

# VIRUS ENTÉRIQUES : CONNAISSANCES ACTUELLES ET MOYENS DE MAÎTRISE DANS L'INDUSTRIE AGRO-ALIMENTAIRE

## ENTERIC VIRUSES : CURRENT KNOWLEDGE AND CONTROL METHODS IN THE AGRI-FOOD INDUSTRY

Par Thierry MORIN<sup>(1)</sup> et Bernard PICOCHÉ<sup>(2)</sup>  
(communication présentée le 20 décembre 2007)

### RÉSUMÉ

Les virus entériques sont rejetés en grande quantité dans l'environnement où ils sont capables de persister très longtemps. Ils sont infectieux à très faibles doses pour l'homme, et à l'origine d'un nombre important de toxi-infections alimentaires chaque année dans le monde. Leur transmission féco-orale se fait principalement par la consommation d'aliments contaminés, consommés frais ou n'ayant pas subi de traitement industriel ou domestique suffisant, ainsi que par les contacts interhumains. Il n'existe à l'heure actuelle aucune contrainte réglementaire, du fait d'un manque d'outils standardisés de recherche de ces pathogènes. Néanmoins, des méthodes, permettant l'extraction et la détection par biologie moléculaire des virus entériques dans les liquides et matrices alimentaires, sont en cours d'élaboration par la Communauté Européenne. Ces développements méthodologiques devraient aboutir, à moyen terme, à la mise en place de normes fixant des critères virologiques pour les principaux aliments à risque. La maîtrise du risque viral au niveau industriel devra s'appuyer sur ces outils d'autocontrôles, en les intégrant dans une démarche HACCP globale, basée sur une analyse des risques et des mesures de contrôle spécifiques.

**Mots-clés :** virus entériques, toxi-infections alimentaires collectives (TIAC), détection, traitements technologiques et hygiéniques, HACCP.

### SUMMARY

Enteric viruses are released in large quantities into the environment, where they can persist for a very long time. They are infectious at very low doses for humans, and are responsible for a significant number of foodborne intoxications and infections every year worldwide. Feco-oral transmission occurs mainly through the ingestion of contaminated food, either fresh or inadequately processed (industrially or at home), and through human contacts. There are currently no regulatory constraints, due to the lack of standardised tools, to identify these pathogens. However, the European Community is currently evaluating methods to extract and detect by molecular biology enteric viruses in liquids and food matrices. These methodological developments are expected to generate, in the medium term, virological standards for the main foodstuffs at risk. The industry will have to control the risk of viral contamination as part of an overall HACCP approach, using these tools as well as risk analysis and specific control measures.

**Key words :** enteric viruses, collective foodborne infections and intoxications, detection, technological and hygienic processing, HACCP.

(1) Ingénieur de Recherche en Virologie Alimentaire et (2) Directeur-Adjoint en charge du service R & D et du Centre de Ressources Technologiques (CRT), ADRIA Normandie - Institut Technique Agro-Industriel (ITAI), Boulevard du 13 Juin 1944 BP2, 14 310 Villers Bocage. Tel: 02 31 25 43 00. Fax: 02 31 77 49 43. tmorin@adriane.org

## INTRODUCTION

L'impact sanitaire et économique des virus entériques a été pendant longtemps fortement sous-estimé du fait de l'absence i) d'outils performants permettant de réaliser une recherche fiable et sensible de virus dans les produits et liquides alimentaires mis sur le marché et d'associer consommation d'aliments contaminés et développement de pathologies; ii) de détermination systématique de l'éventuelle étiologie virale des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). Jusqu'à la fin du siècle dernier, les données épidémiologiques publiées sous-évaluaient très largement l'impact des virus alimentaires, estimant à moins de 10 % le nombre de TIAC d'origine virale. Le développement d'outils méthodologiques de détection, en cours de finalisation à l'heure actuelle au niveau européen, a permis depuis de réévaluer ce chiffre qui est désormais compris entre 28 et 70 % selon les pays (Mead *et al.* 1999; INVS 2004; Widdowson *et al.* 2005). Cette revue a pour objectifs de faire un point sur les connaissances relatives aux virus entériques et de donner des éléments permettant d'élaborer, au niveau industriel, une stratégie de maîtrise du risque viral englobant toutes les étapes de la chaîne de production/transformation.

## NATURE ET CARACTÉRISTIQUES DES VIRUS ENTÉRIQUES

### Diversité et pathologies induites

Les virus alimentaires sont des virus entériques à transmission féco-orale directe ou indirecte (« péril fécal »), qui ont la capacité d'atteindre la muqueuse intestinale et de se multiplier dans les entérocytes. D'un diamètre variant entre 25 et 220 nanomètres, ils possèdent un génome constitué d'ARN (sauf pour les adénovirus), protégé par une capsid de nature protéique. Ils pré-

