



# Les virus dans les aliments : un nouveau défi pour les laboratoires de microbiologie

Véronique ZULIANI, Institut de la Filière Porcine

Jean Christophe Augustin, ENVA, ASA

## Qu'est ce qu'un virus ?

- **Microorganisme de 15 à 40 nm**
  - Environ 10 à 100 fois plus petit qu'une bactérie
- **Génome constitué d'un seul type d'acide nucléique**
  - ARN
    - Enterovirus : diverses maladies dont gastro-entérites
    - Rotavirus : gastro-entérites infantiles
    - Norovirus : gastro-entérites
    - VHE, VHA : hépatites
  - ADN
    - Adenovirus : diverses maladies dont digestives

■ **Multiplication via l'infection de cellules hôtes**

■ Pas de multiplication dans l'aliment

# Virus responsables des gastro-entérites

## ■ Non enveloppés

- résistance accrue à la température, à la dessiccation...

## ■ Disséminé par les selles ou les vomissures

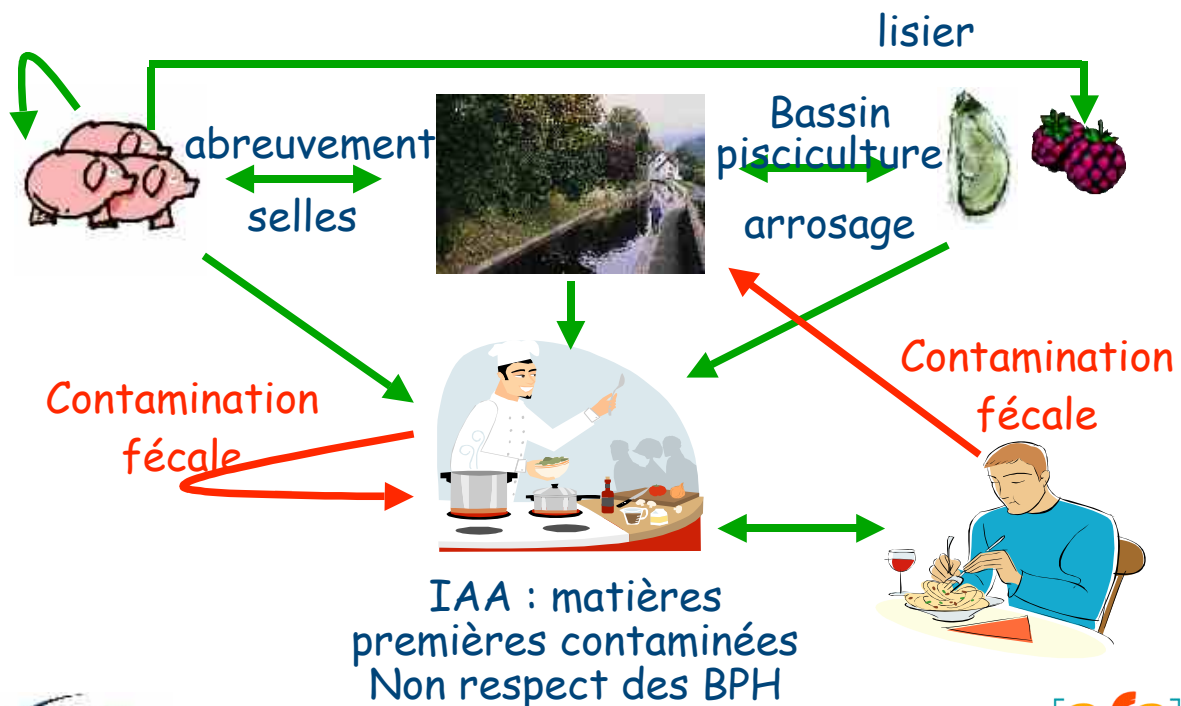
- Titre viral élevé :  $10^8$  UFP/ gramme (Norovirus)

