9.

De Leener K, Rahman M, Matthijnsens J, Van Hoovels L, Goegebuer T, van der Donck I, Van Ranst M. Human infection with a P[14], G3 lapine rotavirus. *Virology.* 2004 ; 325 : 11-7.

De Villiers FP, Steele AD, Driessen M. Central nervous system involvement in neonatal rotavirus infection. *Ann Trop Paediatr.* 2003 ; 23 : 309-12.

Di Lerna V. Gianotti-Crosti syndrom related to rotavirus infection. *Pediatr Dermatol* 1998 ; 15 :485-6.

Dong JL, Liang BG, Jin YS, Zhang WJ, Wang T. Oral immunization with pBsVP6-transgenic alfalfa protects mice against rotavirus infection. *Virology.* 2005 ; 339 : 153-63.

Dubois E, Le Guyader F, Haugarreau L, Kopecka H, Cormier M, Pommepuy M. Molecular epidemiological survey of rotaviruses in sewage by reverse transcriptase seminested PCR and restriction fragment length polymorphism assay. *Appl Environ Microbiol.* 1997 ; 63 : 1794-800.

Dunn SJ, Cross TL, Greenberg HB. Comparison of the rotavirus nonstructural protein NSP1 (NS53) from different species by sequence analysis and northern blot hybridization. *Virology* 1994 ; 203 : 178-83.

Dunn SJ, Greenberg HB, Ward RL, Nakagomi O, Burns JW, Vo PT, Pax KA, Das M, Gowda K, Rao CD. Serotypic and genotypic characterization of human serotype 10 rotaviruses from asymptomatic neonates. *J Clin Microbiol.* 1993 ; 31 : 165-9.

El-Attar L, Dhaliwal W, Howard CR, Bridger J. Rotavirus cross-species pathogenicity : molecular characterization of a bovine rotavirus pathogenic for pigs. *Virology* 2001 ; 291: 172-82.

Feng N, Franco MA, Greenberg HB. Murine model of rotavirus infection. *Adv Exp Med Biol.* 1997 ; 412:233-40.

Fischer TK, Bresee JS, Glass RI. Rotavirus vaccines and the prevention of hospital-acquired diarrhea in children. *Vaccine*, 2004, 22 : S49-S54.

Flewett TH, Woode GN. The rotaviruses. *Arch Virol.* 1978 ; 57 : 1-23.

Flewett TH. Electron microscopy in the diagnosis of infectious diarrhea. *J Am Vet Med Assoc.* 1978 ; 173 : 538-43.

Franco MA, Greenberg HB. Immunity to rotavirus infection in mice. *J Infect Dis.* 1999 ; 179 : S466-9.

Gentsch JR, Das BK, Jiang B, Bhan MK, Glass RI. Similarity of the VP4 protein of human rotavirus strain 116E to that of the bovine B223 strain. *Virology.* 1993 ; 194 : 424-30.

Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, Bhan MK. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30:1365-73.

Glass RI, Bhan MK, Ray P, Bahl R, Parashar UD, Greenberg H, Rao CD, Bhandari N, Maldonado Y, Ward RL, Bernstein DI, Gentsch JR. Development of candidate rotavirus vaccines derived from neonatal strains in India. *J Infect Dis.* 2005 ; 192 Suppl 1 : S30-5.

Glass RI, Bresee JS, Parshar UD, Jiang B, Gentsch J. The future of rotavirus vaccines: a major setback leads to new opportunities. *The Lancet*, 2004, 363 : 1547-50.

- Glass RI, Parashar UD. The promise of new rotavirus vaccines. *N Engl J Med.* 2006 ; 354 : 75-7.
- Correll RJ, Bishop RF. Homotypic and heterotypic serum neutralizing antibody response to rotavirus proteins following natural primary infection and reinfection in children. *J Med Virol.* 1999 ; 57 : 204-11.
- Gouvea V, de Castro L, Timenetsky MC, Greenberg H, Santos N. Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32 : 1408-1409.
- Gouvea V, Glass R I, Woods P, Taniguchi K, Clark H F, Forrester B, Fang Z Y. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 1990; 28:276-82.
- Gouvea V, Ramirez C, Li B, Santos N, Saif L, Clark HF, Hoshino Y. Restriction endonuclease analysis of the VP7 genes of human and animal rotaviruses. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 917-23.
- Graham DY, Dufour GR, Estes MK. Minimal infective dose of rotavirus. *Arch Virol.* 1987 ; 92 : 261-71.
- Gratacap-Cavallier B, Genoulaz O, Brengel-Pesce K, Soule H, Innocenti-Francillard P, Bost M, Gofti L, Zmirou D, Seigneurin JM. Detection of human and animal rotavirus sequences in drinking water. *Appl Environ Microbiol.* 2000 ; 66 : 2690-2.
- Griffin DD, Nakagomi T, Hoshino Y, Nakagomi O, Kirkwood CD, Parashar UD, Glass RI, Gentsch JR; National Rotavirus Surveillance System. Characterization of nontypeable rotavirus strains from the United States: identification of a new rotavirus reassortant (P2A[6],G12) and rare P3[9] strains related to bovine rotaviruses. *Virology.* 2002 ; 294 : 256-69.
- Hall GA, Bridger JC, Chandler RL, Woode GN. Gnotobiotic piglets experimentally infected with neonatal calf diarrhoea reovirus-like agent (Rotavirus). *Vet Pathol.* 1976 ; 13 : 197-210.
- Halvorsrud J & Orstavik I. An epidemic of rotavirus associated gastroenteritis in a nursing home for the elderly. *Scand J Infect Dis.* 1980; 12: 161-4.
- Harakeh M, Butler M. Inactivation of human rotavirus, SA11 and other enteric viruses in effluent by disinfectants. *J Hyg (Lond).* 1984 ; 93 : 157-63.
- Hoff JC. (1986) Inactivation of Microbial Agents by Chemical Disinfectants. Report N°: EPA/600/S2-86/087. US-EPA, Cincinnati, Ohio.
- Holmes JL, Kirkwood CD, Gerna G, Clemens JD, Rao MR, Naficy AB, Abu-Elyazeed R, Savarino SJ, Glass RI, Gentsch JR. Characterization of unusual G8 rotavirus strains isolated from Egyptian children. *Arch Virol.* 1999 ; 144 : 1381-96.
- Hongou K, Konishi T, Yagi S, Araki K, Miyawaki T. Rotavirus encephalitis mimicking afebrile benign convulsions in infants. *Pediatr Neurol* 1998 ; 18 : 354-7.
- Hopkins RS, Gaspard GB, Williams FP Jr, Karlin RJ, Cukor G, Blacklow NR. A community waterborne gastroenteritis outbreak: evidence for rotavirus as the agent. *Am J Public Health.* 1984; 74 : 2 63-5.
- Hoshino Y, Jones RW, Ross J, Honma S, Santos N, Gentsch JR, Kapikian AZ. Rotavirus serotype G9 strains belonging to VP7 gene phylogenetic sequence lineage 1 may be more suitable for serotype G9 vaccine candidates than those belonging to lineage 2 or 3. *J Virol.* 2004 ; 78 : 7795-802.
- Huet F. Gastroentérites virales Aspects cliniques et thérapeutiques. *Gastroentérites aiguës virales.* Pp 70-79. Ed. Elsevier. Coordinateurs : Jean Cohen, Antoine Garbarg-Chenon et Pierre Pothier. 2002.
- Hung T, Chen G, Wang C, Yao H, Fang Z, Chao T, Chou Z, Ye W, Chang X, Den S, Liong X, Chang W. Waterborne outbreak of rotavirus diarrhoea in adults in China caused by a novel rotavirus. *Lancet.* 1984; 1: 1139-1142.
- Ijaz MK, Sattar SA, Alkarmi T, Dar FK, Bhatti AR, Elhag KM. Studies on the survival of aerosolized bovine rotavirus (UK) and a murine rotavirus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 1994 ; 17 : 91-8.
- Ijaz MK, Sattar SA, Johnson-Lussenburg CM, Springthorpe VS, Nair RC. Effect of relative humidity, atmospheric temperature, and suspending medium on the airborne survival of human rotavirus. *Can J Microbiol.* 1985a ; 31 : 681-5.
- Ijaz MK, Sattar SA, Johnson-Lussenburg CM, Springthorpe VS. Comparison of the airborne survival of calf rotavirus and poliovirus type 1 (Sabin) aerosolized as a mixture. *Appl Environ Microbiol.* 1985b; 49 : 289-93.

Imai K, Otani K, Yanagihara K, Li Z, Futagi Y, Ono J, Nagai T, Okada S. Ictal video-EEG recording of three partial seizures in a patient with the benign infantile convulsions associated with mild gastroenteritis. *Epilepsia* 1999 ; 40 :1455-8.

Iturriza-Gómara M, Kang G, Mammen A, Jana AK, Abraham M, Desselberger U, Brown D, Gray J. Characterisation of rotavirus G9 strains isolated in the UK between 1995 and 1998. *J Med Virol*. 2000 Aug;61(4):510-7.

Iturriza-Gómara M, Cubitt D, Steele D, Greene J, Brown D, Kang G; Desselberger U, Gray J. Characterisation of P[11]G10 rotaviruses causing acute gastroenteritis in neonates and infants in Vellore, India. *J Clin Microbiol*. 2004 ; 42 : 2541-47.

Japan Ministry of Health and Welfare, National Institute of Infectious Diseases. An outbreak of group A rotavirus infection among adults from eating meals prepared at a restaurant, April 2000---Shimane. *Infectious Agents Surveillance Report* 2000 ; 21: 145.

Jusot JF, Vanhems P, Benzait F, Berthelot P, Patural H, Teysier G, Fabry J, Pozzetto B. Reported measures of hygiene and incidence rates for hospital-acquired diarrhea in 31 French pediatric wards: is there any relationship? *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003 ; 24 : 520-5.

Khadre MA, Yousef AE. Susceptibility of human rotavirus to ozone, high pressure, and pulsed electric field. *J Food Prot*. 2002; 65: 1441-6.

Kukkula M, Arstila P, Klossner ML, Maunula L, Bonsdorff CH, Jaatinen P. Waterborne outbreak of viral gastroenteritis. *Scand J Infect Dis*. 1997; 29: 415-418.

Le Guyader F, Dubois E, Menard D, Pommepuy M. Detection of hepatitis A virus, rotavirus, and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-nested PCR. *Appl Environ Microbiol*. 1994 ; 60 : 3665-71.

Le Guyader F, Haugarreau L, Miossec L, Dubois E, Pommepuy M. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Appl Environ Microbiol*. 2000 ; 66 : 3241-8.

Lees D. Viruses and bivalve shellfish. *Int J Food Microbiol*. 2000 Jul 25 ; 59 : 81-116.

Leite JPG, Alfieri AA, Woods PA, Glass RI, Gentsch JR. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. *Arch Virol*. 1996; 141: 2365-74.

Li B, Clark HF, Gouvea V. Amino acid sequence similarity of the VP7 protein of human rotavirus HCR3 to that of canine and feline rotaviruses. *J Gen Virol*. 1994; 75: 215-9.

Lundgren O, Peregrin AT, Persson K, Kordasti S, Uhnöo I, Svensson L. Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. *Science*. 2000; 287: 491-5.

Lundgren O, Svensson L. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. *Microbes Infect*. 2001 ; 3 : 1145-56

Matsumura T, Itchoda N, Tsunemitsu H. Production of immunogenic VP6 protein of bovine group A rotavirus in transgenic potato plants. *Arch Virol*. 2002 ; 147 : 1263-70.

Meng ZD, Birch C, Heath R, Gust I. Physicochemical stability and inactivation of human and simian rotaviruses. *Appl Environ Microbiol*. 1987 ; 53 : 727-30.

Mikami T, Nakagomi T, Tsutsui R, Ishikawa K, Onodera Y, Arisawa K, Nakagomi O. An outbreak of gastroenteritis during school trip caused by serotype G2 group A rotavirus. *J Med Virol*. 2004; 73 : 460-4.

Moe K, Shirley JA The effects of relative humidity and temperature on the survival of human rotavirus in faeces. *Arch Virol*. 1982; 72 : 179-86.

Nakagomi O, Isegawa Y, Hoshino Y, Aboudy Y, Shif I, Silberstein I, Nakagomi T, Ueda S, Sears J, Flores J. A new serotype of the outer capsid protein VP4 shared by an unusual human rotavirus strain Ro1845 and canine rotaviruses. *J Gen Virol*. 1993 ; 74 : 2771-4.

Nakagomi O, Isegawa Y, Ward RL, Knowton DR, Kaga E, Nakagomi T, Ueda S. Naturally occurring dual infection with human and bovine rotaviruses as suggested by the recovery of G1P[8] and G1P[5] rotaviruses from a single patient. *Arch Virol*. 1994 ; 137 : 381-88.

Nakagomi O, Mochizuki M, Aboudy Y, Shif I, Silberstein I, Nakagomi T. Hemagglutination by a human rotavirus isolate as evidence for transmission of animal rotaviruses to humans. *J Clin Microbiol*. 1992 ; 30 : 1011-13.

- Nakagomi O, Nakagomi T. Genomic relationships among rotaviruses recovered from various animal species as revealed by RNA–RNA hybridization assays. *Research in Veterinary Science*. 2002 ; 73 : 207–14.
- Nakagomi O, Ohshima A, Aboudy Y, Shif I, Mochizuki M, Nakagomi T, Gotlieb-Stematsky T. Molecular identification by RNA-RNA hybridization of a human rotavirus that is closely related to rotaviruses of feline and canine origin. *J Clin Microbiol*. 1990 ; 28 : 1198-203.
- Nakagomi T, Nakagomi O. RNA-RNA hybridization identifies a human rotavirus that is genetically related to feline rotavirus. *J Virol*, 1989 ; 63 : 1431-34.
- Okada J, Urasawa T, Kobayashi N, Taniguchi K, Hasegawa A, Mise K, Urasawa S. New P serotype of group A human rotavirus closely related to that of a porcine rotavirus. *J Med Virol*. 2000 ; 60 : 63-9.
- Pang XL, Joensuu J, Vesikari T. Detection of rotavirus RNA in cerebrospinal fluid in a case of rotavirus gastroenteritis with febrile seizures. *Pediatr Infect Dis J* 1996 ; 15 :543-5.
- Payment P, Trudel M, Sattar SA, Springthorpe VS, Subrahmanyam TP, Gregory BE, Vajdic AH, Blaskovic P, Guglielmi IJ, Kudrewko O. Virological examination of drinking water: a Canadian collaborative study. *Can J Microbiol*. 1984;30 : 105-12.
- Perez-Schael I, Guntinas MJ, Perez M, Pagone V, Rojas AM, Gonzalez R, Cunto W, Hoshino Y, Kapikian AZ Efficacy of the rhesus rotavirus-based quadrivalent vaccine in infants and young children in Venezuela. *N Engl J Med*. 1997 ; 337 : 1181-7. Erratum in: *N Engl J Med* 1998 ; 338 : 1002.
- Rahman M, Matthijnsens J, Goegebuer T, De Leener K, Vanderwegen L, van der Donck I, Van Hoovels L, De Vos S, Azim T, Van Ranst M. Predominance of rotavirus G9 genotype in children hospitalized for rotavirus gastroenteritis in Belgium during 1999-2003. *J Clin Virol*. 2005 ;33 : 1-6.
- Ramachandran M, Das, BK, Vij A, Kumar R, Bhambal SS, Kesari N, Rawat H, Bahl L, Thakur S, Woods PA, Glass RI, Bhan MK, Gentsch JR. Unusual diversity of human rotavirus G and P genotypes in India. *J Clin Microbiol*. 1996, 34: 436-39.
- Ramachandran M, Kirkwood CD, Unicomb L, Cunliffe NA, Ward RL, Bhan MK, *et al*. Molecular characterization of serotype G9 rotavirus strains from a global collection. *Virology*. 2000 ; 278 : 436–44.
- Ramig RF. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol*. 2004 ; 78 : 10213-20.
- Rao GG. Control of outbreaks of viral diarrhoea in hospitals--a practical approach. *J Hosp Infect*. 1995 ; 30 : 1-6.
- Raphael RA, Sattar SA, Springthorpe VS. Long-term survival of human rotavirus in raw and treated river water. *Can J Microbiol*. 1985a; 31 : 124-8.
- Riedel F, Kroener T, Stein K, Nuesslein TG, Rieger CH. Rotavirus infection and bradycardia-apnoea-episodes in the neonate. *Eur J Pediatr* 1996 ; 155 :36-40.
- Ruiz-Palacios GM, Perez-Schael I, Velazquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, Chevart B, Espinoza F, Gillard P, Innis BL, Cervantes Y, Linhares AC, Lopez P, Macias-Parra M, Ortega-Barria E, Richardson V, Rivera-Medina DM, Rivera L, Salinas B, Pavia-Ruz N, Salmeron J, Ruttimann R, Tinoco JC, Rubio P, Nunez E, Guerrero ML, Yarzabal JP, Damaso S, Tornieporth N, Saez-Llorens X, Vergara RF, Vesikari T, Bouckennooghe A, Clemens R, De Vos B, O’Ryan M; Human Rotavirus Vaccine Study Group. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med*. 2006 ; 354 : 11-22.
- Ryder RW, McGowan JF, Hatch MH, Palmer EL. Reovirus-like agent as a cause of nosocomial diarrhoea in infants. *J Pediatr*. 1977; 90: 698-702.
- Saif LJ, Ward LA, Yuan L, Rosen BI, To TL. The gnotobiotic piglet as a model for studies of disease pathogenesis and immunity to human rotaviruses. *Arch Virol Suppl*. 1996 ; 12 : 153-61.
- Sanekata T, Kuwamoto Y, Akamatsu S, Sakon N, Oseto M, Taniguchi K, Nakata S, Estes MK. Isolation of group B porcine rotavirus in cell culture. *J Clin Microbiol*. 1996 ; 34 : 759-61.
- Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol*. 2005 ; 15 : 29-56.
- Santos N, Volotao EM, Soares CC, Campos GS, Sardi SI, Hoshino Y. Predominance of rotavirus genotype G9 during the 1999, 2000, and 2002 seasons among hospitalized children in the city of Salvador, Bahia, Brazil: implications for future vaccine strategies. *J Clin Microbiol*. 2005 ; 43 : 4064-4069.