sentent une grande diversité et sont classés en fonction des pathologies qu'ils induisent chez l'homme : hépatites aiguës, gastro-entérites ou autres maladies (**tableau 1**). Les gastro-entérites, toutes causes confondues, représentent une des premières causes de consultation médicale en France (3 millions de consultations/an; 5 615 710 cas estimés en 2007 selon le Réseau Sentinelle; <http://www.sentiweb.org>), principalement en pédiatrie. Si la mortalité associée est réduite dans les pays développés du fait d'une prise en charge médicale rapide et adaptée, la morbidité est, quant à elle, élevée et l'impact économique particulièrement important. Leur coût annuel direct a été estimé respectivement aux États-Unis et en Angleterre à 500 et 184 millions de dollars (Lopman *et al.* 2004). Une recherche systématique des principaux virus responsables de gastro-entérites, menée par le Réseau Sentinelles au cours de l'hiver 1998-1999, a montré que le rotavirus, les calicivirus humains, les astrovirus et les adénovirus 40 et 41 étaient retrouvés chez 39 % des patients atteints, cas consultants en médecine générale. Les calicivirus étaient isolés dans 19 % des cas (dont 85 % de norovirus) et les rotavirus dans 17 % (Chikhi-Brachet *et al.* 2002). Les hépatites d'origine alimentaire sont associées au virus de l'hépatite A (VHA) et au virus de l'hépatite E (VHE). Le VHA provoque une infection aiguë, généralement bénigne, évoluant vers une guérison rapide et sans séquelles (95 % des cas). La sévérité des symptômes cliniques augmente de façon significative avec l'âge des personnes infectées. Si l'infection est asymptomatique chez la grande majorité des enfants, 70 à 80 % des adultes infectés développent des symptômes, notamment un ictère. La mortalité associée à cette infection est globalement de 0,2 à 0,4 % mais elle passe à plus de 2 % chez les personnes de plus de 40 ans. Le réseau Sentinelle a estimé à 7256 le nombre de cas d'hépatites A en France pour l'année 2007. Le VHA est présent principalement dans les pays en voie de développement où les taux de séroprévalence sont souvent voisins de 100 %. L'hépatite E est une infection aiguë qui, comme l'hépatite A, est

Famille	Genre	Espèce
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Virus de Gastro-entérites</b></li> <li>Caliciviridae</li> <li>Astroviridae</li> <li>Reoviridae</li> <li>Coronaviridae</li> <li>Adenoviridae</li> <li>Parvoviridae</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Norovirus</li> <li>Sapovirus</li> <li>Astrovirus</li> <li>Rotavirus</li> <li>Reovirus</li> <li>Coronavirus</li> <li>Torovirus</li> <li>Mastadenovirus</li> <li>Parvovirus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>norovirus</li> <li>virus Sapporo</li> <li>astrovirus</li> <li>rotavirus (groupes A &amp; C)</li> <li>réovirus</li> <li>coronavirus</li> <li>torovirus</li> <li>adénovirus type 40 &amp; 41</li> <li>parvovirus</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Virus des Hépatites</b></li> <li>Picornaviridae</li> <li>Hepeviridae</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hepatovirus</li> <li>VHE</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>virus de l'hépatite A (VHA)</li> <li>virus de l'hépatite E (VHE)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Autres maladies<sup>(1)</sup></b></li> <li>Picornaviridae</li> <li>Adenoviridae</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Enterovirus</li> <li>Mastadenovirus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>poliovirus, coxsackievirus A &amp; B, ECHOvirus, entérovirus 68-71</li> <li>adénovirus 40 &amp; 41</li> </ul>

**Tableau 1 :** Principaux virus alimentaires connus.

(1) dont gastro-entérite, paralysie, méningite, fièvre poliomyélitique, infection respiratoire, éruption spontanée, encéphalite, conjonctivite.

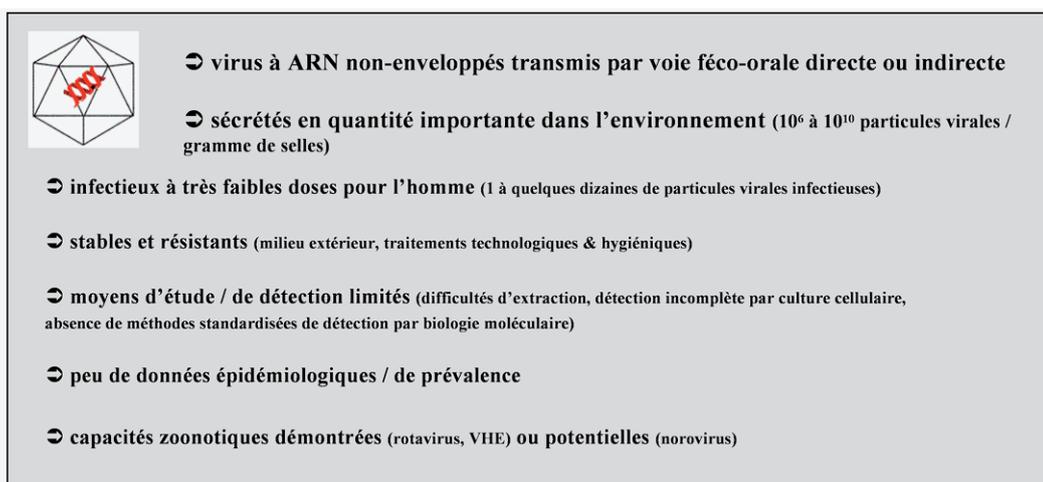


Figure 1: Bilan des connaissances actuelles relatives aux virus entériques.

généralement bénigne. Hormis des ictères développés chez la moitié des personnes infectées, une forme fulminante peut survenir dans environ un cas pour 100. Chez les femmes enceintes, cette fréquence peut atteindre 20 à 25 % (Pavio *et al.* 2008). Les Entérovirus sont responsables d'un grand nombre d'infections généralement asymptomatiques chez l'homme. Ils peuvent néanmoins parfois être à l'origine de maladies relativement sévères : gastroentérite, syndrome gastro-intestinal, méningite lymphocytaire et encéphalite, poliomyélite paralytique aiguë (poliovirus), infection généralisée du nouveau-né, atteintes respiratoires et cardiaques, infection cutanéomuqueuse. Les virus épidémiologiquement les plus significatifs à l'heure actuelle sont le Virus de l'Hépatite A (VHA), les norovirus et les rotavirus (Rapport AFSSA 2007). En ce qui concerne les norovirus, dont deux géogroupes (I et II) sont spécifiques de l'homme, le géotype GII.4 est le plus fréquemment isolé dans les épisodes épidémiques (Kroneman *et al.* 2006).