## ■ Grande stabilité

## ■ Faible dose infectieuse

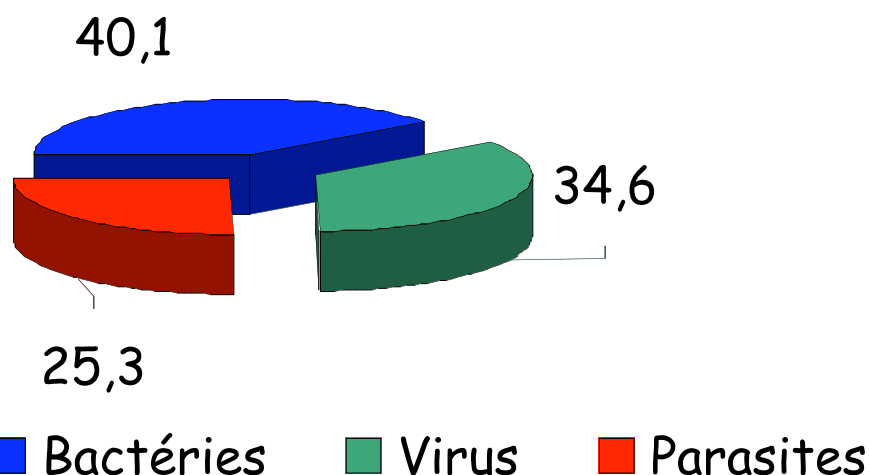
Favorise les épidémies

# Transmission des virus par les aliments



# Étiologie des infections d'origine alimentaire en France

Etiologie des cas totaux (%)



Source : Rapport « Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France » - InVS – Mars 2004

## Epidémies récentes en Europe

### ■ Rapid Alert System for Food and Feed

- 03-06 : Danemark, Italie + Norvège + Pays bas (Norovirus) : Huîtres crues (France)
- 04-06 : Allemagne : Huîtres crues (France)
- 08-06 : Pays Bas (Norovirus) : Framboises congelées (?)
- 01-07 : Malte (Norovirus) : Huîtres crues (France)

### ■ Autres épidémies récentes

- 2005 : Danemark (Norovirus) : Framboises surgelées (Pologne) : 1000 cas, 5 décès
- 2007 : Grande Bretagne (Norovirus) : salades 36 cas
- 2007 : Bulgarie : origine inconnue, 977 cas

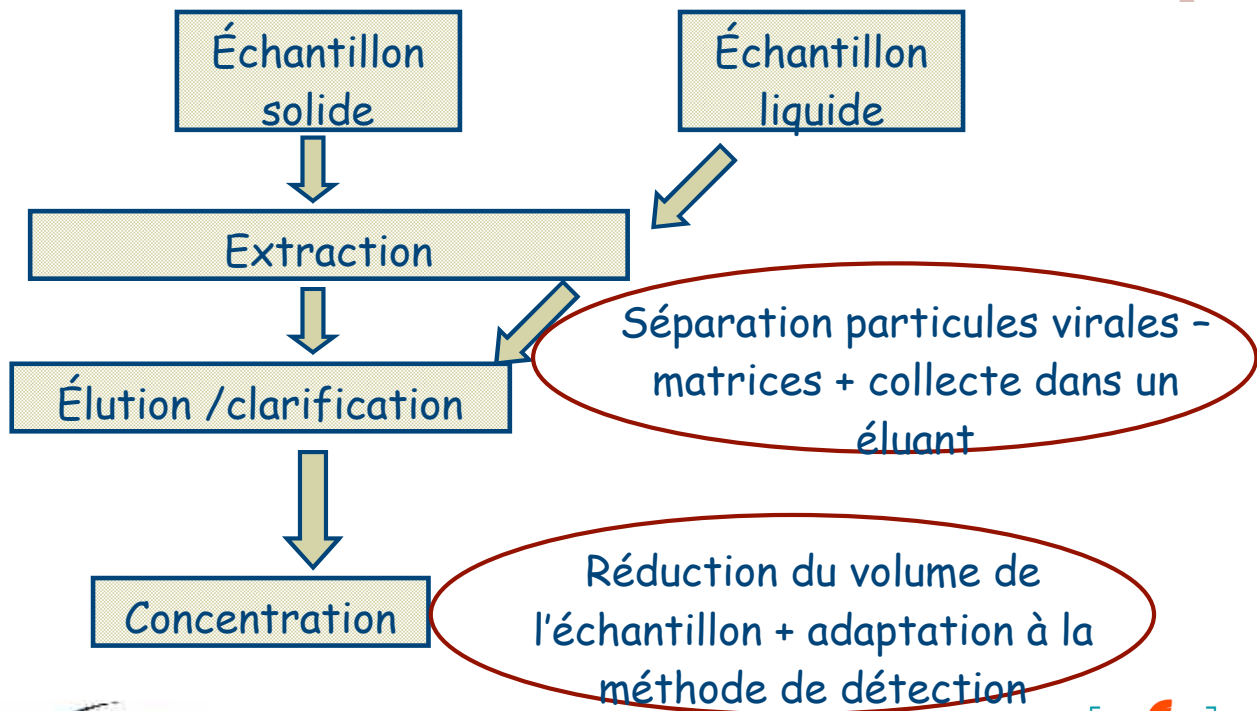
## Pourquoi rechercher les virus dans les aliments ?