- Sattar SA, Dimock KD, Ansari SA, Springthorpe VS. Spread of acute hemorrhagic conjunctivitis due to enterovirus-70: effect of air temperature and relative humidity on virus survival on fomites. *J Med Virol.* 1988 ; 25 : 289-96.
- Sattar SA, Ijaz MK, Johnson-Lussenburg CM, Springthorpe VS. Effect of relative humidity on the airborne survival of rotavirus SA11. *Appl Environ Microbiol.* 1984a; 47 : 879-81.
- Sattar SA, Jacobsen H, Rahman H, Cusack TM, Rubino JR. Interruption of rotavirus spread through chemical disinfection. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1994; 15: 751-6.
- Sattar SA, Lloyd-Evans N, Springthorpe VS, Nair RC. Institutional outbreaks of rotavirus diarrhoea: potential role of fomites and environmental surfaces as vehicles for virus transmission. *J Hyg (Lond).* 1986 ; 96 : 277-89.
- Sattar SA, Raphael RA, Springthorpe VS. Rotavirus survival in conventionally treated drinking water. *Can J Microbiol.* 1984b ; 30 : 653-6.
- Shirane K, Nakagomi O. Interspecies transmission of animal rotaviruses to humans as evidenced by phylogenetic analysis of the hypervariable region of the VP4 protein. *Microbiol Immunol.* 1994; 38 : 823-6.
- Smeets CC, Brussel W, Leyten QH, Brus F. First report of Guillain-Barré syndrome after rotavirus-induced gastroenteritis in a very young infant. *Eur J pediatr* 2000 ; 159 : 224.
- Snicer, G.A., Malley, J.P., Margolin, A.B. and Hogan, S.P. (1998) "Évaluation of ultraviolet technology in drinking water treatment", AWWA Research Foundation and AWWA, Denver, CO.
- Staat MA, Azimi PH, Berke T, Roberts N, Bernstein DI, Ward RL, Pickering LK, Matson DO. Clinical presentations of rotavirus infection among hospitalized children. *Pediatr Infect Dis J.* 2002 ; 21 : 221-7.
- Terrett LA, Saif LJ. Serial propagation of porcine group C rotavirus (pararotavirus) in primary porcine kidney cell cultures. *J Clin Microbiol.* 1987 ; 25 : 1316-9.
- Theil KW. Group A rotaviruses. In: Saif LJ, Theil KW, editors. *Viral diarrhoea of man and animals.* West Palm Beach, FL: CRC Press; 1990. p. 35-72.
- Tsunemitsu H, Saif LJ, Jiang BM, Shimizu M, Hiro M, Yamaguchi H, Ishiyama T, Hirai T Isolation, characterization, and serial propagation of a bovine group C rotavirus in a monkey kidney cell line (MA104). *J Clin Microbiol.* 1991 ; 29 : 2609-13.
- van Zyl WB, Williams PJ, Grabow WO, Taylor MB. Application of a molecular method for the detection of group A rotaviruses in raw and treated water. *Water Sci Technol.* 2004 ; 50 : 223-228.
- Varshney B, Jagannath MR, Vethanayagam RR, Kodhandharaman S, Jagannath HV, Gowda K, Singh DK, Rao CD. Prevalence of, and antigenic variation in, serotype G10 rotaviruses and detection of serotype G3 strains in diarrheic calves: implications for the origin of G10P11 or P11 type reassortant asymptomatic strains in newborn children in India. *Arch. Virol.* 2002 ; 147 : 143-65.
- Vaughn JM, Chen YS, Lindburg K, Morales D. Inactivation of human and simian rotaviruses by ozone. *Appl Environ Microbiol.* 1987 ; 53 : 2218-21.
- Vaughn JM, Chen YS, Thomas MZ. Inactivation of human and simian rotaviruses by chlorine. *Appl Environ Microbiol.* 1986 ; 51 : 391-4.
- Velazquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero L, Morrow AL, Carter-Campbell S, Glass RI, Estes MK, Pickering LK, Ruiz-Palacios GM. Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med.* 1996, 335 : 1022-8.
- Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, Van Damme P, Santosham M, Rodriguez Z, Dallas MJ, Heyse JF, Gouveia MG, Black SB, Shinefield HR, Christie CD, Ylitalo S, Itzler RF, Coia ML, Onorato MT, Adeyi BA, Marshall GS, Gothefors L, Campens D, Karvonen A, Watt JP, O'Brien KL, DiNubile MJ, Clark HF, Boslego JW, Offit PA, Heaton PM; Rotavirus Efficacy and Safety Trial (REST) Study Team. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med.* 2006 ; 354 : 23-33.
- Ward RL, Bernstein DI, Knowlton DR, Sherwood JR, Young EC, Cusack TM, Rubino JR, Schiff GM. Prevention of surface-to-human transmission of rotaviruses by treatment with disinfectant spray. *J Clin Microbiol.* 1991 ; 29 : 1991-6.

Ward RL, Bernstein DI, Young EC, Sherwood JR, Knowlton DR, Schiff GM. Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. *J Infect Dis.* 1986 ; 154 : 871-80.

Ward RL, Knowlton DR, Pierce MJ. Efficiency of human rotavirus propagation in cell culture. *J Clin Microbiol.* 1984 ; 19 : 748-53.

Wilson, B.R., Roessler, P.F., Van Dellen, E., Abbaszadegan, M. and Gerba, C.P. (1992) Coliphage MS-2 as a UV water disinfection efficacy test surrogate for bacterial and viral pathogens. AWWA-WQTC Proceedings, Water Quality Technology Conference, Nov 15-19, 1992, Toronto, Canada, pp. 219-235.

Yoshida A, Kawamitsu T, Tanaka R, Okumura M, Yamakura S, Takasaki Y, Hiramatsu H, Momoi T, Iizuka M, Nakagomi O. Rotavirus encephalitis : detection of the virus genomic RNA in the cerebrospinal fluid of a child. *Pediatr Infect Dis J* 1995 ; 14 : 914-6.

Yuan L, Saif LJ. Induction of mucosal immune responses and protection against enteric viruses: rotavirus infection of gnotobiotic pigs as a model. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002 ; 87 : 147-60.

Zao CL, Yu WN, Kao CL, Taniguchi K, Lee CY, Lee CN. Sequence analysis of VP1 and VP7 genes suggests occurrence of a reassortant of G2 rotavirus responsible for an epidemic of gastroenteritis. *J Gen Virol.* 1999 ; 80 : 1407-15.

Zerr DM, Allpress AL, Heath J, Bornemann R, Bennett E. Decreasing hospital-associated rotavirus infection: a multidisciplinary hand hygiene campaign in a children's hospital. *Pediatr Infect Dis J.* 2005 ; 24 : 397-403.

Zvizdic S, Telalbasic S, Beslagic E, Cavaljuga S, Maglajlic J, Zvizdic A, Hamzic S. Clinical characteristics of rotaviruses disease. *Bosn J Basic Med Sci.* 2004 ; 4 : 22-4.

## 1. Agent infectieux

### 1.1. Nom scientifique

*Astrovirus*.

### 1.2. Acronyme

HastV.

### 1.3. Nom usuel

Astrovirus.

### 1.4. Caractéristiques

Les astrovirus appartiennent à une famille virale dont ils sont les seuls membres : les *Astroviridae*.

Les astrovirus ont été décrits pour la première fois en 1975 par Madeley et Cosgrove et Appleton et Higgins. Ils ont une bordure externe bien marquée et une morphologie en étoile visibles sur environ 10 % des particules virales qui leur a valu le nom d'astrovirus. Les astrovirus humains comprennent actuellement huit sérotypes et une multitude de souches animales a été décrite.

**Capside** : les astrovirus ont une capsid de structure icosaédrique (Risco *et al.* 1995) mesurant entre 28 et 30 nm de diamètre. La taille et le nombre des protéines structurales d'astrovirus humains et animaux varient selon les études. Deux à cinq protéines sont décrites pour les souches animales et 3 ou 4 protéines pour les souches humaines (Monroe *et al.* 1991, Willcocks *et al.* 1994).

**Génome** : le génome des astrovirus est constitué d'un ARN monocaténaire positif d'environ 6800 nucléotides et d'une queue polyA à l'extrémité 3'. Il est bordé aux extrémités 5' et 3' par une région non codante d'environ 80 nucléotides. Le génome est composé de trois cadres de lecture ouverts (ORF) ; les ORF 1a et ORF 1b codent les protéines non structurales et l'ORF 2 code les protéines de capsid.

L'ORF 1a comprend environ 2 800 nucléotides et chevauche l'ORF 1b de 70 nucléotides. L'ORF 1b est formé de 1 577 nucléotides et chevauche l'ORF 2 de 5 nucléotides. Ce dernier est composé de près de 2 400 nucléotides.

L'expression *in vitro* de l'ORF 2 aboutit à la production d'une protéine de 90 kDa immunoprécipitée par des anticorps anti-astrovirus. Ce précurseur protéique est ensuite clivé pour former les protéines constituant la capsid des astrovirus. Dans les cultures cellulaires infectées, un ARN subgénomique de 2 400 nucléotides est produit. La séquence de cet ARN subgénomique correspond à celle de l'ORF 2. Le rôle de l'ARN subgénomique est probablement d'apporter un surcroît de production de protéines structurales lors de la réplication.

### 1.5. Maladie correspondante

Les astrovirus sont une des principales étiologies des gastroentérites des jeunes enfants de moins de deux ans, des personnes âgées et des immunodéprimés. Ils semblent peu pathogènes pour l'adulte.

## 2. Pouvoir pathogène

### 2.1. Physiopathologie

Les astrocytes infectent les entérocytes matures des villosités intestinales, entraînant des lésions histologiques (inclusions intra-cytoplasmiques, vacuoles et dégénérescence nucléaire) responsables d'une atrophie villositaire et une hypertrophie des cryptes. L'infection concerne également les cellules M et les cellules des Plaques de Peyer. Les cellules infectées se vacuolisent et desquament, les tissus avoisinants sont le siège d'une inflammation. Ces lésions disparaissent dans les 5 jours suivant la contamination.

## 2.2. Dose infectieuse

La dose infectieuse minimale n'est pas connue.

## 2.3. Mode de contamination

La transmission des astrovirus s'effectue par la voie féco-orale par contact inter individuel, par l'intermédiaire d'objets ou de surfaces souillés, ou par des aliments ou de l'eau contaminés. Les astrovirus de sérotype 1 semblent les plus pathogènes.

## 2.4. Groupes à risque

Il n'y a pas à proprement parler de groupe à risque, tous les individus peuvent être infectés. Les infections à astrovirus sont plus fréquentes chez les personnes âgées et les immunodéprimés.

## 2.5. Période d'incubation

L'incubation peut varier de un à quatre jours.

## 2.6. Manifestations cliniques

Les études sur volontaires et les études descriptives des épidémies ont permis de déterminer les caractéristiques cliniques des infections à astrovirus (Kurtz *et al.* 1979, Midthun *et al.* 1993). Il s'agit d'une diarrhée aqueuse durant deux à trois jours avec ou sans symptômes généraux ou digestifs comme des douleurs abdominales, des nausées, des vomissements. Les gastroentérites à astrovirus ne peuvent pas être distinguées cliniquement de celles dues aux rotavirus, même si elles sont plus souvent modérées et provoquent moins souvent une déshydratation. L'excrétion virale peut précéder les symptômes et se prolonger plusieurs jours après la fin de la diarrhée (Mitchell *et al.*, 1993). Les immunodéprimés, notamment les patients atteints de pathologies hématologiques sévères, représentent un groupe à risque de gastroentérites à astrovirus (Cox *et al.* 1994).

# 3. Stratégies du diagnostic

## 3.1. Diagnostic chez l'homme

Les techniques immuno enzymatiques sont plus sensibles et d'utilisation plus pratique que la microscopie électronique. Ces techniques utilisent des anticorps polyclonaux ou monoclonaux et sont développées sous la forme de kits commerciaux. La technique ELISA est aussi utilisée pour la détermination des sérotypes. Aucun test ELISA n'est actuellement disponible pour la détection des anticorps spécifiques des astrovirus.

La RT-PCR avec des amorces spécifiques des souches humaines est maintenant très utilisée pour la détection des astrovirus. Sa sensibilité est supérieure à celle de l'immuno enzymologie. Les amorces sont choisies dans les régions les plus conservées du génome comme la région 3' non codante, la région de l'ARN polymérase ou l'ORF 1b. La région de la capsidie peut aussi être ciblée mais plusieurs paires d'amorces doivent être utilisées pour amplifier tous les types d'astrovirus.

## 3.2. Diagnostic dans l'environnement

Les systèmes de détection des astrovirus dans les eaux font appel à la RT-PCR avec une étape préalable de concentration virale par rétention sur des colonnes de filtration (Pinto *et al.* 1996) ou par culture cellulaire (Marx *et al.* 1995, Chapron *et al.* 2000). Des techniques moléculaires quantitatives en temps réel ont également été développées et ont permis de montrer la fréquence des astrovirus dans les eaux usées mais aussi en sortie de station d'épuration (Le Cann *et al.* 2004).

## 3.3. Diagnostic dans les aliments

Les stratégies basées sur les techniques de RT-PCR qualitatives ou quantitatives utilisées pour la détection des astrovirus dans l'environnement sont potentiellement utilisables sur des échantillons alimentaires. Dans les coquillages, plusieurs méthodes basées soit sur une extraction tissulaire suivie d'une concentration des virus, soit sur une digestion enzymatique des tissus permettent la détection des astrovirus (Traoré *et al.* 1998, Legeay *et al.* 2000, Le Guyader *et al.* 2000). Ces méthodes sont appliquées soit sur la totalité des tissus des coquillages (Traoré *et al.* 1998) soit uniquement sur les tissus digestifs (Legeay *et al.* 2000, Le Guyader *et al.* 2000).

## 4. Épidémiologie et systèmes de surveillance

### 4.1. Systèmes de surveillance

**Surveillance clinique** : en France, ce n'est pas une maladie à déclaration obligatoire. En l'absence de Centre National spécifique, le Centre National de Référence est celui des virus entériques au Centre Hospitalier Universitaire de Dijon.

**Surveillance des aliments** : il n'existe pas de système de surveillance spécifique de la contamination des aliments par les astrovirus. En cas de toxi-infection alimentaire collective (TIAC), la déclaration est obligatoire. Une enquête épidémiologique et vétérinaire est alors réalisée pour identifier les aliments responsables et les facteurs favorisants et prendre des mesures spécifiques pour prévenir les récurrences. En parallèle, l'Ifremer a été nommé Laboratoire National de Référence (LNR) pour le contrôle des contaminations virales des mollusques bivalves.

### 4.2. Statut épidémiologique et prévalence

Les infections à astrovirus ont une distribution mondiale. L'implication des astrovirus comme agent étiologique de gastroentérites a été bien établie. Les infections sont plus fréquentes en hiver et atteignent surtout les jeunes enfants. Les astrovirus ont été détectés, de façon sporadique ou épidémique, chez les enfants diarrhéiques dans les hôpitaux, les consultations pédiatriques, les crèches. Les infections à astrovirus sont d'origine communautaire ou nosocomiale, parfois associées à d'autres agents étiologiques. Selon la méthode de détection employée et les caractéristiques de la population, la fréquence des infections varie de 2,5 % à 9 %. Les fréquences les plus faibles sont observées en milieu hospitalier car la symptomatologie modérée des infections à astrovirus conduit rarement à une hospitalisation.

Les astrovirus représentent également une étiologie fréquente de diarrhées chez les personnes âgées et les immunodéprimés. Les rares infections symptomatiques de l'adulte sont dues à des sérotypes autres que le sérotype 1.

L'homme est le seul agent de multiplication des astrovirus. Il faut prendre en compte le fait que l'excrétion virale peut précéder les symptômes et se prolonger plusieurs jours après la fin de la diarrhée. En outre, il existe de nombreux porteurs asymptomatiques qui excrètent du virus.

La circulation des astrovirus dans l'environnement, notamment dans les eaux usées ou épurées, a été fréquemment rapportée (Marx *et al.* 1995, Pinto *et al.* 1996, Chapron *et al.* 2000, Le Cann *et al.* 2004).

## 5. Mode de dissémination

Il n'y a pas de vecteur animal pour les astrovirus humains. Chez l'animal, les astrovirus ont été retrouvés dans les selles de nombreuses espèces (chats, chiens, veaux, chevreuils, porcs, souris) et les études de pathogénicité ont montré que les astrovirus pouvaient induire des gastroentérites de gravité variable chez le mouton, le porc, les dindons et même des hépatites mortelles chez le caneton. Les infections à astrovirus sont spécifiques d'espèces.

La transmission des astrovirus humains s'effectue par la voie féco-orale par contact inter individuel, par l'intermédiaire d'objets ou de surfaces souillés, ou par des aliments ou de l'eau contaminés. Les aliments peuvent être contaminés par contact avec de l'eau, un objet ou une personne qui jouera alors le rôle de vecteur.

**Aliments** : le lavage des fruits et légumes avec de l'eau souillée ou la manipulation des aliments avec des mains souillées sont les principales sources de contamination des aliments. Les coquillages filtreurs peuvent concentrer les astrovirus à partir d'eau douce ou d'eau de mer contaminée et constituer ainsi un risque sanitaire lorsqu'ils sont consommés crus ou peu cuits.

### 5.1. Réservoir

L'homme est le seul réservoir des astrovirus humains.

### 5.2. Zoonose

On a décrit des astrovirus dans d'autres espèces que l'homme (bovins, porcins, félins, ovins, canards, dindes, etc.) mais il n'y a pas de passage de ces virus animaux à l'homme.

### **5.3. Vecteurs**

Aucun vecteur n'a été mis en évidence.

### **5.4. Mode de contamination des aliments et de l'eau**

L'homme est la principale source de virus. La personne infectée peut propager le virus par ses mains sales ou bien contaminer les eaux usées par ses selles. Les aliments peuvent être contaminés à la source, lors d'irrigation ou de traitements de fertilisation, ou lors de leur préparation par contamination humaine.

## **6. Survie de l'agent infectieux**

### **6.1. Sensibilité aux médicaments**

Aucun traitement spécifique disponible à ce jour.