### Caractéristiques et potentiel zoonotique (figure 1)

Les virus entériques sont rejetés en quantités très importantes dans l'environnement par l'intermédiaire des excréctions humaines, notamment des fèces ( $10^3$  à  $10^{10}$  particules virales/gramme de selles; Metcalf *et al.* 1995). Le fait qu'ils soient dépourvus d'enveloppe lipidique leur confère une grande capacité de résistance aux conditions physico-chimiques environnementales. Ils sont ainsi capables de conserver leur caractère infectieux après plusieurs heures ou jours dans de l'eau de mer ou sur des surfaces inertes ou biologiques (Arnal *et al.* 1998; Kurdziel *et al.* 2001; D'Souza *et al.* 2006). Ces capacités de résistance intrinsèques représentent un problème majeur dans le cadre de la mise en place de mesures préventives en milieu industriel, notamment pour la détermination de barèmes de traitements technologiques et de doses de désinfectants à utiliser. Les virus entériques sont également infectieux à très faibles doses puisque, selon les virus considérés, une à quelques dizaines de particules virales sont suffisantes

pour induire une infection productive chez l'homme. Un potentiel zoonotique a été clairement mis en évidence pour le VHE et les rotavirus. Pour le VHE, qui a été détecté chez de nombreux animaux domestiques et sauvages (porcs, sangliers, chèvres, moutons, cerfs, vaches, poulets, rats, chiens), une transmission à l'homme par consommation de viande de cervidés crue a été décrite (Tei *et al.* 2003; Takahashi *et al.* 2004). Les rotavirus ont pour caractéristique de posséder un génome constitué de 11 segments d'ARN double brin facilitant les réassortiments génétiques entre souches spécifiques d'espèces différentes lors de co-infections (Nakagomi *et al.* 1994). Isolés chez de nombreux animaux (chiens, chats, vaches, porcs, chevaux, chèvres, moutons, rats, lapins), des passages inter-espèces de rotavirus félins et canins complets (non-issus de réassortiments) à l'homme ont également été démontrés (Nakagomi *et al.* 1992). En ce qui concerne les norovirus, ils sont fréquemment isolés à partir de fèces de veaux, de porcs ou d'autres espèces présentant ou non des symptômes de gastroentérites. Leur capacité zoonotique n'est néanmoins pas clairement démontrée à l'heure actuelle et reste à investiguer (Mattison *et al.* 2007).

## VIRUS ENTÉRIQUES ET ALIMENTS

### Voies de contamination des aliments

La contamination des aliments peut intervenir tout au long de la chaîne agro-industrielle, de la production des matières premières à la consommation des produits commercialisés, en passant par les étapes de transformation et d'élaboration des produits finis. Cette contamination a deux origines principales : l'environnement et l'homme. Au cours de la production, l'irrigation des cultures de fruits et légumes avec de l'eau de mauvaise qualité sanitaire est un facteur important de contamination virale. Il en est de même pour les apports d'engrais biologiques (déjections animales, boues d'épandages n'ayant pas subi de traitement thermique) intervenant lors des pratiques cul-

turales traditionnelles. Ces sources de contamination environnementales sont particulièrement importantes pour les productions végétales et maraîchères réalisées dans les pays en voie de développement (Phanuwan *et al.* 2006; Villar *et al.* 2007). Dans le contexte actuel de libéralisation et de mondialisation des échanges, ces productions représentent un risque non négligeable qu'il faut prendre en considération. L'homme est une autre source de contamination qui peut intervenir à tous les niveaux de la chaîne. Un individu infecté, qu'il développe ou non des symptômes cliniques, va excréter des virus entériques dans ses selles, pendant des périodes relativement longues (de quelques jours à plusieurs semaines selon les virus). Lors de 94 épidémies à norovirus récemment étudiées aux États-Unis, l'implication d'un manipulateur à un niveau de la chaîne de production a été démontrée dans 48 % des cas (Widdowson *et al.* 2005). L'opérateur infecté, ne respectant pas de façon suffisamment stricte les mesures d'hygiène de base (lavage systématique des mains, port de gants...), peut facilement contaminer les produits manipulés (cueillette, transformation, emballage...) ou les surfaces entrant en contact avec les produits (Mbithi *et al.* 1992; Bidawid *et al.* 2000a). La persistance de norovirus infectieux sur des surfaces contaminées (acier inoxydable, céramique, formica) pendant plus de sept jours et leur transfert par contact à des laitues ont été décrits par l'équipe de D'Souza (D'Souza *et al.* 2006). Les capacités de persistance des virus entériques sont également importantes sur les aliments, puisque le poliovirus infectieux a été mis en évidence sur des laitues, des choux blancs et des framboises surgelées, respectivement 11,6, 14,2 et 8,4 jours après des inoculations expérimentales (aliments conservés à 4 °C; Kurdziel *et al.* 2001). Les mesures d'hygiène représentent, en conséquence, un outil essentiel de prévention des contaminations, et ce d'autant plus que les infections virales ne sont pas toujours symptomatiques et donc repérables (Parashar *et al.* 1998).