- **Nombreuses infections alimentaires : conséquences sanitaires et économiques**
- **Règlement européen ( CE n°2073/2005)**
  - Objectif fondamental : niveau élevé de protection de la santé humaine et animale
  - Denrées : pas de toxines, métabolites, microorganismes avec un risque inacceptable pour la santé humaine
  - Pourtant pas de critère de sécurité relatif aux virus  
*Absence de méthodes*

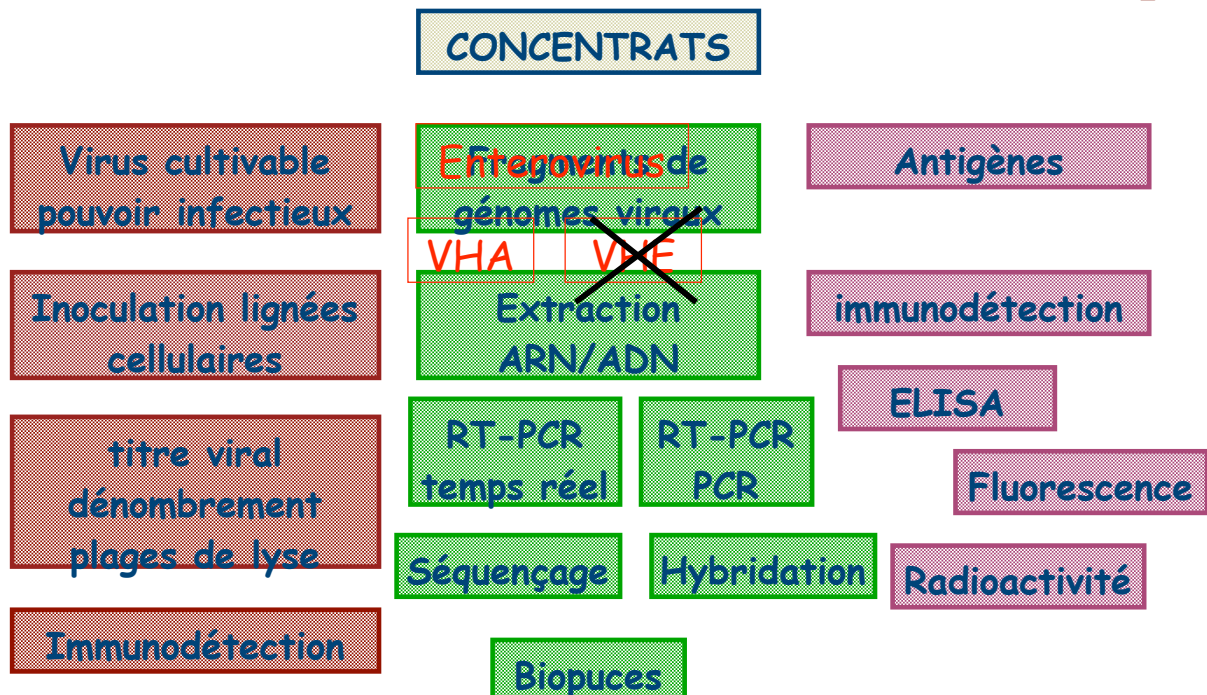
## Quelles méthodes utiliser ?

- **Préparation de l'échantillon**
  - Élimination de la matrice
  - Concentration des particules virales
- **Détection**
  - Culture cellulaire
  - Biologie moléculaire
  - Immunologie

## Préparation de l'échantillon



## Détection des virus (principales méthodes)

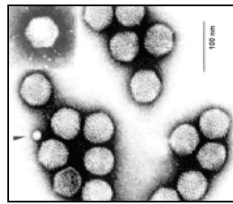


## Culture cellulaire

- Culture de cellules : nombreux passages
- Infections de la culture par les virus
- Observation microscopique