### **6.2. Sensibilité aux traitements de désinfection**

Les particules virales, non enveloppées, ne sont pas détruites par le chloroforme, les détergents et les solvants des lipides.

La sensibilité des astrovirus aux désinfectants n'est pas connue.

### **6.3. Survie dans l'environnement**

Les particules virales sont stables à pH 3, et à une température de 60°C pendant 5 min.

## **7. Dangers spécifiques liés à la manipulation pour le personnel de laboratoire et modalité de prévention**

### **7.1. Infections acquises au laboratoire**

Le risque est faible pour le personnel à condition de respecter les règles élémentaires d'hygiène.

### **7.2. Sources et échantillons**

Prélèvements de selles, prélèvements de l'environnement (eaux usées, etc.). Le risque pour le personnel de laboratoire est faible mais certains échantillons de selles peuvent contenir un nombre élevé de particules virales (jusqu'à 10<sup>10</sup> particules par mL).

### **7.3. Dangers primaires**

Ingestion de matières contaminées.

### **7.4. Classe de confinement**

Niveau de confinement 2.

### **7.5. Précautions particulières**

Manipulation de matériel contaminé selon les règles d'hygiène : gants et vêtements de protection.

### **7.6. Déversements accidentels**

Laisser retomber les aérosols, mettre gants et vêtements de protection, appliquer de l'eau de Javel de la périphérie vers le centre, laisser en contact 30 minutes avant de nettoyer.

### **7.7. Élimination**

Déchets à risques infectieux : incinération ou autre méthode validée d'inactivation.

## 7.8. Entreposage

Les échantillons seront conservés de préférence à – 80° C.

## 7.9. Évaluation de la viabilité

L'évaluation de la viabilité peut se réaliser par des tests de culture cellulaire.

## 8. Immunisation naturelle, vaccinale

L'acquisition des anticorps anti-astrovirus est précoce dans l'enfance et des anticorps anti astrovirus peuvent être détectés dans les lots d'immunoglobulines polyvalentes commercialisées. Environ 50 % des enfants de 5 à 12 mois ont des anticorps anti sérotype 1 (Koopmans *et al.* 1998). Les anticorps spécifiques des sérotypes plus rares, tels les sérotypes 4 et 6 sont acquis beaucoup plus lentement (Kriston *et al.* 1996).

Les mécanismes immunitaires des infections à astrovirus sont mal connus, notamment l'existence d'une immunité naturelle croisée entre les sérotypes.

### 8.1. Prophylaxie spécifique

Pas de vaccin disponible à l'heure actuelle.

### 8.2. Prophylaxie non spécifique

Mesure d'hygiène classique : lavage des mains avec des solutions hydroalcooliques, changement de blouse ou utilisation de surblouse à usage unique, utilisation de gants, nettoyage des surfaces et isolement des personnes ayant une gastroentérite.

## 9. Modèles d'études expérimentaux

### 9.1. *In vitro*

La culture est difficile et la présence de trypsine est indispensable pour que l'infection soit productive. L'adaptation à la culture cellulaire de certaines souches d'astrovirus sur des cellules embryonnaires humaines, sur une lignée continue de cellules de rein de singe, et sur diverses lignées cellulaires coliques d'origine humaine a permis l'étude du pouvoir pathogène.

### 9.2. *In vivo*

Aucun modèle d'étude *in vivo* n'est disponible. L'infection étant spécifique d'espèces, il n'existe pas de modèle animal pour l'infection humaine. La connaissance de la pathogénie chez l'homme repose donc essentiellement sur les données acquises dans la population lors d'épidémies, sur l'extrapolation de résultats obtenus sur l'animal avec des souches animales et sur les études chez les volontaires.

## Références

Appleton H, Higgins PG. Viruses and gastroenteritis in infants. *Lancet* 1975 ; i : 1927.

Chapron CD., Ballester NA., Fontaine J., Frades C. and Margolin AB. Detection of astroviruses, and adenoviruses types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 2520-2525.

Chapron CD., Ballester NA. and Margolin AB. The detection of astrovirus in sludge biosolids using a integrated cell culture nested PCR technique. *J Appl Microbiol* 2000; 89:11-15.

Cox G, Matsui SM, Lo R. Etiology and outcome of diarrhea after marrow transplantation: a prospective study. *Gastroenterology* 1994; 107:1398-1407.

Koopmans MP, Bijen MH, Monroe SS, Vinje J. Age-stratified seroprevalence of neutralizing antibodies to astrovirus types 1 to 7 in humans in the Netherlands. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998; 5 : 33-7.

- Kriston S, Willcocks MM, Carter MJ, Cubitt WD. Seroprevalence of astrovirus types 1 and 6 in London, determined using recombinant virus antigen. *Epidemiol Infect* 1996; 11 : 159-164.
- Kurtz JB, Lee TW, Craig JW, Reed SE. Astrovirus infection in volunteers. *J Med Virol* 1979; 3 : 221-30.
- Kurtz JB, Lee TW, Parsons AJ. The action of alcohols on rotavirus, astrovirus and enterovirus. *J Hosp Infect* 1980; 1 : 321-5.
- Le Cann P., Ranarijaona S., Monpoeho S., Le Guyader F. and Ferre V. Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. *Res Microbiol* 2004; 155: 11-15.
- Legeay O, Caudrelier Y, Cordevant C, Rigottier-Gois L, Lange M. Simplified procedure for detection of enteric pathogenic viruses in shellfish by RT-PCR. *J Virol Methods*. 2000; 90:1-14.
- Le Guyader F, Haugarreau L, Miossec L, Dubois E, Pommepuy M. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66:3241-8.
- Madeley CR, Cosgrove BP. 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet* 1975; 2 : 451-2.
- Marx FE, Taylor MB, Grabow WOK. Optimization of a PCR method for the detection of astrovirus type 1 in environmental samples. *Wat Sci Tech* 1995 ; 31 : 359-62.
- Midthun K, Greenberg HB, Kurtz JB, Gary W, Lin FC, Kapikian AZ. Characterization and seroepidemiology of a type 5 astrovirus associated with an outbreak of gastroenteritis in Marin County, California. *J Clin Microbiol* 1993; 31 : 955-62.
- Mitchell DK, Van R, Morrow AL, Monroe SS, Glass RI, Pickering LK. Outbreaks of astrovirus gastroenteritis in day care centers. *J Pediatr* 1993; 123:725-32.
- Monroe SS, Stine SE, Gorelkin N, Herrmann JE, Blacklow NR, Glass RI. Temporal synthesis of proteins and RNAs during human astrovirus infection of cultured cells. *J Virol* 1991; 65 : 641-8.
- Pinto RM, Abad FX, Gajardo R, Bosh A. Detection of infectious astroviruses in water. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62 : 1811-3.
- Risco C, Carrascosa JL, Pedregosa AM, Humphrey CD, Sanchez-Fauquier A. Ultrastructure of human astrovirus serotype 2. *J Gen Virol* 1995; 76 : 2075-80.
- Traore O, Arnal C, Mignotte B, Maul A, Laveran H, Billaudel S, Schwartzbrod L. Reverse transcriptase PCR detection of astrovirus, hepatitis A virus, and poliovirus in experimentally contaminated mussels: comparison of several extraction and concentration methods. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64:3118-22.
- Willcocks MM, Brown TDK, Madeley CR, Carter MJ. The complete sequence of human astrovirus. *J Gen Virol* 1994; 75 : 1785-8.

## 1. Agent infectieux

### 1.1. Nom scientifique

Human adenovirus F ou Human adenovirus 40, 41.

### 1.2. Acronyme

HAdV (AdV-40, 41).

### 1.3. Nom usuel

Adénovirus.

### 1.4. Caractéristiques

#### • Classification

Les adénovirus appartiennent au genre *Mastadenovirus* et à la famille des *Adenoviridae*. Il existe plus de 50 sérotypes d'adénovirus. Ces sérotypes sont classés en 6 espèces (A à F) en fonction à la fois de leurs propriétés biologiques (hémagglutinine) et de leur génome. Seuls les adénovirus de sérotype 40 et de sérotype 41 sont responsables de diarrhées. Les adénovirus 40 et 41 sont regroupés au sein de l'espèce adénovirus F.

#### • Caractéristiques

Ce sont des virus **non enveloppés**, à **ADN** double brin et linéaire de 35,9 kbp. La capsid a une symétrie icosaédrique et mesure 70 à 90 nm de diamètre. Les sommets de la capsid sont composés de pentons qui portent des fibres caractéristiques. A la différence des autres adénovirus, les adénovirus F possèdent 2 types de fibres, et non un seul, différentes par leur taille et leur nombre d'acides aminés (Favier *et al.* 2002). Les hexons, protéine principale de la capsid, ont des déterminants antigéniques communs à tous les adénovirus humains.

### 1.5. Maladie correspondante

Les infections à adénovirus 40 et 41 sont responsables de gastroentérites (de Jong *et al.* 1983) parfois accompagnées de signes respiratoires.

## 2. Pouvoir pathogène

### 2.1. Physiopathologie

Les adénovirus F ont un tropisme digestif où ils s'y multiplient. Les relations entre adénovirus et gastroentérites sont anciennes et ont fait l'objet de travaux contradictoires ; ces virus étaient également retrouvés dans les selles de patients présentant une pathologie extra-intestinale. Finalement, l'observation en microscopie électronique d'adénovirus « non cultivables » (aujourd'hui classés parmi les types 40 et 41) chez les enfants diarrhéiques a redonné une importance à ces virus dans ces pathologies digestives. Cependant, le mécanisme de la diarrhée est inconnu.

### 2.2. Dose infectieuse

La dose infectieuse minimale n'est pas connue.

### 2.3. Mode de contamination

Le mode principal de transmission des adénovirus de l'espèce F est la voie fécale-orale. Les adénovirus étant résistants en milieu extérieur, ils peuvent être transmis par les eaux de surface, des objets souillés ou les mains.

## 2.4. Groupes à risque

Il n'y a pas à proprement parler de groupes à risque en dehors des collectivités où la diffusion du virus de personne à personne est plus facile.

## 2.5. Période d'incubation

La période d'incubation est d'environ 3 à 10 jours.

## 2.6. Manifestations cliniques

(Bereciartu *et al.* 2002 ; Chikhi-Brachet *et al.* 2002).

Les infections à adénovirus 40 et 41 sont en général modérées avec nausées, vomissements et diarrhées. Elles surviennent après une incubation de 3 à 10 jours. L'épisode infectieux dure habituellement 10 à 12 jours. Les vomissements sont fréquents (80 %) et surtout présents au début des symptômes (2 premiers jours). Des signes respiratoires peuvent être associés dans 20 % des cas. L'infection concerne surtout les enfants au cours des 4 premières années de la vie. Les adénovirus représentent 2 à 15 % des causes de gastroentérites nécessitant une hospitalisation et dans 2/3 des cas, il s'agit des adénovirus 40 et 41.

La période d'infektivité des adénovirus 40 et 41 est importante pendant toute la durée des signes cliniques. Cependant, ils peuvent aussi être excrétés de façon prolongée dans les selles après guérison de l'infection. De plus ces virus sont capables de persister dans le tissu lymphoïde et de se réactiver ultérieurement

Les infections pulmonaires sont possibles mais elles sont peu importantes et souvent associées à l'atteinte intestinale.

Les infections asymptomatiques sont fréquentes avec présence de virus dans les selles.

Chez les enfants immunodéprimés, les symptômes sont plus importants et peuvent persister plus longtemps (plusieurs semaines).

## 3. Stratégies du diagnostic

### 3.1. Diagnostic chez l'homme

Le diagnostic de l'infection chez l'homme repose sur la recherche de ces virus dans un prélèvement de selles. Les adénovirus 40 et 41 sont de culture difficile et ne se multiplient pas sur les lignées cellulaires usuelles (MRC-5, HEp-2, etc.) ; ils peuvent néanmoins être cultivés sur cellules 293 (cellules HEK transformées par un adénovirus de type 5).

Il existe des tests permettant de détecter les antigènes de ces virus dans des extraits de selles (Chikhi-Brachet *et al.* 2002 ; Simpson *et al.* 2003). Ils reposent sur des techniques ELISA, sur des agglutinations de particules sensibilisées ou bien sur des techniques d'immunochromatographie. Certaines trousse de diagnostic direct permettent la détection combinée des adénovirus et des rotavirus, autre agent étiologique important de diarrhée virale. Malheureusement, la plupart de ces techniques utilise des anticorps anti-hexons qui reconnaissent l'ensemble des adénovirus humains et ne sont donc pas d'un grand intérêt pour la détection des adénovirus responsables de gastroentérites, seuls quelques tests sont spécifiques des adénovirus 40 et 41 et il s'agit principalement de trousse ELISA.

Par ailleurs, il est possible de rechercher par microscopie électronique la présence d'adénovirus dans des selles, ces virus ayant une structure très particulière. Cependant, cette technique est peu sensible, lourde et fastidieuse. Cette technique ne différencie pas les adénovirus 40 et 41 des autres types d'adénovirus qui, bien qu'excrétés dans les selles, ne sont pas à l'origine de gastroentérites.

Des techniques de biologie moléculaire permettant de détecter l'ADN des adénovirus 40 et 41 après amplification par PCR sont développées mais restent réservées à des laboratoires spécialisés (Allard *et al.* 2001, Simpson *et al.* 2003). Elles sont plus utilisées pour caractériser une souche virale et ont donc un intérêt essentiellement en recherche épidémiologique.

En pratique, la recherche des adénovirus 40 et 41 dans les prélèvements biologiques (selles) est effectuée soit par la recherche d'antigènes soit par amplification génique.

Compte tenu du risque nosocomial de ces infections, le dépistage systématique des virus entériques pourrait être effectué à l'admission par des tests rapides de détection d'antigènes et le résultat fourni rapidement permettrait l'isolement de l'enfant.

Chez l'immunodéprimé, la recherche d'adénovirus dans les selles fait partie du suivi virologique systématique pratiqué une ou deux fois par semaine, surtout chez les patients recevant une greffe de moelle qui sont à risque d'infection grave à adénovirus. Dans ce cas, le recours à l'amplification génique est justifié dans les prélèvements tels que le sang ou les biopsies. Cependant les adénovirus 40 et 41 sont rarement impliqués dans ce type d'infection généralisée car ils passent rarement la barrière intestinale.

Sur le plan épidémiologique, les méthodes moléculaires permettent de différencier les souches d'adénovirus entre elles si le contexte clinique rend nécessaire cette investigation : épidémie dans un service hospitalier nécessitant la recherche d'une source de contamination. Il existe ainsi des trousse commercialisées couplant une amplification génique à une hybridation avec des sondes spécifiques d'espèce.

### **3.2. Diagnostic dans l'environnement**

La recherche de ces virus dans l'environnement ou dans les aliments est possible dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques. Les méthodes de culture sur cellules et de biologie moléculaire sont alors effectuées (Pina *et al.* 1998 ; Chapron *et al.* 2000).

### **3.3. Diagnostic dans les aliments**

La recherche de ces virus dans les aliments est possible par des méthodes de culture sur cellules et de biologie moléculaire.

## **4. Épidémiologie et systèmes de surveillance**

### **4.1. Systèmes de surveillance**

Il n'y a pas de système de surveillance spécifique des adénovirus. Les gastroentérites (virales ou bactériennes) sont recensées par les médecins appartenant au réseau « Sentinelle ». Les investigations virologiques sont faites par le Centre National de Référence des virus entériques (Laboratoire de virologie, CHU de Dijon) qui caractérise les virus impliqués dans les épidémies de gastroentérite, notamment les adénovirus.

Surveillance des aliments : le plus souvent le contrôle est indirect en utilisant des critères bactériologiques ou des phages.

### **4.2. Statut épidémiologique et prévalence**

Ces virus sont répandus dans le monde entier et sont à l'origine d'épidémies et de cas sporadiques. Les infections se produisent tout au long de l'année sans périodes de flambées précises. Ces virus sont présents dans l'environnement et ils ont été mis en évidence dans les eaux de surface.

Dans l'enfance, le virus est transmis par contact (mains sales) et passe rapidement d'enfant à enfant. Aussi après 4 ans, plus de 50 % des enfants ont des anticorps contre les adénovirus 40 et 41.

Les adénovirus 40 et 41 sont le 3<sup>e</sup> agent responsable de diarrhées infantiles après les rotavirus (responsable de plus de 50 % des cas) et les calicivirus. Les adénovirus 40 et 41 représentent environ 3 à 6 % des gastroentérites infantiles chez les enfants de moins de 4 ans.

## **5. Mode de dissémination**

### **5.1. Réservoir**

Il n'y a pas de réservoir animal, l'homme est le seul agent de multiplication de ces virus.

### **5.2. Zoonose**

Les adénovirus 40 et 41 sont spécifiques à l'homme.

### 5.3. Vecteurs

Aucun vecteur n'a été mis en évidence.

### 5.4. Mode de contamination des aliments et de l'eau

La contamination est interhumaine directe ou indirecte. Il n'a pas été démontré la présence d'adénovirus dans les aliments, cependant une transmission hydrique est possible.

## 6. Survie de l'agent infectieux

### 6.1. Sensibilité aux médicaments

Les gastroentérites virales à adénovirus 40 et 41 ne nécessitent habituellement pas la mise en place d'un traitement antiviral (Morfin *et al.* 2005).

### 6.2. Sensibilité aux traitements de désinfection

Beaucoup de données de la littérature ne concernent pas spécifiquement les adénovirus 40 et 41, ainsi les adénovirus sont inactivés par l'hypochlorite de sodium à 1,5° chlorométrique en 1 minute, le glutaraldéhyde à 2 % en quelques minutes le formaldéhyde et une association d'acide peracétique (0,2 %) et éthanol (80 %). Par contre ils ne sont pas inactivés par les ammoniums quaternaires, les iodophores tels que la polyvinylpyrrolidone iodée, l'eau oxygénée, le gluconate de chlorexidine, l'alcool isopropylique à 70 % (Sattar *et al.* 1989 ; Rutala *et al.* 2006).

Les adénovirus sont inactivés par la chaleur (56°C, 30 min).

Les adénovirus 40 sont inactivés par le chlore et les dérivés chlorés avec un CT compris entre 0,8 et 1,5 (Thurston-Enriquez *et al.* 2005b). Ils sont également inactivés par un traitement à l'ozone (Thurston-Enriquez *et al.* 2005a).