### Matrices alimentaires présentant un risque de contamination virale élevé

Les aliments mis sur le marché et susceptibles d'être à l'origine de TIAC doivent i) avoir été mis en contact avec des virus entériques infectieux à un moment de leur cycle de production ou de transformation et ii) ne pas avoir subi de traitement technologique ou ne pas avoir été soumis à un traitement virucide totalement efficace. L'étude des catégories d'aliments impliquées dans des épidémies à norovirus aux USA, pendant la période 1998 à 2000, met en évidence que les salades, les sandwichs, les fruits, la viande et les produits de la mer sont respectivement responsables de 26, 13, 17, 11 et 8 % des TIAC (Widdowson *et al.* 2005). L'incrimination de ces catégories de produits, tous types de virus entériques confondus, est confirmée par l'examen des alertes récentes émises par le système européen « Rapid Alert System for Food and Feed » (RASFF; [http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm)) et par celui des cas de toxi-infections d'origine infectieuse, publiés par les systèmes d'information Eurosurveillance (<http://europa.eu/eurosurveillance.org>) et ProMED-mail (International Society for Infectious Diseases;

<http://www.promedmail.org>). Les fruits rouges, et plus particulièrement les framboises, sont les produits qui ont été les plus incriminés, ces dernières années, comme source d'épidémies à norovirus (Cotterelle *et al.* 2005; Falkenhorst *et al.* 2005; Hjertqvist *et al.* 2006). Les framboises, produites majoritairement en Europe de l'Est (Serbie, Pologne), en Chine ou en Amérique du Sud (Chili), sont fréquemment contaminées lors de leur production, puis exportées congelées sans avoir subi de lavage, trop destructurant au regard de la fragilité des fruits. Selon les utilisations et les produits dans lesquelles elles sont incorporées, ces matières premières importées ne subissent aucun traitement technologique après la cueillette ou ont fait l'objet de pasteurisations à des barèmes variables, parfois insuffisants pour obtenir une inactivation virale significative. Les mollusques bivalves (huîtres, moules, clams...) sont des organismes qui filtrent, par leurs branchies, des quantités importantes d'eau (100 à 650 litres/heure/kg de moules), accumulant ainsi dans leur glande digestive des virus entériques (Crocchi *et al.* 2007; Gabrieli *et al.* 2007). À la différence des contaminants bactériens, l'adhésion des virus aux cellules de la muqueuse digestive fait intervenir des liaisons spécifiques limitant fortement l'efficacité des périodes dépuratives qui précèdent la commercialisation (Ueki *et al.* 2007). Leur consommation, crus ou peu cuits, explique leur implication fréquente dans des toxi-infections alimentaires.

## MAÎTRISE DU RISQUE VIRAL EN INDUSTRIE AGRO-ALIMENTAIRE

### Contraintes réglementaires

L'article 14 du règlement européen CE n° 178/2002 indique qu'« aucune denrée alimentaire n'est mise sur le marché si elle est dangereuse » et qu'une « denrée alimentaire est dite dangereuse, si elle est considérée comme: a) préjudiciable à la santé; b) impropre à la consommation humaine ». Dans son considérant 2, le règlement CE n°2073/2005 précise 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 ». Les virus entériques entrent donc parfaitement dans le cadre réglementaire de ces textes qui sont à la base du Paquet Hygiène en vigueur depuis 2006. Néanmoins, ils ne font à l'heure actuelle l'objet d'aucune contrainte réglementaire, ni au niveau européen, ni au niveau national, du fait de l'absence de méthodes fiables et standardisées permettant leur extraction et leur détection dans les aliments et l'eau. Le règlement 2073/2005 précise d'ailleurs dans son considérant 27 qu'« il conviendrait en particulier de fixer des critères applicables aux virus pathogènes dans les mollusques bivalves vivants si les méthodes d'analyses sont suffisamment développées ». Afin de permettre à moyen terme l'établissement de normes européennes et d'imposer des critères virologiques pertinents aux producteurs et industriels mettant sur le marché des produits alimentaires à risque viral potentiel, la Commission Européenne a mandaté le Comité Européen de Normalisation (CEN) pour la mise en

place d'un groupe technique de travail. Ce groupe, baptisé CEN TAG 4 « Detection of viruses in food »\*, associe différents laboratoires experts européens. Son objectif est de proposer à l'horizon 2012, en se basant sur les données disponibles dans la littérature, des méthodes fiables, sensibles et consensuelles, permettant l'extraction et la détection par biologie moléculaire des norovirus (génogroupes I & II) et du VHA dans les aliments et l'eau (embouteillée). On peut supposer qu'à terme, cette démarche sera élargie aux autres virus entériques et notamment, aux virus émergents comme le VHE.

### Détection des virus alimentaires

La recherche des virus entériques dans des matrices alimentaires est complexe. La première phase du processus analytique consiste en une extraction directe des virus potentiellement présents à la surface des matrices solides ou dans des matrices liquides par, respectivement, des méthodes d'éluion/concentration et d'adsorption/élution. L'éluion correspond à une mise en contact de l'aliment avec un tampon alcalin enrichi ou non en extrait de bœuf, ce qui permet d'obtenir une désorption des virus et leur récupération dans le tampon. Ces virus peuvent ensuite être concentrés par ultracentrifugation ou précipitation en présence de polyéthylène glycol (PEG). Pour les liquides alimentaires, les virus sont adsorbés sur un support *via* des interactions de faible énergie (interactions électrostatiques, interactions hydrophobes...), élués par déstabilisation de ces interactions, puis concentrés par ultrafiltration ou centrifugation. Les rendements de ces méthodes d'extraction sont variables selon les matrices et les aliments considérés et, globalement, restent limités. Dans le cadre d'inoculations expérimentales de VHA, les rendements rapportés dans la littérature sont compris entre 15 et 20 % pour des framboises, entre 5 et 10 % pour des huîtres, entre 0,3 et 8 % pour des palourdes; ils sont de 64 % pour des salades (Jaykus *et al.* 1996; Dix *et al.* 1998; Dubois *et al.* 2002; Dubois *et al.* 2006). Pour le poliovirus, dans les mêmes conditions, ces rendements sont respectivement de 15 à 20 %, de 25 à 35 %, de 7 à 50 % et de 18 %.