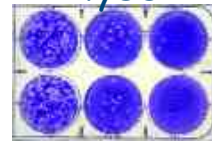
passages



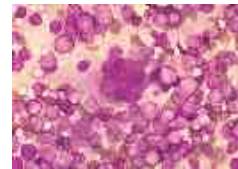
+

passages

Plages de lyse



ECP



## Culture cellulaire

- Témoigne du caractère infectieux = méthode de référence
- Sensible : à condition d'utiliser plusieurs lignées cellulaires
  - ~ 2 UFP/ 25g
- Quantitative : dénombrement des plaque de lyses
- Pas d'effet lié à la matrice

## Culture cellulaire



- Applicable uniquement aux virus « cultivables »
- Longue : liée à la multiplication cellulaire (qq semaines)
- Lourde et complexe à mettre en oeuvre :
  - acquisition matériel : PSM, azote liquide, incubateur CO<sub>2</sub>
  - Formation personnel
  - Modification des locaux : salles propres / salles contaminées...
- Manque de standardisation :
  - Protocole à mettre en œuvre
  - comparaison : limitée à même lignée cellulaire
  - CEN/TC 275/WG6/TAG 4 + AFNOR : méthodes de détection standardisées pr certains entérovirus



## Biologie moléculaire : RT-PCR / PCR

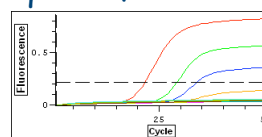


- Extraction ADN/ARN
- Transcription inverse ARN en ADNc
- Amplification
- Détection : agent intercalant

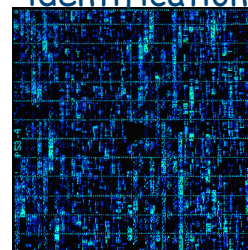
PCR (multiplex)  
identification



PCR temps réel  
quantification



Biopuce  
identification



---

## Biologie moléculaire : RT-PCR / PCR

- Détection de tous les virus de séquence connue
- Rapide : quelques heures
- Spécifique :  $\pm$  selon choix des amorces, à définir en fonction de l'objectif : typage ou recherche
- Sensible : 1 Particule dans l'échantillon
- Quantitative : PCR en temps réel
- Rapidement transférable dans un laboratoire réalisant des PCR « bactériennes »

---

## Biologie moléculaire : RT-PCR / PCR

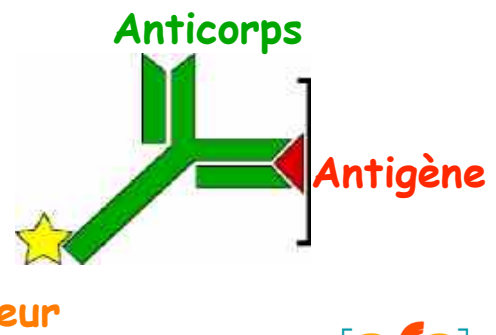
- Difficulté d'interprétation ; détection génome  $\neq$  mise en évidence du pouvoir infectieux
- Risques de faux-négatifs : molécules inhibitrices liées à la matrice (chélateurs, polysaccharides...)
- Risques faux-positifs : contamination moins facile à maîtriser que pour les bactéries
- Protocoles non standardisés ; travail en cours sur quelques matrices uniquement



---

## Méthodes immunologiques

- Ajout Anticorps spécifiques du virus recherché
- formation d'un complexe Antigènes - Anticorps
- Révélation du complexe immun
  - ELISA (immuno-enzymologie)
  - Radioactivité
  - Immunofluorescence



---

## Méthodes immunologiques

- Méthodes rapides facilement automatisables
- Quantitative : dosage fluorescence, radioactivité par rapport à un étalon
- Facilement transférable

### MAIS

- Pas d'information sur le caractère infectieux
- Peu sensible comparativement aux autres méthodes (couplage avec culture cellulaire possible)

---



## Conclusion - perspectives

### ■ Méthode idéale

- Sensible : (RT) - PCR > culture cellulaire
- Quantitative : (RT) - PCR et culture cellulaire
- Rapide : (RT) - PCR
- Applicable en routine : (RT) - PCR
- Capable de détecter tous les sérotypes viraux
  - RT-PCR : connaissance des séquences
  - Culture cellulaire : virus cultivables
- Témoinnant du caractère infectieux : culture cellulaire

---



## Conclusions - perspectives

### ■ Pour améliorer les méthodes existantes

- Recherche fondamentale : lien entre pouvoir infectieux et génome...
- Recherche appliquée : amélioration des méthodologies d'extraction des ADN/ARN en matrice complexe
- Normalisation : groupe de travail CEN + AFNOR
  - Norovirus et VHA
  - Végétaux