Les adénovirus humains de type 40 et 2 sont considérés comme les virus les plus résistants aux rayonnements UV à 254 nm pour une dose de 1 200 à 2 200 J/m<sup>2</sup>. Par exemple les doses pour obtenir un abattement de 3 log pour Adenovirus type 2 sont de 1 190 J/m<sup>2</sup> (Gerba *et al.* 2002 ; Thurston-Enriquez *et al.* 2003a).

### 6.3. Survie dans l'environnement

Les adénovirus peuvent persister dans le milieu extérieur. Leur élimination des surfaces cutanées souillées est difficile par un simple lavage des mains avec un savon et la plupart des antiseptiques n'est pas efficace ; il faut donc insister sur l'utilisation de gants pour éviter une contamination manuportée.

## 7. Dangers spécifiques liés à la manipulation pour le personnel de laboratoire et modalité de prévention

Les adénovirus 40 et 41 ne présentent pas de risque particulier pour la population adulte au laboratoire et les prélèvements doivent être manipulés selon les règles élémentaires d'hygiène et de sécurité en suivant les bonnes pratiques de laboratoire car ils appartiennent à la classe II des agents pathogènes. Il faut éviter la formation d'aérosol en utilisant des centrifugeuses protégées par exemple et effectuer toutes les manipulations dans un poste de sécurité microbiologique de classe II. Les prélèvements et le matériel ayant servi à la recherche des antigènes viraux ou à la culture doivent être décontaminés en fin de manipulation (stérilisation par la chaleur, incinération ou désinfection chimique).

### 7.1. Infections acquises au laboratoire

Risque négligeable de contamination du personnel de laboratoire.

### 7.2. Sources et échantillons

Essentiellement les fèces humaines.

### 7.3. Dangers primaires

Contact avec des matières biologiques contaminées.

#### **7.4. Classe de confinement**

Niveau de confinement 2.

#### **7.5. Précautions particulières**

Manipulation du matériel contaminé selon les règles d'hygiène : gants et vêtements de protection.

#### **7.6. Déversements accidentels**

Laisser retomber les aérosols, mettre gants et vêtements de protection, appliquer de l'eau de Javel de la périphérie vers le centre, laisser en contact 30 minutes avant de nettoyer.

#### **7.7. Élimination**

Les déchets contaminés doivent être éliminés en suivant le circuit septique et être incinérés.

#### **7.8. Entreposage**

Les contenants doivent être scellés, étanches, résistants et étiquetés correctement.

#### **7.9. Évaluation de la viabilité**

Elle peut se réaliser par des tests de culture cellulaire (cellules HEK-293).

### **8. Immunisation naturelle, vaccinale**

#### **8.1. Prophylaxie spécifique**

Il n'y a pas de prophylaxie vaccinale spécifique.

Les infections de l'enfance permettent l'apparition d'une immunité protectrice spécifique de sérotype qui est responsable de la faible importance de ces virus dans les diarrhées de l'adulte.

#### **8.2. Prophylaxie non spécifique**

Mesures d'hygiène classiques : lavage des mains avec des solutions hydroalcooliques, changement de blouse ou utilisation de surblouse à usage unique, utilisation de gants, nettoyage des surfaces et isolement des enfants ayant une gastroentérite.

### **9. Modèles d'études expérimentaux**

#### **9.1. *In vitro***

Les adénovirus 40 et 41 ne cultivent pas sur les cellules habituellement sensibles aux adénovirus. Ils ne cultivent que sur la lignée cellulaire HEK-293. Ces cellules dérivent des cellules primaires HEK transformées en lignée continue par Adenovirus 5 ; elles ont intégré dans leur génome les régions E1A et E1B de l'AdV5. Les cellules primaires de singe ont été utilisées mais la multiplication des adénovirus 40 et 41 y est difficile et peu productive.

#### **9.2. *In vivo***

Ces virus sont exclusivement humains et la seule méthode d'étude est la culture *in vitro* sur cellules adaptées. Il n'existe pas de modèle animal.

## Références

- Allard A, Albinsson B, Wadell G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol.* 2001 39 : 498-505.
- Bereciartu A, Bok K, Gomez J. Identification of viral agents causing gastroenteritis among children in Buenos Aires, Argentina. *J Clin Virol* 2002 ; 25 : 197-203.
- Chapron CD, Ballester NA, Fontaine JH, Frades CN, Margolin AB. Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Appl Environ Microbiol* 2000 ; 66 : 2520-2525.
- Chikhi-Brachet R, Bon F, Toubiana L, Pothier P, Nicolas JC, Flahault A, Kohli E. Virus diversity in a winter epidemic of acute diarrhea in France. *J Clin Microbiol* 2002 ; 40 : 4266-72.
- De Jong JC, Wigand R, Kidd AH, Wadell G, Kapsenberg JG, Muzerie CJ, Wermenbol AG, Firtzclaff RG. Candidate adenoviruses 40 and 41: fastidious adenoviruses from human infant stool. *J Med Virol.* 1983 ; 11 : 215-31.
- Favier AL, Schoehn G, Jaquinod M, Harsi C, Chroboczek J. Structural studies of human enteric adenovirus type 41. *Virology* 2002 ; 293 : 75-85.
- Gerba CP, Gramos DM, Nwachuku N. Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. *Appl Environ Microbiol.* 2002 ; 68 : 5167-9.
- Morfin F, Dupuis-Girod S, Mundweiler S, Falcon D, Carrington D, Sedlacek P, Bierings M, Cetkovsky P, Kroes ACM, van Tol MJD and Thouvenot D. Adenovirus susceptibility to antiviral drugs is species-dependant *in vitro*. *Antiviral Therapy* 2005 ; 10 : 225-229.
- Nwachuku N and Gerba CP. Emerging waterborne pathogens : can we kill them all ? *Curr Opin Biotech* 2004 ; 15 : 175-180.
- Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J, Girones R. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl Environ Microbiol.* 1998 ; 64 : 3376-3382.
- Rutala WA, Peacock JE, Gergen MF, Sobsey MD, Weber DJ. Efficacy of Hospital Germicides against Adenovirus 8, a Common Cause of Epidemic Keratoconjunctivitis in Health Care Facilities. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 ; 50 : 1419-24.
- Sattar SA, Springthorpe VS, Karim Y, Loro P. Chemical disinfection of non-porous inanimate surfaces experimentally contaminated with four human pathogenic viruses. *Epidemiol Infect* 1989 ; 102 : 493-505.
- Simpson R, Aliyu S, Iturriza-Gomara M, Desselberger U, Gray J. Infantile viral gastroenteritis: on the way to closing the diagnostic gap. *J Med Virol.* 2003 ; 70 : 258-62.
- Thurston-Enriquez JA, Haas CN, Jacangelo J, Gerba CP. Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by ozone. *Water Res.* 2005a ; 39 : 3650-6.
- Thurston-Enriquez JA, Haas CN, Jacangelo J, Gerba CP. Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by chlorine dioxide. *Appl Environ Microbiol.* 2005b ; 71 : 3100-5.
- Thurston-Enriquez JA, Haas CN, Jacangelo J, Riley K, Gerba CP. Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation. *Appl Environ Microbiol.* 2003a ; 69 : 577-82.
- Sites Internet : [www.tulane.edu/~dmsander/WWW/335/Adenoviruses.html](http://www.tulane.edu/~dmsander/WWW/335/Adenoviruses.html)

## 1. Agent infectieux

### 1.1. Nom scientifique

R.E.O. virus = Respiratoire, Entérique, Orphelin virus.

Ces virus sont rarement associés à des maladies humaines graves.

### 1.2. Acronyme

ReoV.

### 1.3. Nom usuel

Reo.

### 1.4. Caractéristiques

**Famille :** *Reoviridae*, genre Orthoréovirus, 3 sérotypes : 1 à 3 (T1L, T2J, T3D), mais 17 groupes génotypiques décrits. Les réovirus affectent essentiellement les vertébrés et les insectes (Nibert *et al.* 2001 ; Tyler *et al.* 1996.).

**Constitution :**

Acide nucléique : ARN bicaténaire segmenté (10 segments) de poids moléculaire  $10^7$  daltons.

Capside : icosaédrique double.

Symétrie : cubique.

Enveloppe : absente.

Capsomères : 92 capsomères (ce chiffre est encore contesté).

Diamètre : 60 à 80 nanomètres

- présence d'une hémagglutinine en surface spécifique de sérotype, supportée par une protéine de capsid externe de PM 42.000 daltons.
- 9 protéines Structurales de poids moléculaire allant de 34 000 à 155 000 d. dont 6 sont localisées dans le core (3 majeures et 3 mineures) et 3 dans la capsid externe (dont l'hémagglutinine) et :
- 2 protéines Non Structurales (PM : 36 000 et 75 000).

### 1.5. Maladie correspondante

Il s'agit de virus ubiquitaires tant dans leur distribution géographique que dans leur spectre d'hôte. Ils sont détectés habituellement dans les eaux stagnantes et les boues résiduaires (Dahling *et al.* 1989). Leur excrétion fécale se superpose à celle des bactéries entériques. Ces virus ont aussi été isolés chez d'autres animaux comme les singes, les vaches, cochons, chats, chiens, souris, oiseaux (Munz *et al.* 1979). Alors qu'ils peuvent être responsables de manifestations cliniques sévères chez les animaux, ils restent des virus orphelins quand ils sont détectés chez l'homme. De rares cas d'infection respiratoire haute et de diarrhée ont été observés chez l'enfant, ainsi que de très rares cas de méningites, myocardites et pneumonies (Jackson *et al.* 1962 ; Lerner *et al.* 1962 ; Giordano *et al.* 2002).

Aujourd'hui, il n'y a encore aucune certitude que ces virus soient responsables de pathologies cliniques bien définies chez l'homme (Sabin 1959 ; Stanley 1961).

## 2. Pouvoir pathogène

### 2.1. Physiopathologie

#### 2.1.1. Infections expérimentales chez l'animal

Ces virus sont étudiés pour leur pouvoir d'infection expérimentale chez les animaux (Margolis *et al.* 1971 ; Walters *et al.* 1963 ; Choi *et al.* 1990). Différents mammifères, lorsqu'ils sont infectés par un réovirus, peuvent développer des maladies sévères comme des encéphalites, des infections cardiaque, pulmonaires, hépatobiliaires, pancréatiques et intestinales (Tyler *et al.* 1996, Munz *et al.* 1979).

**ex. : souriceaux nouveau-nés** : par voie intra-cérébrale, le réovirus type 3 provoque une destruction des neurones sans atteinte des cellules épendymaires entraînant une encéphalite aiguë fatale. Les réovirus des types 1 et 2 provoquent par la même voie d'inoculation, une infection non mortelle avec atteinte des cellules épendymaires qui bordent la cavité ventriculaire du cerveau, entraînant l'apparition d'une hydrocéphalie (Hardy *et al.*, 1982).

#### 2.1.2. Chez l'homme

Le pouvoir pathogène est très mal connu du fait que le nombre de réovirus isolés chez l'homme est négligeable. Cependant, une étude sérologique réalisée chez les adolescents montre que de 50 à 80 % d'entre eux ont des anticorps neutralisants vis-à-vis des trois sérotypes (Hardy *et al.* 2005, Lerner *et al.* 1962).

Ces résultats sont confortés par ceux observés à partir des boues et des eaux résiduaires non traitées dans lesquelles la fréquence des réovirus est élevée (ex : 39/216 reovirus, soit 18 % des virus typés en 2003, avec une prévalence décroissante du type 1 au type 3). Il y a fort à parier que les virus excrétés par l'homme sont occultés parce qu'il n'est pas toujours facile de reconnaître l'ECP de ces virus. Au CNR-Lyon (CHU), par exemple, aucun réovirus n'a été isolé depuis 5 ans.

- La transmission est comparable à celle des entérovirus : manuportée, étant donnée l'excrétion fécale prolongée, mais aussi par voie aérienne (microgouttes de Pflücke).
- Les vecteurs de transmission sont l'eau de rivière ou les aliments (légumes, fruits) contaminés par une eau d'arrosage polluée par des réovirus.

Comme pour les entérovirus, la majorité des infections est inapparente (Tyler *et al.* 1996). Lorsqu'elles existent, ne sont rapportées que des infections respiratoires de la sphère ORL haute ou des gastroentérites (GA) bénignes (Jackson *et al.* 1962 ; Lerner *et al.* 1962 ; Giordano *et al.* 2002). Leur rôle dans les GA, comme pour celui des entérovirus est encore mal défini, contrairement au rotavirus qui fait partie de la même famille. D'ailleurs, ces réovirus ne sont pas classés dans le groupe de virus responsables de GA.

Ils ont été associés à des infections respiratoires hautes et basses, avec les mêmes restrictions que pour les GA. En résumé, chez l'homme, le pouvoir pathogène est très peu important.

### 2.2. Dose infectieuse

Dans cette maladie orpheline, l'administration de  $10^{7.7}$  TCID<sub>50</sub> n'a pas entraîné de symptômes chez 27 volontaires sains (Rosen *et al.* 1963).

### 2.3. Mode de contamination

Transmission par voie orale et respiratoire à partir de sources infectieuses. Les vecteurs de transmission sont l'eau de rivière ou les aliments (légumes, fruits) contaminés par de l'eau contaminée par des réovirus.

### 2.4. Groupes à risque

Il n'y a pas de groupe à risque.

### 2.5. Période d'incubation

Lors des infections expérimentales observées accompagnées de signes cliniques, la période d'incubation était de 24 à 48h (Rosen *et al.* 1963 ; Tyler *et al.* 1996).

## 2.6. Manifestations cliniques

Il s'agit d'un virus orphelin chez l'homme. Il n'y a pas de groupe à risque. Les infections existent, mais elles sont asymptomatiques. Lors d'épreuves d'infection expérimentale, seuls 30 % des patients infectés avec T1L ont développé un syndrome grippal. Le virus peut être détecté dans des prélèvements de nez, de selles. Aucun signe n'a été observé par ceux infectés avec T2J, et seul 1 des 8 patients infectés par T3D a fait une rhinite. Le virus était isolé des selles de la majorité (95 %) des patients (Rosen *et al.* 1963).

## 3. Stratégies du diagnostic

### 3.1. Diagnostic chez l'homme

Selles et rhinopharynx (Rosen *et al.*, 1979).

#### 3.1.1. Selles

##### • Inoculation sur Cellules

Les cellules les plus sensibles sont les cellules simiennes primaires ou à défaut les lignées cellulaires (ex : BGM). L'ECP est décrit comme étant lent (7-10 jours à 37°C, en moyenne) et difficile à visualiser. Les cellules deviennent grises et la nappe cellulaire se décolle de son support, sans réel ECP franc (complètement différent de celui des entérovirus). A la coloration, les inclusions sont exclusivement **cytoplasmiques** et **éosinophiles** en petites plaques, non homogènes comme celles que l'on peut voir avec les entérovirus.

##### • Détection par PCR

Cette technique est plus sensible que la culture mais n'est pas développée du fait de l'absence de pouvoir pathogène des virus humains (Lee et Jeong 2004).

#### 3.1.2. Prélèvements Rhino-Pharyngés

Les techniques sont identiques à celles utilisées pour les prélèvements de selles, mais il est important d'introduire l'écouvillon dans un milieu de transport enrichi en antibiotiques, antifongiques et additionné de sérum de veau fœtal et d'acheminer le prélèvement dans les 3-4 heures qui suivent l'écouvillonnage. En effet le nasopharynx est pauvre en substances organiques protectrices, à l'inverse des selles. La suite du diagnostic direct est identique à celle précédemment décrite.

### 3.2. Diagnostic dans l'environnement

La recherche de virus peut se faire dans des boues et des eaux résiduaires des STEP, comme sur des végétaux ou des fruits potentiellement contaminés.

Les virus doivent être concentrés à partir de ces deux types de prélèvements. Il existe pour cela une norme définie par l'AFNOR. En bref, la concentration des virus se fait par le Poly Ethylène Glycol (PEG 6000). La désinfection bactérienne et fongique est faite par le chloroforme qui ne détruit ni les réovirus, ni les entérovirus. La phase chloroformique est récupérée, le chloroforme est éliminé par bullage sous hotte chimique.

Les suspensions virales sont ensuite inoculées sur des cellules BGM (voir plus haut).

Le laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris qui isole les virus à partir des boues et des eaux résiduaires non traitées, donc riches en virus, inocule efficacement les échantillons sur cellules BGM et HEP2. Les plaques sont mises en incubateur à CO<sub>2</sub> et à 37°C pendant 10 jours.

### 3.3. Diagnostic dans les aliments

Pas de méthode décrite à notre connaissance. Il est possible d'utiliser les techniques décrites pour les prélèvements humains, ou de l'environnement.

## 4. Épidémiologie et systèmes de surveillance

### 4.1. Systèmes de surveillance

Il n'existe aucun système de surveillance dédié spécifiquement aux réovirus. En France, leur surveillance dans l'environnement est faite dans le cadre de celle organisée pour les entérovirus (CNR et LHVP).

## 4.2. Statut épidémiologique et prévalence

Virus endémique, retrouvé dans les eaux de surface et les eaux contaminées par rejets des stations d'épuration. Pas de notion de prévalence précise en France. Des données de séro-épidémiologie sont disponibles pour d'autres pays ; ces études ont toujours été ponctuelles.

## 5. Mode de dissémination

### 5.1. Réservoir

Pas de réservoir connu autre que l'homme. Les virus animaux ne sont pas transmissibles à l'homme.

### 5.2. Zoonose

Des réovirus sont détectés dans de nombreuses espèces mammifères. Il ne semble pas possible de faire de franchissement de barrière d'espèce.

### 5.3. Vecteurs

L'eau et les aliments contaminés. Les coquillages peuvent concentrer les virus. Comme il s'agit de virus orphelins, il est difficile de mettre en évidence des vecteurs sources d'épidémie ou d'infection.

### 5.4. Mode de contamination des aliments et de l'eau

/

## 6. Survie de l'agent infectieux

Les réovirus sont stables dans le milieu extérieur. Ils résistent longtemps à une température ambiante et à 4°C. Ils résistent aussi aux pH entre 2 et 9, et aux températures de 55°C (Clark *et al.* 2006 ; Tyler *et al.* 1996).

### 6.1. Sensibilité aux médicaments

Pas d'antiviraux.