La seconde phase du processus analytique consiste en la détection des virus recueillis au terme de l'extraction. La méthode de référence généralement utilisée pour la détection des particules virales est la culture cellulaire, méthode sensible et quantitative basée sur l'observation d'un effet cytopathique (ECP) et/ou d'une lyse des cellules permissives. Cette méthode a pour avantage de renseigner sur la présence de virus infectieux (eg, capable d'infecter productivement une cellule hôte). Lourde à mettre en œuvre et peu adaptée à des analyses de routine nécessitant un rendu rapide des résultats, la culture cellulaire n'est pas applicable aux norovirus humains, au VHE et aux sapovirus, pour lesquels il n'existe pas de modèles cellulaires, et reste limitée à certaines souches de VHA, de rotavirus, d'adénovirus et d'astrovirus. Les

méthodes de biologie moléculaire sont spécifiques, sensibles, rapides à mettre en œuvre et applicables à la totalité des virus alimentaires. Elles consistent en la transcription inverse (RT) des ARN viraux en ADN complémentaires, suivie de l'amplification de séquences cibles du génome, spécifiques des virus recherchés, par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Ces analyses RT-PCR peuvent être réalisées en une seule étape (one step), ce qui permet de limiter les risques d'obtention de faux positifs. On utilise actuellement, dans un même mélange réactionnel, un couple d'amorces spécifiques du virus ciblé, associé à une sonde de type TaqMan possédant un reporter à son extrémité 5' et un quencher à son extrémité 3' (Tse & Capeau 2003). En absence de séquence virale cible, le quencher exerce une inhibition du reporter qui ne pourra émettre de fluorescence en réponse à une excitation. En présence de séquences virales cibles spécifiques, la Taq polymérase synthétise le brin complémentaire de ces séquences lors de la phase d'élongation de la PCR et dégrade, par son activité exonucléasique intrinsèque, l'extrémité 5' de la sonde, libérant ainsi le reporter et permettant l'émission d'une fluorescence. Cette émission de fluorescence est visualisée en temps réel (real time), en utilisant un thermocycleur adapté. L'avantage de cette stratégie de détection, retenue par le groupe CEN TAG4, est de permettre, en utilisant des gammes d'ARN ou d'ADN, une quantification du nombre de particules virales présentes dans le mélange réactionnel (en nombre de copies du génome par unité de volume ou de poids de l'échantillon alimentaire analysé). Les rendements limités des méthodes d'extraction imposeront l'intégration, dans les futures normes européennes, d'un contrôle positif de processus d'extraction. Il s'agira probablement d'un entérovirus proche des virus entériques recherchés, qui sera ajouté en quantité connue à l'échantillon alimentaire à analyser, et recherché par RT-PCR, au terme de l'extraction. Du fait de la présence, dans les matrices alimentaires, de nombreuses molécules inhibitrices des réactions PCR (polysaccharides, matières organiques, ions, métaux lourds...), des contrôles d'inhibition et de levée d'inhibition devront également être prévus. Ces méthodes de biologie moléculaire donnent des indications qualitatives et quantitatives sur la présence de génome viral mais ne permettent pas de déterminer le caractère infectieux des virus détectés. Or, des études effectuées sur la persistance de poliovirus et d'un calicivirus félin (modèle des norovirus humains) dans l'eau minérale, à différentes températures, ont clairement mis en évidence des différences très importantes entre le nombre de copies détectées du génome et celui de particules infectieuses associées (Gasilloud *et al.* 2003). Les résultats RT-PCR devront donc être probablement analysés grâce à un logigramme (arborescence de questions-réponses) d'interprétation d'un résultat positif, prenant en considération des critères complémentaires (contexte environnemental, critères d'infectiosité directs ou indirects...), afin de préciser le niveau de probabilité de présence d'un danger (Rapport AFSSA 2007).

\* CEN/TC275 Food Analysis-Horizontal Methods - WG 6 Microbial Contamination - TAG4 Detection of viruses in food.

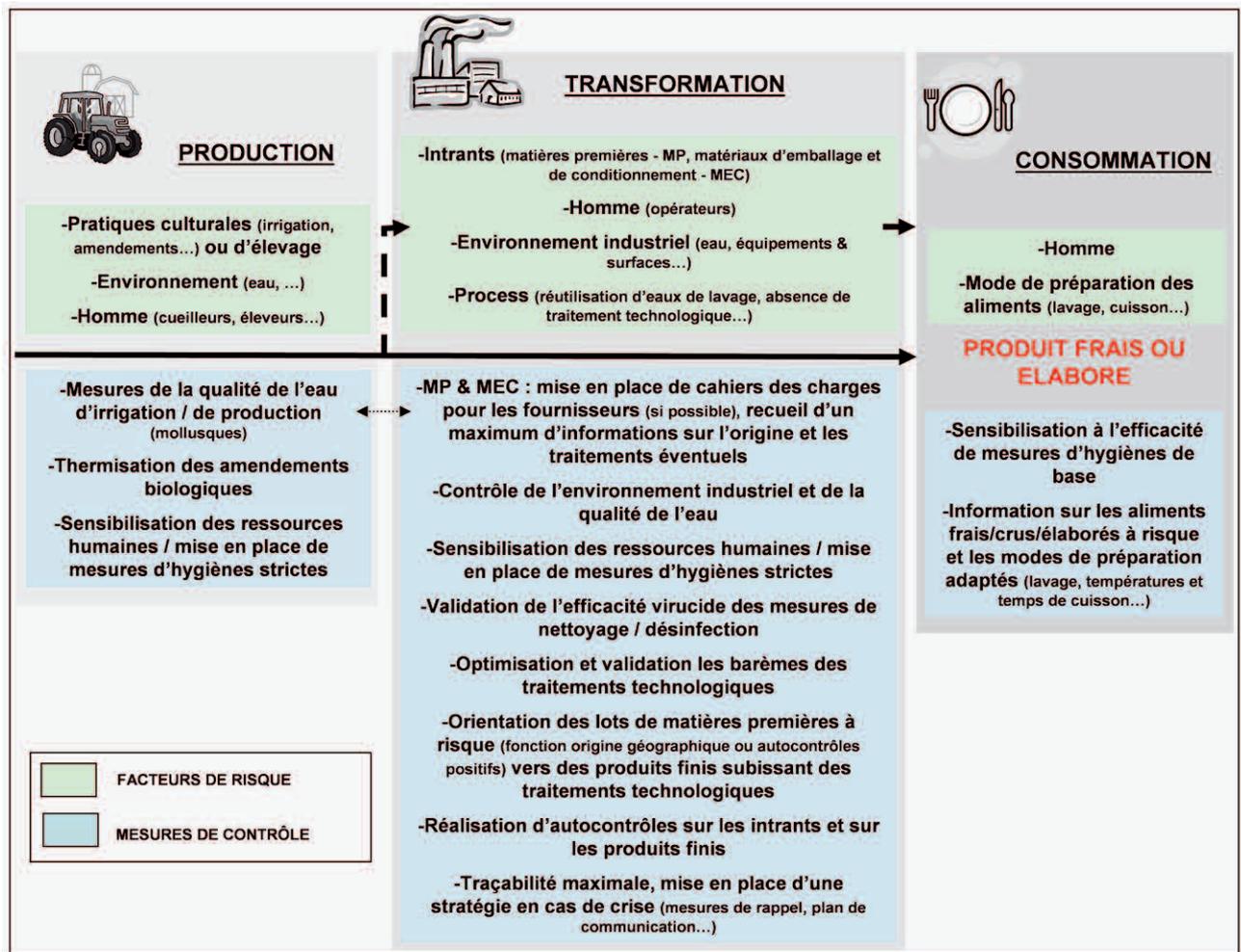


Figure 2: Principe d'intégration du risque viral dans la démarche HACCP en industrie agroalimentaire.

### Impact des traitements technologiques et hygiéniques

Les traitements technologiques, en fonction de leur nature et des barèmes appliqués, ainsi que les mesures de nettoyage/désinfection, utilisés dans les industries agroalimentaires, peuvent inactiver (eg, rendre non infectieux) tout ou partie des contaminants viraux. Il est généralement admis, sur la base des textes normatifs et réglementaires relatifs au traitement de l'eau potable ou aux tests d'efficacité des désinfectants, qu'un traitement est jugé virucide s'il aboutit à une réduction de 4 unités logarithmiques (10 000 fois) du titre viral initialement présent dans la matrice ou sur la surface considérée.

Sur le plan technologique, seule la stérilisation (température à cœur supérieure à 110 °C pendant plusieurs minutes) assure une sécurisation totale du produit traité au regard du risque viral. Des pasteurisations à des températures de l'ordre de 90 °C et plus, pendant plusieurs minutes, présentent également de bons niveaux d'efficacité. Les traitements thermiques à des températures inférieures ont des efficacités plus variables, fonctions des

virus et des propriétés de la matrice traitée (nature de la surface, composition...). Le temps nécessaire, à 80 °C, pour réduire de 4 unités logarithmiques le titre en VHA dans des purées de fraises, passe ainsi de 6,9 à 35,8 minutes pour des teneurs en sucres, respectivement de 28 et 52 % (Deboosere *et al.* 2004). Un effet retardateur du même type a été observé dans des produits laitiers chauffés, riches en matière grasse (Bidawid *et al.* 2000b). La lyophilisation et les technologies alternatives soumises à autorisation (règlement Novel Food) comme la lumière pulsée, les hautes pressions ou l'ionisation, ont des niveaux d'efficacité variable. La congélation, quand à elle, est un moyen de conservation des virus et n'altère pas leur potentiel infectieux.

Peu de données pertinentes sont disponibles sur l'efficacité des produits désinfectants commerciaux sur les virus alimentaires, notamment au regard des nouveaux référentiels européens. Les normes en vigueur imposent généralement des essais sur des virus modèles comme l'entérovirus bovin de type 1 (ECBO) dont les capacités de résistance peuvent être très différentes de celles des virus alimentaires de terrain. L'hypochlorite de sodium (eau de

javel) reste un agent biocide très efficace. La disparition progressive de son utilisation en milieu industriel est néanmoins annoncée avec la mise en place de la directive Biocide (98/8/CE) qui, à terme, va autoriser uniquement l'utilisation de formulations présentant un « risque acceptable pour l'homme et l'environnement ».