### 6.2. Sensibilité aux traitements de désinfection

**Oxydants** : le chlore (eau de Javel à 800 ppm), inactive  $10^5$  UFP de réovirus 3 en 30s. En parallèle, le brome et l'iode sont aussi efficaces. La dilution de la javel (600 ppm) entraîne une réduction très significative de l'efficacité de la désinfection (seulement  $10^2$  UFP en 30 sec).

**Éthanol** : à 95 %, il inactive  $10^5$  UFP de réovirus 3 en 30s (dilution finale dans test 76 %). Par contre, l'éthanol à 70 % est inefficace lors d'une exposition de courte durée (dilution finale dans test 56 %).

**Autres produits chimiques** : le glutaraldéhyde à la concentration finale de 5 % est efficace, mais le degré d'efficacité n'est pas mesuré avec précision (pas de données chiffrées disponibles).

Des produits commerciaux ont aussi été évalués comme Wescodyne, One stroke Vesphene et Sonacide. Ils sont moins efficaces que l'éthanol ou le chlore concentrés ( $10^2$  UFP en 30s en moyenne pour ces produits).

Ces virus sont donc relativement résistants. Ils sont toutefois inactivés par une exposition longue à l'éthanol 70 % (au moins 1h), ou une exposition courte (30s) à l'éthanol à 95 %. Le désinfectant de choix semble être l'hypochlorite de sodium (800 ppm de chlorure).

L'idéal est d'utiliser une combinaison séquentielle de deux désinfectants pour réduire au maximum l'infectivité des réovirus.

Ils ne sont que partiellement inactivés par les UV. Il n'existe pas de données précises sur le degré d'abattement en fonction de l'exposition. Il est toutefois possible d'extrapoler leur sensibilité sur les données disponibles avec les rotavirus.

### **6.3. Survie dans l'environnement**

**Milieu extérieur :** le virus est sans enveloppe et donc très résistant dans les milieux extérieurs, y compris dans l'eau et les boues de Stations d'Épuration (STEP) dans lesquelles il est retrouvé avec grande fréquence (types 1 et 2 surtout, voir chapitre épidémiologie).

**Dans les excréments humains :** excrétion dans les selles pendant plusieurs semaines, dans le tractus respiratoire supérieur pendant 6 à 8 jours. Virémie transitoire de 24 à 48 heures.

## **7. Dangers spécifiques liés à la manipulation pour le personnel de laboratoire et modalité de prévention**

Ces virus étant des virus orphelins, il n'existe aujourd'hui aucun danger spécifique identifié pour ce qui concerne la manipulation de ces virus.

Ces virus sont hébergés exclusivement par l'homme. Le respect des règles d'hygiène permet d'éviter la transmission inter-humaine. Il est recommandé de respecter les règles du guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale (GBEA) lorsque l'on manipule des échantillons contaminés par des réovirus.

### **7.1. Infections acquises au laboratoire**

/

### **7.2. Sources et échantillons**

Les sources infectieuses sont les échantillons potentiellement contaminés.

### **7.3. Dangers primaires**

Aucun.

### **7.4. Classe de confinement**

Niveau de confinement 2.

### **7.5. Précautions particulières**

Manipulation de matériel contaminé selon les règles d'hygiène : gants et blouse de protection.

### **7.6. Déversements accidentels**

Laisser retomber les aérosols, mettre gants et vêtements de protection, appliquer de l'eau de Javel de la périphérie vers le centre, laisser en contact 30 minutes avant de nettoyer.

### **7.7. Élimination**

Les déchets contaminés doivent être éliminés en suivant le circuit septique et être incinérés.

### **7.8. Entreposage**

Le stockage à long terme doit être fait à -70°C pour être optimal.

### **7.9. Évaluation de la viabilité**

## **8. Immunisation naturelle, vaccinale**

Il n'existe pas de vaccin ni de schéma d'immunisation passive. Pour ce qui concerne l'immunisation naturelle, il semble que les anticorps soient protecteurs, et que le niveau de séroconversion soit de 80 % chez les adolescents vis-à-vis des 3 sérotypes.

### **8.1. Prophylaxie spécifique**

Aucune. Il n'existe pas de vaccin.

## 8.2. Prophylaxie non spécifique

Mesure d'hygiène classique : lavage des mains avec des solutions hydroalcooliques, changement de blouse ou utilisation de surblouse à usage unique, utilisation de gants, nettoyage des surfaces et isolement des personnes ayant une gastroentérite.

## 9. Modèles d'études expérimentaux

### 9.1. *In vitro*

Culture sur cellules. Les lignées de cellules les plus utilisées sont des fibroblastes de souris (L929) ainsi que la lignée de cellules Madin-Darby bovine kidney (MDBK), les cellules de rein de singe rhésus (LLC-MK2).

### 9.2. *In vivo*

Des études d'infection expérimentale chez l'homme ont été réalisées, montrant le faible pouvoir pathogène des réovirus. Chez l'animal, des modèles d'infection existent avec des effets pathogènes démontrés, mais ils ne concernent que des virus animaux qui ne sont pas transmissibles à l'homme.

## Références

Choi AH, Paul RW, Lee PW. Reovirus binds to multiple plasma membrane proteins of mouse L fibroblasts. *Virology*; 1990; 178: 316-320.

Clark KM, Wetzel JD, Gu Y, *et al.* Reovirus variants selected for resistance to ammonium chloride have mutations in viral outer-capsid protein Rho-3. *J Virol*, 2006; 80: 671-681.

Dahling DR, Safferman RS, Wright BA. Isolation of enterovirus and reovirus from sewage and treated effluents in selected Puerto Rican communities. *Appl Environ Microbiol*, 1989; 55: 503-506.

Giordano MO, Martinez LC, Isa MB, *et al.* Twenty year study of the occurrence of reovirus infection in hospitalized children with acute gastroenteritis in Argentina. *Pediatr Infect Dis J*, 2002; 9: 880-882.

Hardy DB, Rubin DN, Fields BM. Molecular basis of reovirus neurovirulence: role of the M2 gene in avirulence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982; 79: 1298-1302.

Jackson GG, Muldoon RL, Johnson GC *et al.* Contribution of volunteers to studies on the common cold. *Am Rev Respir Dis*, 1962; 88: 120-127.

Lee HK, Jeong YS. Comparison of total culturable virus assay and multiplex integrated cell culture – pcr for reliability of waterborne virus detection. *Appl Environ Microbiol*, 2004; 70: 3632-3636.

Lerner AM, Cherry JD, Klein JO, *et al.* Infections with reoviruses. *N Engl J Med*, 1962; 267: 947-952.

Margolis G, Kilham L, Gonatos N. Reovirus type III encephalitis: observations of virus-cell interactions in neural tissues. I. Light microscopy studies. *Lab Invest*, 1971; 24: 91-109.

Munz E, Reimann M, Ackermann E. Seroepidemiologic studies on reovirus infection of man, domestic and wild animals in Tanzania. *Acta Trop*, 1979; 3: 277-288.

Nibert ML, Schiff LA. Reovirus and their replication. In Knipe DM, Howley PM (Eds.), *Fields Virology*, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. 2001 : 1679-1728.

Rosen L, Evans HE, Spickard A. Reovirus infections in human volunteers. *Am J Hyg*, 1963; 77: 29-37.

Rosen L. Reoviruses. In Lenette EH, Schmidt NJ eds, *Diagnostic procedure for viral and rickettsial infections*. New York: American Public Health Association; 1979: 577-584.

Sabin AB. Reoviruses. A new group of respiratory and enteric viruses formerly classified as ECHO type 10 is described. *Sciences*, 1959; 130: 1387-1389.

Stanley NF. Reovirus, an ubiquitous orphan. *Med J Aust*, 1961; 42: 815-818.

Tai JH, Williams JV, Edwards KM, Wright PF, Crowe JE Jr, Dermody TS. Prevalence of reovirus-specific antibodies in young children in Nashville, Tennessee. *J Infect Dis*, 2005; 191: 1221-1224.

Tyler KL, Fields BN. Reoviruses.. In Knipe DM, and Howley PM (Eds.), *Fields Virology*, 3rd ed. Lippincott Raven, Philadelphia, Pa. 1996 : 1597-1623.

Walters MN, Joske RA, Leak PJ *et al.* Murine infection with reovirus. I. Pathology of the acute phase. *Br J Exp Pathol*, 1963; 44: 427-436.

## 1. Agent infectieux

### 1.1. Nom scientifique

*Human Enterovirus.*

### 1.2. Acronyme

HEV.

### 1.3. Nom usuel

Entérovirus.

### 1.4. Caractéristiques

Les entérovirus humains (HEV) font partie de la famille des *Picornaviridae*. Ce terme a été introduit en 1963 afin de regrouper sous une même entité les entérovirus et les rhinovirus (Rueckert 1996). Dans cette classification, le genre *Enterovirus* regroupait les trois sérotypes de poliovirus (PV1-3), les coxsackievirus A et B (CV-A et CV-B), les entérovirus et les echovirus (enteric cytopathogenic human orphan virus). Actuellement, la famille des *Picornaviridae* désigne des virus humains et animaux et regroupe les genres *Enterovirus*, *Rhinovirus*, *Cardiovirus*, *Hepatovirus* et *Aphovirus* (Rueckert 1996). Cette classification établie sur la base de données issues de la culture cellulaire a été récemment remodelée consécutivement à l'acquisition des données de la biologie moléculaire. La connaissance des génomes de ces picornavirus permet de les regrouper désormais en 9 genres (*Entero-*, *Rhino-*, *Cardio-*, *Apho-*, *Hepato-*, *Parecho-*, *Erbo-*, *Kobu-* et *Teschovirus*) et 20 espèces (King et Mills 2000) (Tableau 8).

Tableau 8 : classification actuelle des *Picornaviridae*

Genres	Espèces	Sérotypes	Commentaires
<i>Enterovirus (EV)</i>	EV humains A	12	11 CV-A et EV 71
	EV humains B	36	Échovirus, CV-B, CV-A9, EV69
	EV humains C	11	11 CV-A
	EV humains D	2	EV-68 et EV-70
	Poliovirus	3	
	EV bovins	2	
	EV porcins A	1	
	EV porcins B	2	
	EV simiens	20	Encore non classés
<i>Rhinovirus (RV)</i>	RV humains A	58	
	RV humains B	17	
<i>Cardiovirus</i>	Virus EMC	1	
	Virus EMT	3	
<i>Aphovirus</i>	Virus de la Rhinite équine A	1	
	Virus de la Fièvre Aphteuse (FMDV)	7	
<i>Hepatovirus</i>	V Hépatite A (VHA)	1	
<i>Parechovirus (PeV)</i>	Parechovirus humains	2	Anciens Échovirus 22 et 23
	Parechovirus « animal »	1	Virus Ljungan
<i>Erbovirus (ErV)</i>	Virus de la Rhinite équine B	1	
<i>Kobuvirus (KV)</i>	Virus Aichi	1	
<i>Teschovirus (TeV)</i>	TeV porcins	10	Anciens entérovirus porcins reclassés

D'après King et al. 1999

Seuls les entérovirus humains seront traités dans ce chapitre.

Les entérovirus (HEV) sont de petits virus d'un diamètre de 24 à 30 nm, d'un poids de  $8 \times 10^6$  à  $9 \times 10^6$  Daltons. Ils possèdent une capsidie à symétrie icosaédrique, sans enveloppe lipido-protéique. La densité des HEV est d'environ 1,32 à 1,35 g/cm<sup>3</sup> et leur coefficient de sédimentation varie de 150 à 160 Svedberg. Ce sont des virus résistants aux pH acides (d'où leur adaptation au système digestif), aux enzymes protéolytiques, ainsi qu'à divers agents anti-viraux connus (Melnick 1996).

La capsidie des entérovirus est composée de 60 protomères identiques, ou capsomères, chacun formés de 4 protéines structurales : VP1 (34 kDa), VP2 (30 kDa), VP3 (26 kDa) et VP4 (7 kDa) (Rueckert 1996). VP1, VP2 et VP3 forment entre elles une dépression, appelée « canyon », décrite comme le site d'attachement au récepteur cellulaire humain (Colston et Racaniello 1995 ; He *et al.* 2000). C'est leur capsidie qui confère leur résistance dans le milieu extérieur (Rueckert 1996).

Le premier génome d'entérovirus cloné et séquencé fut celui du poliovirus de type 1 (Kitamura *et al.* 1981). L'organisation génomique alors décrite s'avérait par la suite extrêmement conservée au sein de cette famille virale, avec cependant de grandes variabilités de taille du génome et de séquences nucléotidiques (Rueckert 1996).

Le génome des entérovirus est un simple brin d'ARN de polarité positive, c'est-à-dire que le génome viral peut être directement traduit en protéines virales par les cellules infectées, non coiffé, d'environ  $2,5 \times 10^6$  Daltons (Da) et d'approximativement 7 500 nucléotides (nt). Cette molécule comprend une extrémité 5' non codante d'environ 800 nt de long (5' NC, pour 5' Non Codante), un large cadre ouvert de lecture (ORF, Open Reading Frame) d'environ 6400 nt de long et une extrémité 3' polyadénylée, également non codante (3'NC), d'environ 300 nt de long. La région 5' NC est caractérisée par une structure secondaire extrêmement complexe et est liée de façon covalente à une petite protéine virale de 22 acides aminés (VPg) (Rueckert 1996). Le cadre ouvert de lecture code pour des protéines structurales (P1 ou de capsidie) et non structurales (P2 et P3).

Bien qu'encore sujette à interrogations, la morphogenèse entérovirale a été comprise grâce à l'étude de la capsidie du poliovirus (Basavappa *et al.* 1994). Tout débute par la libération des protéines de capsidie par les protéases virales (Hellen et Wimmer 1995). Ces protéines s'associent ensuite pour former un protomère, puis un pentamère (5 protomères), puis la procapsidie. L'ARN viral néosynthétisé s'associe ensuite avec cette capsidie immature pour former le provirion. L'encapsidation de l'ARN génomique est un processus exclusif, de telle sorte que ni l'ARN négatif, ni les ARNs cellulaires ne peuvent être encapsidés (Barclay *et al.* 1998). L'assemblage effectué, les particules virales s'accumulent dans le cytoplasme, sous forme de vésicules cristallines, puis sont ensuite libérées par éclatement des vacuoles à la surface des cellules. La libération des nouveaux virions est concomitante de la lyse cellulaire.

### 1.5. Maladie correspondante

De nombreuses pathologies sont associées aux entérovirus. Les maladies prototypes sont la poliomyélite antérieure aiguë et les méningites aseptiques.

## 2. Pouvoir pathogène

### 2.1. Physiopathologie

Les entérovirus sont des pathogènes largement ubiquitaires, présents dans toutes les régions du monde. Leur mode de transmission principal est oro-fécal (*via* des objets, aliments liquides ou solides souillés par la salive ou les matières fécales), ce qui explique une prévalence élevée des infections pendant la petite enfance, notamment dans les pays à bas niveau socio-économique et d'hygiène. Cette infection est différée à l'adolescence dans les pays industrialisés. La voie aérienne peut également intervenir dans la transmission de certains sérotypes ayant une prédilection pour le système respiratoire. Les infections à entérovirus peuvent être sporadiques mais évoluent fréquemment sur un mode épidémique, voire pandémique, durant les périodes estivo-automnales (Morens et Pallansch 1995). Le virus entre par la voie digestive et trouve dans l'oro-pharynx un premier site de réplication au niveau des organes lymphoïdes. Puis, cette réplication est suivie d'une diffusion de l'agent infectieux dans l'organisme par diffusion *via* la voie lymphatique. Les virus passent alors dans la grande circulation et donnent une virémie primaire. Cette virémie est associée à une infection hépatique et splénique. Après une courte réplication associée cliniquement à la spléno-hépatomégalie, il apparaît une virémie secondaire qui signe la phase d'état de l'infection.

En parallèle à cette diffusion dans l'organisme, le virus présent dans l'oropharynx diffuse aussi par voie entérique. Le virus est capable de franchir la barrière stomacale, puis atteint l'intestin grêle où il cible les plaques de Peyer,

nouveau site de réplication. Là aussi le virus diffuse dans la circulation lymphatique et peut passer dans la grande circulation. L'excrétion virale est souvent prolongée, pendant au moins 4 à 6 semaines. Chez le patient immunodéprimé, cette excrétion fécale peut être prolongée pendant plusieurs mois.

## 2.2. Dose infectieuse

Les doses infectieuses ne sont pas connues pour tous les sérotypes. Toutefois, il apparaît que la transmission des entérovirus peut se faire avec de faibles doses de virus. Des études expérimentales portant sur les souches vaccinales des poliovirus montrent que moins de 100 doses infectieuses sont susceptibles d'induire une infection chez la majorité des enfants non immuns. Une seule dose infectieuse est nécessaire lorsque le virus est introduit directement dans le tube digestif. À titre d'exemple, plusieurs études avec des entérovirus sont reprises dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 9 : informations actuellement disponibles sur les relations dose-infections de différents virus**

	Type de modèle	paramètres	Origine des données expérimentales	Référence de l'ajustement
Poliovirus I	Exponentiel	$r = 0,009102$	De 7 à 280 TCID <sub>50</sub> : données (Minor, Allen, Tsiatis, Nelson, D'Alessio, 1981) Étude sur nourrissons (souche vaccinale)	(Regli <i>et al.</i> 1991)
	Beta-poisson	$\alpha = 0,1097$ $\beta = 1\ 524$ (ou 200)	10 <sup>3</sup> à 10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> : données (Lepow, Warren, Ingram, Daugherty, Robbins, Cleveland, 1962) Étude sur nourrissons (souche vaccinale)	(Regli <i>et al.</i> 1991)
Poliovirus III	Beta-poisson	$\alpha = 0,409$ $\beta = 0,788$	1 à 10 TCID <sub>50</sub> : données (Katz, Plotkin, 1967) Étude sur nourrissons (souche vaccinale)	(Regli <i>et al.</i> 1991)
Échovirus 12	Beta-poisson	$\alpha = 0,374$ $\beta = 1\ 86,69$ <i>ou bien 1,3 et 75 haas 1983</i>	De 330 à 33 000 PFU : données (Schiff, Stefanovic, Young, Sander, Pennekamp, Ward, 1984) Étude sur adultes sains	(Regli <i>et al.</i> 1991) (Eisenberg <i>et al.</i> 2004)

NB : La correspondance entre unités n'est pas évidente, sauf l'approximation 1 PFU=1 FFU.