Il reste à l'heure actuelle très difficile de prévoir, sur la base des données disponibles dans la littérature, l'efficacité virucide d'un traitement industriel ou hygiénique dans un contexte donné. Des études au cas par cas sur des virus entériques cultivables et représentatifs restent nécessaires pour déterminer avec précision les barèmes et/ou les doses virucides à appliquer.

### Virus et HACCP

La prise de conscience de l'importance de la problématique virale dans le domaine alimentaire est récente. Les données épidémiologiques disponibles restent limitées et parcellaires, les méthodes d'extraction et de détection à partir des matrices alimentaires solides et liquides sont en cours d'élaboration et d'harmonisation au niveau européen, et les connaissances relatives au comportement d'un virus dans un produit ou sur une surface soumis à un traitement technologique ou hygiénique, sont incomplètes. Dans ce contexte, la maîtrise du risque viral en industrie agro-alimentaire ne peut être envisagée qu'à travers une démarche globale d'analyse des dangers et de détermination des points critiques nécessaires à leur maîtrise (HACCP – Hazard Analysis and Critical Control Points). Cette démarche consiste à recenser de façon exhaustive les voies potentielles de contamination, ainsi que les facteurs favorisant la persistance des virus dans l'environnement de production et les contacts virus-produit (nature et origine des matières premières et des matériaux d'emballage/conditionnement), risques liés à l'environnement (qualité sanitaire de l'eau d'irrigation, apport d'engrais biologiques non-traités...), facteur humain, traitement assainissant... ; *figure 2*).

Sur la base de ce recensement, des mesures adaptées de maîtrise des dangers identifiés doivent être mises en place, afin de garantir une sûreté sanitaire maximale des produits commercialisés au regard du risque viral. Parmi ces mesures, on peut évoquer l'orientation de l'utilisation des lots de matières premières en fonction de leur nature et origine, l'optimisation des barèmes des traitements technologiques, la validation de l'efficacité des traitements de nettoyage/désinfection, la sensibilisation du personnel et le respect de mesures d'hygiène stricte, la mise en place de procédures de rappel de lots et d'information des consommateurs... (*figure 2*). La sensibilisation accrue des consommateurs est aussi nécessaire, car des mesures hygiéniques et de consommation simples permettraient de réduire de façon significative le nombre de toxi-infections alimentaires d'origine virale.

### CONCLUSION

La mise en évidence récente de la forte implication des virus entériques dans les épisodes épidémiques infectieux d'origine alimentaire a abouti ces dernières années à une sensibilisation des pouvoirs publics et des industriels, plus particulièrement ceux évoluant dans les secteurs où le risque viral est potentiellement élevé. Outre le travail en cours du groupe Européen CEN TAG4 qui permettra à terme à la Commission Européenne de proposer une réglementation spécifique aux virus alimentaires, de nombreux projets de recherche, fondamentale ou appliquée, s'attachent actuellement à générer des données concernant l'épidémiologie et la prévalence, à étudier les interactions intervenant entre virus et matrices alimentaires, et à définir les niveaux d'efficacité virucide des traitements technologiques et hygiéniques. Ces travaux, auxquels participe l'ADRIA Normandie, sont importants car ils aboutiront à une meilleure connaissance du risque et des moyens permettant de le maîtriser.

### BIBLIOGRAPHIE

- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. 2007. Bilan des connaissances relatives aux virus transmissibles à l'homme par voie orale. 446 pages.
- Arnal, C., Crance, J.-M., Ganter, C., Schwartzbrod, L., Deloince, R., Billaudel, S. 1998. Persistence of infectious hepatitis A virus and its genome in artificial seawater. *Zentralbl Hyg Umweltmed.* 201 : 279 – 284.
- Bidawid, S., Farber, J.-M., Sattar, S.A. 2000a. Contamination of foods by food handlers: experiments on hepatitis A virus transfer to food and its interruption. *Applied Environmental Microbiology* 6 : 2759 – 2763.
- Bidawid, S., Farber, J.-M., Sattar, S.A., Hayward, S. 2000b. Heat inactivation of hepatitis A virus in dairy foods. *Journal of Food Protection* 63 : 522 – 528.
- Chikhi-Brachet, R., Bon, F., Toubiana, L., Pothier, P., Nicolas, J.-C., Flahault, A., Kohli, E. 2002. Virus diversity in a winter epidemic of acute diarrhea in France. *Journal of Clinical Microbiology* 40 : 4266 – 4272.
- Cotterelle, B., Drougard, C., Rolland, J., Becamel, M., Boudon, M., Pinede, S., Traore, O., Balay, K., Pothier, P., Espie, E. 2005. Outbreak of norovirus infection associated with the consumption of frozen raspberries, France, March 2005. *Euro Surveillance weekly release* 10 : E050428.1.
- Croci, L., Losio, M.N., Suffredini, E., Pavoni, E., Di Pasquale, S., Fallacara, F., Arcangeli, G. 2007. Assessment of human enteric viruses in shellfish from the northern Adriatic sea. *International Journal of Food Microbiology* 114 : 252 – 257.
- 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. *International Journal of Food Microbiology* 93 : 73 – 85.

- Dix, A.B. & Jaykus, L.A. 1998. Virion concentration method for the detection of human enteric viruses in extracts of hard-shelled clams. *Journal of Food Protection* 61: 458 – 465.
- Dubois, E., Agier, C., Traore, O., Hennechart, C., Merle, G., Cruciere, 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. *Journal of Food Protection* 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. *International Journal of Food Microbiology* 108: 164 – 171.
- D'Souza, D.H., Sair, A., Williams, K., Papafragkou, E., Jean, J., Moore, C., Jaykus, L. 2006. Persistence of caliciviruses on environmental surfaces and their transfer to food. *International Journal of Food Microbiology* 108: 84 – 91.
- Falkenhorst, G., Krusell, L., Lisby, M., Madsen, S.B., Böttiger, B., Molbak, K. 2005. Imported frozen raspberries cause a series of norovirus outbreaks in Denmark, 2005. *Euro Surveillance weekly release* 10: E050922.2.
- Gabrieli, R., Macaluso, A., Lanni, L., Saccare, S., Di Giamberardino, F., Cencioni, B., Petrinca, A.R., Divizia, M. 2007. Enteric viruses in molluscan shellfish. *The New Microbiologica* 30: 471 – 475.
- Gassilloud, B., Schwartzbrod, L., Ganter, C. 2003. Presence of viral genomes in mineral water: a sufficient condition to assume infectious risk? *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3965 – 3969.
- Hjertqvist, M., Johansson, A., Svensson, N., Abom, P.E., Magnusson, C., Olsson, M., Hedlund, K.O., Andersson, Y. 2006. Four outbreaks of norovirus gastroenteritis after consuming raspberries, Sweden, June-August 2006. *Euro Surveillance weekly Release* 11: E060907.1.
- Institut National de Veille Sanitaire (INVS). 2004. Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France. 192 pages.
- Jaykus, L.A., De Leon, R., Sobsey, M.D. 1996. A virion concentration method for detection of human enteric viruses in oysters by PCR and oligoprobe hybridization. *Applied Environmental Microbiology* 62: 2074 – 2080.
- Kroneman, A., Vennema, H., Harris, J., Reuter, G., von Bonsdorff, C.H., Hedlund K.O., Vainio, K., Jackson, V., Pothier, P., Koch, J., Schreier, E., Böttiger, B., Koopmans, M. 2006. Increase in norovirus activity reported in Europe. *Euro Surveillance weekly release* 11: E061214.1.
- Kurdziel, A.S., Wilkinson, N., Langton, S., Cook, N. 2001. Survival of poliovirus on soft fruit and salad vegetables. *Journal of Food Protection* 64: 706 – 709.
- Lopman, B.A., Vennema, H., Kohli, E., Pothier, P., Sanchez, A., Negro, A., Bueqa, J., Schreier, E., Reacher, M., Brown, D., Gray, J. *et al.* 2004. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet* 363: 682 – 688.
- Mattison, K., Shukla, A., Cook, A., Pollari, F., Friendsh, R., Kelton, D., Bidawid, S., Farber, J.-M. 2007. Human noroviruses in swine and cattle. *Emerging Infectious Diseases* 13: 1184 – 1188.
- Mbithi, J.N., Springthorpe, V.S., Boulet, J.-R., Sattar, S.A. 1992. Survival of hepatitis A virus on human hands and its transfer on contact with animate and inanimate surfaces. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 757 – 763.
- 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. *Emerging Infectious Diseases* 5: 607 – 625.
- 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. *Annual Review of Microbiology* 49: 461 – 487.
- 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. *Archives of Virology* 137: 381 – 388.
- 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. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 1011 – 1013.
- Parashar, U.D., Dow, L., Fankhauser, R.L., Humphrey, C.D., Miller, J., Ando, T., Williams, K.S., Eddy, C.R., Noel, J.-S., Ingram, T., Bresee, J.-S., Monroe, S.S., Glass, R.I. 1998. An outbreak of viral gastroenteritis associated with consumption of sandwiches: implications for the control of transmission by food handlers. *Epidemiology and Infection* 121: 615 – 621.
- Phanuwat, C., Takizawa, S., Oguma, K., Katayama, H., Yunika, A., Ohgaki, S. 2006. Monitoring of human enteric viruses and coliform bacteria in waters after urban flood in Jakarta, Indonesia. *Water Science and Technology* 54: 203 – 210.
- 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: 501 – 505.
- Tei, S., Kitajima, N., Takahashi, K., Mishiro, S. 2003. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 362: 371 – 373.
- Tse, C. & Capeau, J. 2003. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Annales de Biologie Clinique* 61: 279 – 293.
- Ueki, Y., Shoji, M., Suto, A., Tanabe, T., Okimura, Y., Kikuchi, Y., Saito, N., Sano, D., Omura, T. 2007. Persistence of caliciviruses in artificially contaminated oysters during depuration. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5698 – 5701.
- Villar, L.M., de Paula, V.S., Diniz-Mendes, L., Guimarães, F.R., Ferreira, F.F., Shubo, T.C., Miagostovich, M.P., Lampe, E., Gaspar, A.M. 2007. Molecular detection of hepatitis A virus in urban sewage in Rio de Janeiro, Brazil. *Letters in Applied Microbiology* 45: 168 – 173.
- Widdowson, M.A., Sulka, A., Bulens, S.N., Beard, R.S., Chaves, S.S., Hammond, R., Salehi, E.D.P., Swanson, E., Totaro, J., Woron, R., Mead, P.S., Bresee, J. S., Monroe, S.S., Glass, R.I. 2005. Norovirus and foodborne disease, United States, 1991-2000. *Emerging Infectious Diseases* 11: 95 – 102.