## 2.3. Mode de contamination

La transmission des entérovirus est d'autant facilitée que ces virus sont extrêmement résistants aux conditions extérieures telles que les pH acides, les températures extrêmes, l'humidité, ou la teneur en matières organiques. Ces propriétés assurent aux entérovirus une très bonne dissémination dans les sols, les eaux de surface ou encore les eaux usées de stations d'épuration (Morens et Pallansch 1995). Notons que les eaux de mer n'altèrent pas la dissémination des entérovirus qui sont alors susceptibles d'être captés par les mollusques filtreurs tels que les huîtres (Shieh *et al.* 1999).

## 2.4. Groupes à risque

La transmission nosocomiale a également été rapportée, notamment pour les Coxsackievirus B et echovirus 11, particulièrement redoutables chez les nouveau-nés (Mertens *et al.* 1982).

## 2.5. Période d'incubation

L'incubation de ces infections est courte, habituellement de moins de 1 semaine, mais pouvant aller jusqu'à 15 jours, notamment pour le poliovirus.

## 2.6. Manifestations cliniques

Les infections à entérovirus comptent parmi les plus fréquentes viroses humaines, pouvant conduire tant à des infections asymptomatiques qu'à des troubles cliniques sévères. Dans ce chapitre, nous ne traiterons que des infections aiguës.

L'incubation des pathologies liées aux entérovirus est estimée habituellement entre 2 et 14 jours sur le modèle de la poliomyélite antérieure aiguë.

Les *syndromes gastro-intestinaux* sont fréquemment rapportés lors d'infections à entérovirus sans que le mécanisme physio-pathogénique des diarrhées aiguës n'ait pu, à ce jour, être élucidé (Melnick 1996).

La *Poliomyélite Paralytique Aiguë* (PPA) : elle est la plus ancienne des entéroviroses humaines connues. Son éradication semble bien amorcée dans les pays développés, certaines régions du monde souffrant encore de problèmes de vaccination (Minor 2004). Classiquement associée aux trois sérotypes de poliovirus, seulement 1 à 2 % des personnes infectées par voie digestive développent cette forme nerveuse au cours de laquelle le poliovirus gagne le neurone moteur périphérique. Une paralysie musculaire flasque aiguë des membres concernés, ainsi qu'une atrophie musculaire surviennent dès la mort du neurone moteur. La paralysie des muscles respiratoires entraîne, dans bien des cas, la mort du patient (Blondel *et al.* 1998).

La *méningite lymphocytaire à liquide clair* : cette infection à entérovirus est, en terme de fréquence relative, la plus importante des entéroviroses (Sawyer 2002). Elle touche généralement les enfants et adolescents, et se traduit par un syndrome méningé, parfois accompagné de fièvres, de céphalées ou de raideur de la nuque. D'évolution favorable, cette infection évolue bien souvent sous un mode épidémique dont les echovirus sont les principaux acteurs (Rotbard 1995). Il est à noter l'existence de formes chroniques d'infections neuroméningées chez le sujet qui présente une déficience immunitaire (agammaglobulinémique).

Les *encéphalites* : évoluant le plus souvent sous forme sporadique, ces infections seraient vraisemblablement sous-évaluées, et associées bien souvent à des méningo-encéphalites. Contrairement aux méningites, ces infections peuvent être fatales ou laisser de graves séquelles neurologiques.

D'autres infections du système nerveux central telles que des *ataxies cérébelleuses*, des *syndromes de Guillain-Barré* et des *myélites transverses* ont également été associées à des infections à entérovirus (Chopra *et al.* 1986).

Les *infections généralisées du nouveau-né* : ces infections sont souvent sévères, voire fatales du fait de complications méningo-encéphalitiques, myocardiques, ou hépatiques (el-Sageyer 1998).

La *maladie de Bornholm* : encore appelée pleurodynie, myalgie épidémique, cette infection généralement associée aux coxsackievirus A et B, voire aux echovirus, entraîne des douleurs musculaires intenses de l'abdomen et/ou thorax, de la fièvre, souvent accompagnées de céphalées (Minor et Muir 2005).

Les *atteintes respiratoires hautes et basses* ont été décrites et se présentent comme des syndromes pseudo-grippaux évoluant sous forme épidémique chez les enfants qui développent alors des pneumonies et des bronchiolites (Chonmaitree et Mann 1995). Différents sérotypes peuvent être responsables de cette forme clinique.

Les *atteintes cardiaques* sont le reflet du cardiotropisme des entérovirus, en particulier des coxsackievirus B reconnus comme responsables des myocardites aiguës nécrisantes (Andréoletti *et al.* 2000).

Les *infections cutanéomuqueuses* à entérovirus concernent quasi-exclusivement les Coxsackievirus A16 et l'entérovirus 71, responsables respectivement du *syndrome « pied-main-bouche »* ou d'un *herpangine* (Minor et Muir 2005).

Des cas de *conjonctivites aiguës hémorragiques* ont été décrits suite à des épidémies, voire des pandémies, dues à un variant du coxsackievirus (CV-A24v) et à l'entérovirus 70 sur les continents africains, américains et asiatiques (Sawyer *et al.* 1989).

## 3. Stratégies du diagnostic

### 3.1. Diagnostic chez l'homme

Les recherches virologiques ont trois principales indications :

- le diagnostic d'une affection neuroméningée aiguë, d'une infection néonatale ou materno-fœtale, d'une myocardite ou péricardite aiguë ;
- le diagnostic différentiel d'une fièvre éruptive (chez la femme enceinte), de lésions cutanéomuqueuses atypiques, d'une méningo-encéphalite ;
- la surveillance des poliovirus et la distinction entre souches sauvages et souches vaccinales par l'identification des souches isolées.

Un bon prélèvement doit provenir du site de l'infection et avoir été réalisé le plus précocément possible à partir du début des signes cliniques.

Il peut s'agir :

- d'un liquide céphalorachidien ;
- d'un écouvillonnage de nez/gorge ;
- d'un prélèvement de selles/écouvillonnage anal ;
- de Biopsies/nécropsies, liquide péricardique, prélèvement de conjonctive, liquide de vésicule.

Deux techniques de détection des entérovirus sont utilisées :

- l'isolement du virus par inoculation à des cellules en culture *in vitro* manque de sensibilité pour certains prélèvements (LCR à cause d'une faible charge virale et d'une mauvaise conservation du pouvoir infectieux) et certains sérotypes (CV-A, entérovirus 68 à 71). Après observation de l'effet cytopathique à l'état frais, l'appartenance au genre entérovirus peut être confirmée par un anticorps monoclonal dirigé contre un antigène de groupe de la protéine de capsid VP1. La détermination du sérotype se fait par séroneutralisation de l'ECP soit par sérums monovalents soit par des pools croisés d'antisérums (pools de Lym Benyesh Melnick). La variabilité des isolats au cours du temps ne permet pas toujours d'identifier le type de l'entérovirus.
- la RT-PCR détecte le génome avec des sondes et amorces dirigées contre la région 5' non codante conservée au sein du genre *Enterovirus* (Lina *et al.* 1996). L'extraction de l'ARN est réalisée soit par la méthode phénol-chloroforme soit par adsorption sur colonne de silice. L'acide nucléique extrait est immédiatement soumis à une réaction de transcription inverse avant amplification de l'ADN complémentaire ainsi obtenu. Les techniques de RT-PCR en temps réel et en une étape tendent à remplacer les techniques dites standard en offrant la possibilité d'un diagnostic quotidien et en limitant les risques de contamination. La RT-PCR permet donc un diagnostic du genre sans caractérisation du sérotype. Le typage moléculaire de la souche peut être ensuite réalisé par amplification et séquençage de tout ou partie du gène codant pour la protéine de capsid VP1 (Oberste *et al.* 2000 ; Oberste *et al.* 2003). La séquence obtenue est ensuite confrontée à une banque de séquences déjà publiées (genbank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) et une homologie de plus de 80 % pour un fragment d'au moins 300 nucléotides détermine le génotype.

La recherche des anticorps est de peu d'intérêt pour le diagnostic des infections aiguës, elle a pour technique de référence la réaction de séroneutralisation du pouvoir infectieux en culture cellulaire, utilisant la souche du malade. Les techniques sérologiques autres (fixation du complément, ELISA) sont limitées par le grand nombre de sérotypes, l'existence de réactions croisées entre sérotypes et leur manque de standardisation.

### 3.2. Diagnostic dans l'environnement

Les techniques de recherche sont semblables à celles décrites pour les entérovirus. Il est possible de détecter les entérovirus par RT-PCR aussi bien dans les huîtres (Dubois *et al.* 2004) que dans les boues de stations d'épuration. L'isolement du virus sur cellule en culture reste la technique de référence car elle seule permet le typage de la souche dans l'optique d'une surveillance épidémiologique. En pratique, le titrage des entérovirus se réalise de la façon suivante : 100 g de boues sont mélangés à du tampon borate et de l'extrait de bœuf. Au surnageant de centrifugation est ajouté du polyéthylène glycol à deux reprises pour la concentration. La boue concentrée est inoculée sur cellules de rein de singe en lignée continue, pure et après 3 dilutions de raison 10. Il est à noter qu'un repiquage systématique cupule à cupule est fait à + 5 jours de culture pour mieux visualiser l'effet cytopathique (ECP) des entérovirus et mieux le distinguer de l'éventuelle action cytotoxique de la boue. La lecture des cupules se fait après 3 à 5 jours et le titre du virus est calculé en nombre le plus probable d'unité cytotoxique qui s'apparente au calcul des doses infectantes en culture de tissus 50 % (DICT<sub>50</sub>), c'est-à-dire un calcul statistique basé sur le nombre de cupules positives et négatives par dilution. Le titre obtenu est rapporté à 10 g de matière sèche. Le virus isolé peut ensuite être typé, ce qui n'est malheureusement pas exigé par la législation française.

### 3.3. Diagnostic dans les aliments

Deux facteurs importants doivent être pris en compte pour l'analyse des aliments : la contamination est souvent faible et les virus sont le plus souvent adsorbés sur des particules et/ou sous forme d'agglomérats. Une étape d'élution, consistant à modifier le pH du milieu, soit directement soit par un tampon, constitue la base de nombreuses méthodes. Par exemple, le développement récent d'une méthode pour analyser les framboises montre que ce point est capital. Pour les coquillages (bivalves filtreurs), les virus persistent essentiellement dans le tractus digestif et pour l'analyse, seuls ces organes sont utilisés (LeGuyader *et al.* 2000). Les virus libérés dans le surnageant de l'élution doivent ensuite être concentrés. Cette concentration peut se faire par précipitation, floculation organique, ultracentrifugation, filtration, lyophilisation... Cependant, pour des échantillons fortement contaminés, des méthodes basées sur une extraction directe des acides nucléiques ont été décrites.

## 4. Épidémiologie et systèmes de surveillance

### 4.1. Systèmes de surveillance

Il existe un centre de référence des entérovirus basé à Lyon (Pr Lina-Dr Chomel).

RSE : Réseau de surveillance des entérovirus (26 laboratoires volontaires sur le territoire métropolitain).

Réseau d'étude des virus d'origine alimentaire en Europe « Foodborne viruses in Europe ».

Réseau de surveillance et de recherche sur les entérovirus, qui implique 12 instituts du RIIP (*St Pétersbourg, Bucarest, Athènes, Paris, Tunis, Alger, Casablanca, Dakar, Abidjan, Yaoundé, Bangui et Antananarivo*).

Réseau des Centres collaborateurs OMS.

### 4.2. Statut épidémiologique et prévalence

Dans les pays tempérés, la circulation des entérovirus est maximale pendant les mois d'été (de la fin du printemps à la fin de l'automne). Certains sérotypes d'entérovirus sont plus épidémiogènes (CV-B, echovirus 11, 30...).

Le réservoir des entérovirus est humain, constitué surtout par les enfants infectés, malades ou non. Le virus est excrété à haut titre dans les selles, parfois de façon prolongée, et il persiste dans l'environnement. La transmission est donc fécale-orale, directe ou indirecte par l'alimentation, les coquillages ou l'eau contaminée. La transmission aérienne est possible de même que la transmission nosocomiale. Le non respect des règles d'hygiène universelle, en particulier la désinfection et le lavage des mains, est responsable de la diffusion des entérovirus, comme du virus de l'hépatite A.

## 5. Mode de dissémination

### 5.1. Réservoir

L'homme.

### 5.2. Zoonose

Le virus pourrait être une variante de certains virus d'animaux. Un potentiel zoonotique a été évoqué sur la base de ressemblances phylogénétiques, notamment pour le coxsackie B5 (identifiées chez le porc et l'homme).

### 5.3. Vecteurs

Aucun.

### 5.4. Mode de contamination des aliments et de l'eau

Les mollusques, crustacés et les salades peuvent être des sources indirectes de contamination de l'homme.

Les aliments peuvent alors être contaminés lors de la production. Ainsi, des coquillages élevés dans un site souillé par des rejets d'eaux usées peuvent concentrer les virus, tandis que les végétaux sont contaminés soit par apport de fertilisants d'origine humaine (encore utilisés dans certains pays), soit par de l'eau d'irrigation contaminée. Par ailleurs, les contaminations introduites lors de la préparation et des manipulations humaines ne doivent pas être négligées et sont de plus en plus mises en cause. Ainsi, le simple fait de prendre à main nue de la salade permet le transfert de 10 % des virus présents sur les doigts (Bidawid *et al.* 2000).

## 6. Survie de l'agent infectieux

Inactivé par une exposition à une température de 50°C pendant 2 heures; stable en milieu acide (pH : 3-5) ; stable sous l'effet de l'éther, inactivé à des températures ambiantes, inhibé par le chlorure de magnésium.

### 6.1. Sensibilité aux médicaments

Aucune, essais cliniques utilisant un antiviral appelé Pleconaril. Ce produit empêche la décapsidation du virus. Des essais cliniques ont été réalisés (Romero 2001), notamment pour le traitement des infections chroniques neuroméningées chez le sujet agammaglobulinémique (De Clercq 2002).

## 6.2. Sensibilité aux traitements de désinfection

Les entérovirus ont leur sensibilité aux désinfectants mesurée en fonction de résultats obtenus sur un virus prototype : le poliovirus de type 1. Ce virus résiste à des expositions courtes aux désinfectants d'usage courant comme l'éthanol à 70 %, le lysol à 5 % ; les composés d'ammonium quaternaire à 1 %. Ils sont par contre inactivés rapidement par le formol à 3 %, le glutaraldéhyde à 2 % avec traitement prolongé (réduction de 3 log en 30 min), et sont sensibles à l'hypochlorite de sodium à 1 % (Pavoni *et al.* 2004). Ces virus sont totalement inactivés en 10 min par des solutions à 2 % d'iode. Avec une solution comportant 1 mg de chlore par L, le titre infectieux est réduit de 4 log en 5 minutes.

L'hypochlorite de sodium à 1 mg/L réduit de 4 log le titre infectieux de poliovirus en 60 min.

L'acide peracétique est aussi efficace à pH neutre et à température ambiante ; la réduction du titre est d'1 log en 10 min et de 2,5 log en 60 min.

Des essais de comparaison de résistance vis-à-vis des désinfectants entre les poliovirus et les non-poliovirus ont montré que le poliovirus était plus résistant que le CV-B5 ou l'échovirus 30.

## 6.3. Sensibilité aux UV

Le poliovirus est inactivé par l'exposition aux rayonnements Ultraviolets. Ainsi, il a été mesuré que la dose d'UV de 10 000 uW sec/cm<sup>2</sup> réduisait de 2 log le titre infection, et qu'une exposition à 22 000 uW sec/cm<sup>2</sup> la réduisait de 5 log (Ma *et al.* 1994).

## 6.4. Survie dans l'environnement

Les mollusques récoltés dans les eaux de rivières contaminées par des excréments humains ou animaux peuvent héberger des virus pathogènes pour l'homme. Des entérovirus ont été mis en cause dans des maladies associées à des poissons ou fruits de mer. Tous les virus transmis par les poissons et fruits de mer causant des maladies sont transmis par le cycle fécal-oral et la plupart des poussées de gastroentérite virale ont été associées à la consommation de mollusques ou crustacés contaminés, particulièrement les huîtres crues. Généralement, les virus sont spécifiques des espèces et n'apparaîtront pas, ni ne se multiplieront dans des aliments ou ailleurs, hors de la cellule hôte. Il n'y a pas de marqueur fiable pour indiquer la présence du virus dans les eaux où sont récoltés les mollusques. Il est possible de réduire au minimum les cas de gastroentérite virale en contrôlant la contamination par les eaux usées des zones conchylicoles et en surveillant, avant la récolte, les mollusques et les eaux dans lesquelles ils se développent ainsi qu'en contrôlant d'autres sources de contamination durant la transformation. L'épuration et le reparcage sont d'autres stratégies mais les mollusques contaminés mettent plus de temps à se débarrasser d'une contamination virale que des bactéries. Le traitement thermique (85-90°C pendant une minute et demie) détruira les virus présents dans les mollusques.

## 7. Dangers spécifiques liés à la manipulation pour le personnel de laboratoire et modalité de prévention

### 7.1. Infections acquises au laboratoire

Le principal danger est lié à la détection des poliovirus. Pour cela, il est indispensable de vérifier régulièrement l'état vaccinal. Les cas d'infection au laboratoire sont exceptionnels.

### 7.2. Sources et échantillons

Prélèvements de liquide céphalorachidien, de gorge et de selles. Plus rarement prélèvements et produits de racleage de la conjonctive (conjonctivite aiguë hémorragique) ou de vésicules (herpangine, pied-main-bouche).

Boues de stations d'épuration, eaux ou aliments souillés.

### 7.3. Dangers primaires

Inoculation parentérale accidentelle ; ingestion, contact direct de la peau ou des muqueuses avec des cultures, gouttelettes ou liquides organiques infectieux, contact indirect des muqueuses avec du matériel infecté.

### 7.4. Classe de confinement

Niveau de confinement 2. Méthodes, matériel et installations de confinement du niveau de biosécurité 2 (BSL2) pour tous les travaux réalisés avec le virus ou avec des liquides ou tissus organiques infectieux.

### 7.5. Précautions particulières

Blouse de laboratoire, gants si le contact direct avec le matériel infectieux est inévitable; gants et blouse serrée aux poignets et attachant dans le dos pour les travaux réalisés dans l'enceinte de sécurité biologique. Se laver les mains à fond avec un savon antiseptique.

### 7.6. Déversements accidentels

Pas d'information.

### 7.7. Élimination

Décontaminer tous les déchets avant de les éliminer; stérilisation par la vapeur, désinfection chimique, incinération.

### 7.8. Entreposage

En contenants scellés étiquetés de manière appropriée.

### 7.9. Évaluation de la viabilité

/

## 8. Immunisation naturelle, vaccinale

Aucune prophylaxie à l'exception des poliovirus.

### 8.1. Prophylaxie spécifique

Le traitement préventif de la poliomyélite par la vaccination est essentiel. Cette vaccination est obligatoire en France. On dispose d'un **vaccin inactivé** (Salk-Lépine) fait de poliovirus des trois sérotypes dont le pouvoir infectieux a été détruit par action du b propiolactone qui est un antiseptique. La vaccination se fait en trois injections (presque toujours en association à d'autres vaccins) avec rappel après un an et tous les cinq ans ensuite chez l'enfant, puis tous les dix ans chez l'adulte. Il est sage de poursuivre les rappels chez les personnes âgées. Le vaccin inactivé est d'une innocuité absolue. Il a l'inconvénient de ne pas protéger la muqueuse intestinale et de laisser libre cours à la propagation des souches sauvages. Le **vaccin atténué** (Sabin) est constitué de virus polio qui ont perdu toute neurovirulence. Il est administré par voie orale et donne donc une bonne immunité locale. Il est contre-indiqué chez les immuno-déprimés et chez les femmes enceintes. Outre son effet protecteur local, il a l'avantage de diffuser et de vacciner ainsi les personnes du voisinage mais des phénomènes d'interférence virale sont parfois responsables d'échecs. Par ailleurs, le retour à la neurovirulence par mutation reverse n'est jamais exclu.

On préfère actuellement le vaccin inactivé injectable.

### 8.2. Prophylaxie non spécifique

Mesure d'hygiène classique : lavage des mains avec des solutions hydroalcooliques, changement de blouse ou utilisation de surblouse à usage unique, utilisation de gants, nettoyage des surfaces et isolement des personnes ayant une gastroentérite.

## 9. Modèles d'études expérimentaux

### 9.1. *In vitro*

Les poliovirus ne se multiplient que sur cellules humaines ou simiennes de première explantation ou en lignée continue. Les cellules infectées s'arrondissent, deviennent plus réfringentes et se détachent de la paroi de la boîte de culture ; finalement toute la nappe est détruite. Après coloration, on observe dans les cellules infectées une grande inclusion cytoplasmique repoussant le noyau en forme de croissant vers la périphérie de la cellule.

Les coxsackie A ne se développent pas sur cellules en culture tandis que les coxsackie B se multiplient dans les cellules de rein de singe ou les cellules humaines.

Les échovirus se multiplient dans les cellules de rein de singe ou dans les cellules humaines de première explantation ou en lignée continue.

## 9.2. *In vivo*

Le seul animal sensible aux poliovirus est le singe. L'inoculation par voie cérébrale ou spinale détermine des paralysies et la mort de l'animal.

Les coxsackievirus ne sont pas pathogènes pour le singe mais sont létaux pour le souriceau nouveau-né.

Les échovirus ne provoquent pas de maladies chez le singe ou le souriceau.

## Références

Andreoletti L, Bourlet T, Mouskassa D *et al.*. Enteroviruses can persist with or without active viral replication in cardiac tissue of patients with end-stage ischemic or dilated cardiomyopathy. *J Infect Dis.* 2000; 182: 1222-1227.

Barclay W, Li Q, Hutchinson G. *et al.* Encapsidation studies of poliovirus subgenomic replicons. *J Gen Virol.* 1998; 79: 1725-1734.

Basavappa R, Syed R, Flore O, Icenogle JP, Filman DH, Hogle JM. Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 Å resolution. *Protein Sci.* 1994; 3: 1651-1669.

Bidawid S., Farber JM, Sattar SA. Rapid concentration and detection of hepatitis A virus from lettuce and strawberries. *J Virol Methods.* 2000; 88: 175-185.

Blondel B, Duncan G, Coudert T, Delpeyroux F, Pavio N, Colbere-Garapin F. Molecular aspects of poliovirus biology with a special focus on the interactions with nerve cells. *J Neurovirol.* 1998; 4: 1-26.

Chonmaitree T, Mann L. Respiratory infections, In Human enterovirus infection, HA Rotbart Ed, ASM, Press, Washington, 1995: pp 255-270.

Chopra JS., Sawhney IN, Dhand UK, Prabhakar S, Naik S, Sehgal S. Neurological complications of acute haemorrhagic conjunctivitis. *J Neurol Sci.* 1986; 73: 177-191.

Colston EM, Racaniello VR. Poliovirus variants selected on mutant receptor-expressing cells identify capsid residues that expand receptor recognition. *J Virol.* 1995; 69: 4823-4829.

De Clercq E. Highlights in the development of new antiviral agents. *Mini Rev Med Chem.* 2002 ; 2: 163-75.

Dubois E, Merle G, Roquier C, *et al.* Diversity of enterovirus sequences detected in oysters by RT-nested PCR. *Int J Food Microbiol.* 2004; 92: 35-43.

Eisenberg JN, Soller JA, Scott J, Eisenberg DM, Colford JM Jr. A dynamic model to assess microbial health risks associated with beneficial uses of biosolids. *Risk Anal.* 2004 ; 24 : 221-36.

El-Sageyer MM, Szendroi A, Hutter E, *et al.* Characterisation of an echovirus type 11' (prime) epidemic strain causing haemorrhagic syndrome in newborn babies in Hungary. *Acta Virol,* 1998; 42, 157-166.

Gofti-Laroche L, Gratacap-Cavallier B, Genoulaz O, Joret JC, Hartemann P, Seigneurin JM, Zmirou D. A new analytical tool to assess health risks associated with the virological quality of drinking water (EMIRA study). *Water Sci Technol.* 2001 ; 43 : 39-48.

Haas, CN., Rose JB, Gerba CP. 1999. Quantitative Microbial Risk Assessment. John Wiley and Sons, NY.

HeY, Bowman VD, Mueller S, *et al.* Interaction of the poliovirus receptor with poliovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97: 79-84.

Hellen CUT, Wimmer E. Enterovirus genetics, In Human enterovirus infection, HA Rotbart Ed, ASM, Press, Washington, 1995: pp 25-74.

King, A. M. Q., Brown, F. & Christian, P. Picornaviridae. In *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses.* Edited by M.H.V. Van Regenmortel, C.M. Fauquet D.H.L Bishop, *et al.* 1999; Academic press, San Diego. , pp 5249-5254.

King R, Mills D. Coxsackie B virus. The great pretender. *Aust Fam Physician.* 2000; 29 : 51-52.

Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG, *et al.* Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature.* 1981; 291: 547-53.

Le Guyager S, Haugarreau R, Miossec L, Dubois E, Pommepuy M. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66: 3241-8

Lina B, Pozzetto B, Andreoletti L, *et al.* Multicenter evaluating of a commercially available PCR assay for diagnosing enterovirus infection in a panel of cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Microbiol.* 1996 ;34 : 3002-6

Ma JF, Straub TM, Pepper IL, Gerba CP. Cell culture and PCR determination of poliovirus inactivation by disinfectants. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60: 4203-4206.

Melnick JL. Enteroviruses: polioviruses, Coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In *Virology* 3<sup>rd</sup> Edition, BN Fields, DM Knipe, PM Howley eds, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996: pp 655-712.

Mertens T, Hager H, Eggers HJ. Epidemiology of an outbreak in a maternity unit of infections with an antigenic variant of Echovirus 11. *J Med Virol.* 1982; 9: 81-91

Minor PD. Polio eradication, cessation of vaccination and re-emergence of disease. *Nat Rev Microbiol.* 2004 ; 2: 473-482.

Minor PD, Muir P. Enteroviruses, In *Principle and Practice of Clinical virology* 5<sup>th</sup> edition, AJ Zuckermann, JE Banatvala, JR Pattison, PD Griffiths, BD Schoub eds, Wiley & Sons, England, 2005 pp: 467-490.

Morens DM, Pallansch M. Epidemiology, In *Human enterovirus infection*, HA Rotbart Ed, ASM, Press, Washington, 1995: pp 3-23.

Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 1170-4.

Oberste MS, Nix WA, Maher K, Pallansch MA. Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *J Clin Virol.* 2003; 26: 375-7

Pavoni E, Losio MN, Bonetti E, Cosciani Cunico E, Medici C. Efficacy of certain disinfectants towards enteroviruses : kinetics of *in vitro* and *in vivo* inactivation. *Vet Res Com.* 2004; 28: 265-267.

Regli S, Rose JB, Haas CH, Gerba C P. 1991. Modeling the risk from Giardia and viruses in drinking water. *J. Am. Water Works Assoc.* 84:76-84.

Romero JR. Pleconaril : a novel antipicornaviral drug. *Expert Opin Invest Drugs*, 2001; 10: 369

Rotbard HA. Meningitis and encephalitis, In *Human enterovirus infection*, HA Rotbart Ed, ASM, Press, Washington, 1995: pp 271-290.

Rueckert RR. Picornaviridae: the viruses and their replication. In *Virology* 3<sup>rd</sup> Edition, BN Fields, DM Knipe, PM Howley eds, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996: pp 609-654.

Sawyer LA, Hershov RC, Pallansch MA, Fishbein DB, Pinsky PF, Broerman SF, Grimm BB, Anderson LJ, Hall DB, Schonberger LB. An epidemic of acute hemorrhagic conjunctivitis in American Samoa caused by coxsackievirus A24 variant. *Am J Epidemiol.* 1989 Dec;130(6):1187-98.

Sawyer MH. Enterovirus infections: diagnosis and treatment. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2002 Jan;13(1):40-7.

Shieh YC, Calci KR, Baric RS. A method to detect low levels of enteric viruses in contaminated oysters. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65: 4709-4714

#### **Pour en savoir plus**

CONTAMINATION VIRALE DES ALIMENTS : CRÉATION D'UN RÉSEAU EUROPÉEN DE SURVEILLANCE ET DE RECHERCHE

(Soizick Le Guyader, Monique Pommepuy)

Traité de virologie médicale (Hélène Peigue-Lafeuille)

Les infections nosocomiales virales (Bruno Pozzetto)

Human enterovirus infection (H. A. Rotbart)

#### **Sites Internet**

[www.pasteur.fr](http://www.pasteur.fr)

[www.invs.sante.fr](http://www.invs.sante.fr)

[www.infectiologie.com](http://www.infectiologie.com)

[http://www.who.int/health\\_topics/poliomyelitis/fr](http://www.who.int/health_topics/poliomyelitis/fr)

<http://www.sante.gouv.fr>

<http://www.cdc.gov>

## 1. Agent infectieux

### 1.1. Nom scientifique

*Human Parechovirus.*

### 1.2. Acronyme

HPeV.

### 1.3. Nom usuel

Parechovirus.

### 1.4. Caractéristiques

Les Parechovirus humains (HPeV) font partie de la famille des *Picornaviridae*. Le terme *Picornaviridae* a été introduit en 1963 afin de regrouper sous une même entité les entérovirus et les rhinovirus (Rueckert 1996). Dans cette classification, le genre *Enterovirus* regroupait les trois sérotypes de poliovirus (PV1-3), les coxsackievirus A et B (CV-A et CV-B), les entérovirus et les echovirus (enteric cytopathogenic human orphan virus) ; les paréchovirus n'étaient pas encore individualisés. Leur changement de dénomination (ex Echovirus 22 et 23) s'est fait à la fin des années 1990 (King et al 1999). La première classification établie sur la base de données issues de la culture cellulaire a été récemment remodelée consécutivement à l'acquisition des données de la biologie moléculaire. La connaissance des génomes de ces picornavirus permet de les regrouper désormais en 9 genres (*Entero-, Rhino-, Cardio-, Aphto-, Hepato-, Parecho-, Erbo-, Kobu- et Teschovirus*) et 20 espèces (King et Mills 2000) (Tableau 10).

Tableau 10 : classification actuelle des Picornaviridae

Genres	Espèces	Sérotypes	Commentaires
<i>Enterovirus (HEV)</i>	EV humains A	12	11 CV-A et EV 71
	EV humains B	36	Échovirus, CV-B, CV-A9, EV69
	EV humains C	11	11 CV-A
	EV humains D	2	EV-68 et EV-70
	Poliovirus	3	
	EV bovins	2	
	EV porcins A	1	
	EV porcins B	2	
	EV simiens	20	Encore non classés
<i>Rhinovirus (RV)</i>	RV humains A	58	
	RV humains B	17	
<i>Cardiovirus</i>	Virus EMC	1	
	Virus EMT	3	
<i>Aphtovirus</i>	Virus de la Rhinite équine A	1	
	Virus de la Fièvre Aphteuse (FMDV)	7	
<i>Hepatovirus</i>	V Hépatite A (VHA)	1	
<i>Parechovirus (PeV)</i>	Parechovirus humains	2	Anciens Échovirus 22 et 23
	Parechovirus « animal »	1	Virus Ljungan
<i>Erbovirus (ErV)</i>	Virus de la Rhinite équine B	1	
<i>Kobuvirus (KV)</i>	Virus Aichi	1	
<i>Teschovirus (TeV)</i>	TeV porcins	10	Anciens entérovirus porcins reclassés

D'après King et al. 1999

Comme les entérovirus, les paréchovirus sont de petits virus d'un diamètre de 24 à 30 nm, d'un poids de  $8 \times 10^6$  à  $9 \times 10^6$  Daltons. Ils possèdent une capsidie à symétrie icosaédrique, sans enveloppe lipido-protéique. La densité des HEV est d'environ 1,32 à 1,35 g/cm<sup>3</sup> et leur coefficient de sédimentation varie de 150 à 160 Svedberg. Ce sont des virus résistant aux pH acides (d'où leur adaptation au système digestif), aux enzymes protéolytiques, ainsi qu'à divers agents anti-viraux connus (Melnick 1996). En termes de morphologie et de propriétés physico-chimiques, les *Parechovirus* diffèrent très peu des *Enterovirus* si ce n'est une apparence plus « aplatie ». La migration en gel d'acrylamide des protéines d'un *Parechovirus* de type 1 a mis en évidence un profil différent de ceux connus pour les *Enterovirus* similaire à celui observé pour le virus Aïchi (genre *Kobuvirus*) ou le virus de l'hépatite A (genre *Hepavirus*). Notons qu'une région de la VP2 des *Parechovirus* présente une courte boucle E-F plus proche de celle du virus de la fièvre aphteuse (genre *Aphovirus*) que de celle des *Enterovirus* (Ghazi *et al.* 1998). Ce raccourcissement des boucles (E-F, G-H), ou des feuillettes  $\beta$  (D-E, E-F et H-I) de la protéine de capsidie VP1, ainsi que la présence de seulement trois protéines de capsidie (VP0, VP3 et VP1) contre 4 pour les autres *Picornaviridae* (VP1-VP4) pourrait expliquer l'aspect moins sphérique des *Parechovirus*. Une autre caractéristique des *Parechovirus* est la présence d'une extension de 30 nucléotides dans la partie N-terminale de la région codant la protéine VP3, en comparaison de cette même région chez les autres *Picornaviridae* (Gromeier *et al.* 1999).

#### Organisation génomique des *Parechovirus* :

Il s'agit de l'organisation générale décrite pour tous les *Picornaviridae*.

Le premier génome d'entérovirus cloné et séquencé fut celui du poliovirus de type 1 (Kitamura *et al.* 1981). L'organisation génomique alors décrite s'avérait par la suite extrêmement conservée au sein de cette famille virale, avec cependant de grandes variabilités de taille du génome et de séquences nucléotidiques (Rueckert 1996).

Le génome des entérovirus est un simple brin d'ARN de polarité positive, c'est-à-dire que le génome viral peut être directement traduit en protéines virales par les cellules infectées, non coiffé, d'environ  $2,5 \times 10^6$  Daltons (Da) et d'approximativement 7 500 nucléotides (nt). Cette molécule comprend une extrémité 5' non codante d'environ 800 nt de long (5' NC, pour 5' Non Codante), un large cadre ouvert de lecture (ORF, Open Reading Frame) d'environ 6 400 nt de long et une extrémité 3' polyadénylée, également non codante (3' NC), d'environ 300 nt de long. La région 5' NC est caractérisée par une structure secondaire extrêmement complexe et est liée de façon covalente à une petite protéine virale de 22 acides aminés (VPg) (Rueckert 1996). Le cadre ouvert de lecture code pour des protéines structurales (P1 ou de capsidie) et non structurales (P2 et P3).

Bien qu'encore sujette à interrogations, la morphogenèse entérovirale a été comprise grâce à l'étude de la capsidie du poliovirus (Basavappa *et al.* 1994). Tout débute par la libération des protéines de capsidie par les protéases virales (Hellen et Wimmer 1995). Ces protéines s'associent ensuite pour former un protomère, puis un pentamère (5 protomères), puis la procapsidie. L'ARN viral néosynthétisé s'associe ensuite avec cette capsidie immature pour former le provirion). L'encapsidation de l'ARN génomique est un processus exclusif, de telle sorte que ni l'ARN négatif, ni les ARNs cellulaires ne peuvent être encapsidés (Barclay *et al.* 1998). L'assemblage effectué, les particules virales s'accumulent dans le cytoplasme, sous forme de vésicules cristallines, puis sont ensuite libérées par éclatement des vacuoles à la surface des cellules. La libération des nouveaux virions est concomitante de la lyse cellulaire. L'effet cytopathique des paréchovirus a rapidement été observé comme différent de celui induit par les entérovirus (Shaver *et al.* 1961). Ces virus cultivent mieux sur des cellules de type HRT.

### 1.5. Maladie correspondante

Les *Parechovirus* sont des agents pathogènes communs, ubiquitaires, responsables d'infections dont les manifestations cliniques diffèrent peu de celles observées lors des infections à *Enterovirus* (Stanway *et al.* 2000 ; Gromeier *et al.* 1999). L'incidence des infections des très jeunes enfants (60 à 70 % des cas diagnostiqués sont âgés de moins de un an) est comparable à celle des *Enterovirus*. Dès lors, un diagnostic différentiel de ces pathogènes s'est avéré indispensable et a été mis en place sur la base des récentes données issues de la biologie moléculaire (King *et al.* 1999). De nombreuses études sont encore nécessaires afin de lever certaines zones d'ombre existantes dans les mécanismes physiopathologiques liés à une infection à *Parechovirus*. Toutefois, leur rôle en pathologie humaine ne doit pas être sous-estimé. Outre leur implication dans les diarrhées de l'enfant, ils sont responsables de formes neurologiques exceptionnelles comme des encéphalites ou des encéphalomyélites (Legay *et al.* 2002 ; Stanway *et al.* 2000).

## 2. Pouvoir pathogène

### 2.1. Physiopathologie

La physiopathologie est identique à celle des entérovirus. La porte d'entrée est oro-pharyngée et ces virus font aussi partie du péril fécal (transmission féco-orale directe ou indirecte). Le virus pénètre dans l'organisme par

les organes lymphoïdes de l'oropharynx, et est capable d'atteindre les plaques de Peyer en franchissant la barrière stomacale. L'excrétion virale est fécale et peut durer plusieurs semaines. Il n'y a pas d'information concernant une éventuelle excrétion prolongée chez les immunodéprimés.

## 2.2. Dose infectieuse

Pas connue à ce jour.

## 2.3. Mode de contamination

Identique à celui des entérovirus. Les paréchovirus sont des pathogènes largement ubiquitaires, présents dans toutes les régions du monde. Leur mode de transmission principal est oro-fécal (*via* des objets, aliments liquides ou solides souillés par la salive ou les matières fécales), ce qui explique une prévalence très élevée des infections pendant la petite enfance, notamment dans les pays à bas niveau socio-économique et d'hygiène. Cette infection est légèrement différée à l'adolescence dans les pays industrialisés. La voie aérienne peut également intervenir dans la transmission. La transmission des paréchovirus est d'autant facilitée que ces virus sont extrêmement résistants aux conditions extérieures telles que les pH acides, les températures extrêmes, l'humidité, ou la teneur en matières organiques. Ces propriétés assurent à ces virus une dissémination possible dans les sol, les eaux de surface ou encore les eaux usées de stations d'épurations, comme pour les entérovirus (Morens et Pallansch 1995, Ehrnst et Eriksson 1993).

## 2.4. Groupes à risque

Pas de groupe à risque identifié à ce jour.

## 2.5. Période d'incubation

Similaire à celle des entérovirus. Le délai d'incubation est estimé habituellement entre 2 et 14 jours sur le modèle de la poliomyélite antérieure aiguë.

## 2.6. Manifestations cliniques

Les infections à paréchovirus sont rarement rapportées. Elles sont parfois asymptomatiques, parfois sévères (Stanway *et al.* 2000)

Les *syndromes gastro-intestinaux* sont fréquemment rapportés lors d'infections à paréchovirus sans que le mécanisme physio-pathogénique des diarrhées aiguës n'ait pu, à ce jour, être élucidé. C'est au cours d'une épidémie qu'ont été isolés pour la première fois les paréchovirus 1 et 2 (Joki-Korpela et Hyypia 1998).

La *méningite lymphocytaire à liquide clair* : cette infection classique pour les entérovirus est, en terme de fréquence relative, rare pour les paréchovirus. Des encéphalites sporadiques ont été rapportées, ainsi que des paralysies flasques ; ces infections, même si elles sont sous-évaluées, seraient toutefois exceptionnelles (Legay *et al.* 2002 ; Figueroa *et al.* 1989).

# 3. Stratégies du diagnostic

## 3.1. Diagnostic chez l'homme

Le diagnostic spécifique d'une infection à *Parechovirus* doit être réalisé à l'aide d'outils diagnostiques spécifiques. En effet, leur cycle viral particulier (notamment leur croissance très lente en culture cellulaire) fait que l'isolement et le typage d'un *Parechovirus* peut durer de 10 à 15 jours et nécessite des lignées cellulaires spécifiques telles que la lignée HRT (Joki Korpela et Hyypia 1998 ; Shaver *et al.* 1961). De même, les divergences moléculaires observées entre *Enterovirus* et *Parechovirus* ne permettent pas la détection de ces derniers avec les techniques consensus entérovirus (Legay *et al.* 2002). Il est indispensable d'utiliser des outils spécifiques sur la base des séquences génomiques disponibles dans les banques de données, afin de dessiner des couples d'amorces n'amplifiant que les *Parechovirus*, et dont les cibles sont généralement les régions 5'NC ou les gènes de capsides (Oberste *et al.* 1998, Oberste *et al.* 1999).

Le diagnostic virologique a deux principales indications :

- le diagnostic d'une affection neuroméningée aiguë ;
- le criblage des agents étiologiques responsables d'une diarrhée.

Deux techniques de détection des entérovirus sont utilisées :

- l'isolement du virus par inoculation à des cellules HRT en culture *in vitro* manque de sensibilité pour certains prélèvements (LCR à cause d'une faible charge virale et d'une mauvaise conservation du pouvoir infectieux). Après observation de l'effet cytopathique à l'état frais, l'appartenance au genre *Parechovirus* peut être confirmée par détermination du sérotype par séroneutralisation de l'ECP à l'aide de sérums monovalents spécifiques (réalisé exclusivement au CNR), ou par RT-PCR spécifique ;
- la RT-PCR détecte le génome avec des sondes et amorces dirigées contre la région 5' non codante conservée au sein du genre *Parechovirus*. La RT-PCR permet donc un diagnostic du genre sans caractérisation du sérotype (Legay *et al.* 2002). Le typage moléculaire de la souche peut être ensuite réalisé par amplification et séquençage de tout ou partie du gène codant pour la protéine de capsid VP1 (Oberste *et al.* 1999).

La recherche des anticorps n'est pas réalisée.

### 3.2. Diagnostic dans l'environnement

Les techniques de recherche des paréchovirus dans l'environnement sont semblables à celles décrites pour les entérovirus. Il est en effet potentiellement possible de détecter les paréchovirus par RT-PCR aussi bien dans les huîtres que dans les boues de stations d'épuration.

### 3.3. Diagnostic dans les aliments

Identique aux entérovirus.

## 4. Épidémiologie et systèmes de surveillance

### 4.1. Systèmes de surveillance

Il existe un centre de référence des entérovirus basé à Lyon qui prend aussi en charge les paréchovirus (Pr Lina-Dr Chomel).

RSE : Réseau de surveillance des entérovirus (26 laboratoires volontaires sur le territoire métropolitain).

Réseau d'étude des virus d'origine alimentaire en Europe « Foodborne viruses in Europe ».

Réseau des Centres collaborateurs OMS.

### 4.2. Statut épidémiologique et prévalence

Ce statut est aujourd'hui mal connu et peu étudié.

## 5. Mode de dissémination

### 5.1. Réservoir

Dans les pays tempérés, la circulation des paréchovirus est maximale pendant les mois d'été (de la fin du printemps à la fin de l'automne). Le réservoir des paréchovirus est humain, constitué surtout par les enfants infectés, malades ou non. Comme pour les entérovirus, les paréchovirus sont excrétés à de hauts titres dans les selles, et parfois de façon prolongée. Ils persistent également dans l'environnement. La transmission est donc fécale-orale, directe ou indirecte par les objets, l'alimentation ou l'eau contaminés. La transmission aérienne est aussi possible de même que la transmission nosocomiale.

### 5.2. Zoonose

Le virus pourrait être une variante de certains virus d'animaux. Certains virus animaux (Ljungan) sont proches des paréchovirus (Lindberg et Johansson 2002). Des sérotypes de paréchovirus ont été détectés chez l'animal. À ce jour, ces virus animaux n'ont pas été responsables de cas chez l'homme.

### 5.3. Vecteurs

Aucun. Toutefois, ces paréchovirus animaux ont été détectés, notamment chez des chauves-souris. Malgré la proximité génétique de ces virus, il ne semble pas qu'il y ait de passage de l'animal à l'homme (Niklasson *et al.* 1999).

#### **5.4. Mode de contamination des aliments et de l'eau**

À partir des excréments humains, l'homme étant le seul réservoir connu à ce jour. L'information disponible sur le mode de contamination ainsi que sur la survie de l'agent infectieux dans la nature est faible. Par assimilation, le risque et cette survie sont considérés comme comparables à ceux observés pour les entérovirus. Dans ces conditions, le risque de contamination est essentiellement lié à la consommation de mollusques, de crustacés et de salades contaminés (Bidawid *et al.* 2000).

#### **5.5. Sensibilité aux médicaments**

Aucun médicament disponible à ce jour. À noter que le pleconaril semble inefficace.

#### **5.6. Sensibilité aux traitements de désinfection**

Identique à ce qui est observé pour un entérovirus prototype : le poliovirus de type 1. Ce virus résiste à des expositions courtes aux désinfectants d'usage courant comme l'éthanol à 70 %, le lysol à 5 %; les composés d'ammonium quaternaire à 1 %. Ils sont par contre inactivés rapidement par le formol à 3 %, le glutaraldéhyde à 2 % avec traitement prolongé (réduction de 3 log en 30 min), et sont sensibles à l'hypochlorite de sodium à 1 % (Pavoni *et al.* 2004). Ces virus sont totalement inactivés en 10 min par des solutions à 2 ‰ d'iode. Avec une solution comportant 1mg de chlore par L, le titre infectieux est réduit de 4 log en 5 minutes.

L'hypochlorite de sodium à 1 mg/L réduit de 4 log le titre infectieux de poliovirus en 60 min.

L'acide peracétique est aussi efficace à pH neutre et à température ambiante ; la réduction du titre est d'1 log en 10 min et de 2,5 log en 60 min.

Des essais de comparaison de résistance vis-à-vis des désinfectants entre les poliovirus et les non-poliovirus ont montré que le poliovirus était plus résistant que le CV-B5 ou l'échovirus 30.

#### **5.7. Sensibilité aux UV**

Non déterminé, mais *a priori* identique à ce qui est observé pour les entérovirus.

Le poliovirus est inactivé par l'exposition aux rayonnements Ultraviolets. Ainsi, il a été mesuré que la dose d'UV de 10.000 uW sec/cm<sup>2</sup> réduisait de 2 log le titre infection, et qu'une exposition à 22.000 uW sec/cm<sup>2</sup> la réduisait de 5 log (Ma *et al.* 1994).

#### **5.8. Survie dans l'environnement**

Il n'y a pas de données propres aux paréchovirus. Les informations disponibles pour les entérovirus peuvent être extrapolées aux paréchovirus.

### **6. Dangers spécifiques liés à la manipulation pour le personnel de laboratoire et modalité de prévention**

#### **6.1. Infections acquises au laboratoire**

Pas d'observations rapportées à ce jour.

#### **6.2. Sources et échantillons**

Prélèvements de liquide céphalorachidien, de gorge et de selles.

Boues de stations d'épuration, eaux ou aliments souillés.

#### **6.3. Dangers primaires**

Aucun.

#### **6.4. Classe de confinement**

Niveau de confinement 2.

### 6.5. Précautions particulières

Classique : blouse de laboratoire, gants si le contact direct avec le matériel infectieux est inévitable, gants et blouse serrée aux poignets et attachant dans le dos pour les travaux réalisés dans l'enceinte de sécurité biologique. Se laver les mains à fond avec un savon antiseptique.

### 6.6. Déversements accidentels

Laisser retomber les aérosols, mettre gants et vêtements de protection, appliquer de l'eau de Javel de la périphérie vers le centre, laisser en contact 30 minutes avant de nettoyer.

### 6.7. Élimination

Décontaminer tous les déchets avant de les éliminer, stériliser par la vapeur, désinfecter chimiquement, incinérer.

### 6.8. Entreposage

En contenants scellés étiquetés de manière appropriée.

### 6.9. Évaluation de la viabilité

/

## 7. Immunisation naturelle, vaccinale

### 7.1. Prophylaxie spécifique

Aucune.

### 7.2. Prophylaxie non spécifique

Mesure d'hygiène classique : lavage des mains avec des solutions hydroalcooliques, changement de blouse ou utilisation de surblouse à usage unique, utilisation de gants, nettoyage des surfaces et isolement des personnes ayant une gastroentérite.

## 8. Modèles d'études expérimentaux

### 8.1. *In vitro*

Pas de modèle animal connu pour les paréchévirus humains.

### 8.2. *In vivo*

Les paréchévirus cultivent sur lignée cellulaire continue HRT.

## Références

Barclay W, Li Q, Hutchinson G. *et al.* Encapsidation studies of poliovirus subgenomic replicons. *J Gen Virol.* 1998; 79: 1725-1734.

Basavappa, R, Syed R, Flore O, Icenogle JP, Filman DH, Hogle JM. Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 Å resolution. *Protein Sci.* 1994; 3: 1651-1669.

Bidawid S., Farber JM, Sattar SA. Rapid concentration and detection of hepatitis A virus from lettuce and strawberries. *J Virol Methods.* 2000; 88: 175-185.

Ehrnst, A. & Eriksson, M. Epidemiological features of type 22 echovirus infection. *Scand J Infect Dis,* 1993; 28: 275-281.

- Figueroa J. P., Aschley Q., King D. & Hull B. An outbreak of acute flaccid paralysis associated with echo 22 infection. *J Med Virol*, 1989; 29: 315-319.
- Ghazi F., Hughes P. J., Hyypiä T. & Stanway G. Molecular analysis of human parechovirus type 2 (formerly echovirus 23). *J Gen Virol*, 1998; 79: 2641-2650.
- Gromeier M., Wimmer E. & Gorbalenya A. E. Genetics, pathogenesis and evolution of picornaviruses. In *Origin and Evolution of Viruses*, Edited by E. Domingo, R. Webster, J. Holland 1999 Academic press, San Diego; pp 287-343.
- Hellen CUT, Wimmer E. , Enterovirus genetics, In Human enterovirus infection, HA Rotbart Ed, ASM, Press, Washington, 1995: pp 25-74.
- King, A. M. Q., Brown, F. & Christian, P. Picornaviridae. In *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses*. Edited by M.H.V. Van Regenmortel, C.M. Fauquet D.H.L Bishop, et al. 1999; Academic press, San Diego. , pp 5249-5254.
- Joki-Korpela, P. & Hyypiä, T. Diagnosis and epidemiology of Echovirus 22 Infections. *J Infect Dis*, 1998; 26: 129-136.
- King R, Mills D. Coxsackie B virus. The great pretender. *Aust Fam Physician*. 2000; 29 : 51-52.
- Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG, et al. Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature*. 1981; 291: 547-53.
- Legay, V., Chomel, J. J., Lina, B., Khalfan, S. & Aymard, M. Encephalomyelitis due to human parechovirus type 1. *J Clin Virol*, 2002; 25: 193-195.
- Legay, V., Chomel, J. J. & Lina, B. Specific RT-PCR detection of human parechovirus type 1 genome in clinical samples. *J Virol Methods*, 2002; 102: 157-160.
- Lindberg, A. M. & Johansson, S. Phylogenetic analysis of Ljungan virus and A-2 plaque virus, new members of the *Picornaviridae*. *Virus Res*, 2002; 85, 61-70.
- Ma JF, Straub TM, Pepper IL, Gerba CP. Cell culture and PCR determination of poliovirus inactivation by disinfectants. *Appl Environ Microbiol*, 1994; 60: 4203-4206.
- Melnick JL. Enteroviruses: polioviruses, Coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In *Virology* 3rd Edition, BN Fields, DM Knipe , PM Howley eds, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996: pp 655-712.
- Morens DM, Pallansch M. Epidemiology, In Human enterovirus infection, HA Rotbart Ed, ASM, Press, Washington, 1995: pp 3-23.
- Niklasson, B., Kinnunen, L., Hörnfeld, B., Hörling, J., Benemar, C., Hedlund, K. O., Matskova, L., Hyypiä, T. & Winberg, G. . A new picornavirus isolated from Bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Virology*, 1999; 255: 86-93.
- Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti , Kilpatrick DR, Pallansch MA. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 1170-4.
- Oberste, M. S., Maher, K. & Pallansch, M. Complete sequence of echovirus 23 and its relationship to echovirus 22 and other human enteroviruses. *Virus Res*, 1998; 56: 217-223.
- Oberste, M. S., Maher, K., Kilpatrick, D. R. & Pallansch, M. A. Molecular evolution of enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol*, 1999; 73: 1941-1948.
- Pavoni E, Losio MN, Bonetti E, Cosciani Cunico E, Medici C. Efficacy of certain disinfectants towards enteroviruses : kinetics of *in vitro* and *in vivo* inactivation. *Vet Res Com*. 2004; 28: 265-267.
- Porter, A.G. (1993). Picornavirus non-structural proteins: emerging roles in virus replication and inhibition of host cell functions. *J Virol*, 1993; 67: 6917-6921.
- Romero JR. Pleconaril : a novel antipicornaviral drug. *Expert Opin Invest Drugs*, 2001; 10: 369.
- Rueckert RR. Picornaviridae: the viruses and their replication. In *Virology* 3rd Edition, BN Fields, DM Knipe , PM Howley eds, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996: pp 609-654.

Shaver, D. N., Barron, A. L. & Karzon, D. T. Distinctive cytopathology of ECHO viruses type 22 and 23. *Proc Nat Acad Sci*, 1961; 106: 648-652.

Stanway, G., Joki-Korpela, P. & Hyypiä, T. Human parechoviruses-biology and clinical significance. *Rev Med Virol*, 2000 ; 10 : 57-69.

CONTAMINATION VIRALE DES ALIMENTS : CRÉATION D'UN RÉSEAU EUROPÉEN DE SURVEILLANCE ET DE RECHERCHE  
(Soizick Le Guyader, Monique Pommepuy)

Traité de virologie médicale (Hélène Peigue-Lafeuille)

Les infections nosocomiales virales (Bruno Pozzetto)

Human enterovirus infection (H. A. Rotbart)

27-31, avenue du Général Leclerc  
94701 MAISONS-ALFORT cedex  
[www.afssa.fr](http://www.afssa.fr)

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE