

FORMATION CONTINUE – ARTICLE DE SYNTHESE

La contamination de l'eau et des aliments par les virus pathogènes pour l'homme

SCIPIONI A.*,**, DAUBE G.* , THIRY E.**

* Département des sciences des denrées alimentaires, Secteur microbiologie

** Département des maladies infectieuses et parasitaires, Service de virologie

Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster, 20, bât 43bis,
B-4000 Liège, Belgique

Correspondant: Scipioni Alexandra

E Mail: Alexandra.Scipioni@ulg.ac.be

RESUME. La contamination des aliments et de l'eau par les virus humains est un réel problème de santé publique. Ces virus potentiellement transmissibles sont excrétés dans les selles de malades ou de porteurs sains. Il s'agit des calicivirus de type Norwalk, du virus de l'hépatite E, des poliovirus, des échovirus, du virus de l'hépatite A, des rotavirus, astrovirus, adénovirus entériques et du parvovirus B19. A la vue des données épidémiologiques, les plus importants sont les virus de type Norwalk, les rotavirus et le virus de l'hépatite A. Les aliments le plus souvent impliqués sont des coquillages (mollusques bivalves) parqués dans des eaux souillées par des matières fécales humaines, ainsi que l'eau elle-même. L'autre voie d'infection est due à la manipulation des aliments par des préparateurs eux-mêmes malades. Dans ce cas, des aliments très divers sont contaminés tels que des légumes crus, sandwiches, fruits et pâtisseries. La détection de ces virus dans les aliments est rendue complexe pour plusieurs raisons: les interactions virus-aliments rendent la concentration et la purification virale délicates, la culture *in vitro* de ces virus est difficile voire impossible et la quantité de virus présents dans l'échantillon est faible. Aussi, les techniques moléculaires, dont la polymérisation en chaîne, sont les plus adaptées à la détection de ces virus. Une autre alternative consiste à choisir un indicateur de contamination virale fécale. La piste des bactériophages semble être la plus prometteuse.

INTRODUCTION

Il est actuellement primordial d'assurer la meilleure sécurité alimentaire aux consommateurs. Outre les bactéries, plusieurs virus sont susceptibles d'être transmis à l'homme par l'alimentation. En Belgique, la présence de contaminants viraux n'est pas recherchée en routine dans les aliments. Si une épidémie pour laquelle une origine virale est suspectée se déclare, des enquêtes épidémiologiques devraient être menées pour identifier l'aliment ainsi que le virus impliqués. L'analyse de l'aliment incriminé permettrait de confirmer la suspicion si le délai écoulé entre la déclaration de l'épidémie et la consommation de l'aliment le plus probablement concerné n'est pas trop long.

Les virus transmissibles à l'homme par l'alimentation sont principalement

les virus responsables des hépatites A et E, les calicivirus de type Norwalk (Small Round Structured Viruses), les rotavirus et les astrovirus. Ces virus, non enveloppés, possèdent une grande stabilité dans le milieu extérieur et une certaine résistance aux agents de dénaturation physico-chimiques (Nicand *et al.*, 1998). Il s'ensuit que la consommation de ces denrées alimentaires souillées conduit le plus souvent à des gastro-entérites et des hépatites aiguës et, parfois, à la poliomyélite (Stolle et Sperner, 1997). Les virus humains impliqués le plus fréquemment sont repris dans le tableau I. Tous ces virus ont la propriété d'être excrétés dans les matières fécales et sont potentiellement transmissibles via les aliments ou l'eau souillés. La transmission peut être directe, de personne à personne, ce

qui est habituel pour les rotavirus, les entérovirus, les virus de type Norwalk, le virus de l'hépatite A et les adénovirus. Elle peut également être indirecte par consommation d'eau, d'aliments ou d'objets souillés (Nicand *et al.*, 1998).

Cet article détaille, selon la famille virale, les propriétés des différents virus humains qui peuvent contaminer l'alimentation.

VIRUS TRANSMIS PAR LES ALIMENTS

Calicivirus

Virus de type Norwalk

Le virus Norwalk est étroitement apparenté aux Calicivirus. Il a été

Tableau I
Virus pathogènes pour l'homme transmis par les aliments

VIRUS			SEROTYPES	GENOME	MALADIE
famille	genre	espèce			
Caliciviridae	Calicivirus	Virus de Norwalk	1	ARN monocaténaire + 7500 b	Gastro-entérite
		Apparentés et SRSV (small round structured viruses)	3 au moins	ARN monocaténaire + 7500 b	Gastro-entérite
?	Hepatitis E like	Virus de l'hépatite E	1	ARN monocaténaire + 8000 b	Hépatite infectieuse
Picornaviridae	Entérovirus	Poliovirus	3	ARN monocaténaire + 7500 à 8500 b	Paralysie, méningite
		Echovirus	32	ARN monocaténaire + 7500 à 8500 b	Méningite, infection respiratoire, conjonctivite
	Hépatovirus	Virus de l'hépatite A	1	ARN monocaténaire + 7500 b	Hépatite infectieuse
Reoviridae	Rotavirus	Rotavirus humains	3 (A, B, C)	ARN bicaténaire 18 à 27 kpb	Gastro-entérite
Astroviridae	Astrovirus	Astrovirus humains	8 en Europe	ARN monocaténaire + 6800 b	Gastro-entérite
Adenoviridae	Mastadénovirus	Adénovirus humains	41	ADN bicaténaire 30 à 37000 b	Gastro-entérite
Parvoviridae	Erythrovirus	Parvovirus B19	1	ADN monocaténaire + ou - 4600 à 6000 b	érythème infectieux ou cinquième maladie, parfois aplasie médullaire et malformations foetales

classé dans la famille des *Caliciviridae* sur base de la séquence et de l'organisation de son acide ribonucléique (ARN) génomique (Jiang *et al.*, 1993; Lambden *et al.*, 1993). Le virus Norwalk est le prototype d'un groupe de virus non enveloppés ayant un diamètre de 27 à 35 nm associés à des épidémies de gastro-entérites. Les virus de ce groupe ont été baptisés du nom du lieu où ils ont été décrits pour la première fois (Etats-Unis: Norwalk, Montgomery County, Hawaï, Snow Mountain; Angleterre: Taunton, Moorcroft, Barnett, Amulree; Japon: Sapporo, Otofuke). C'est le virus Norwalk qui est le plus fréquemment rencontré. Il existe au moins quatre groupes sérologiques distincts parmi les virus de type Norwalk. Les virus Norwalk, Hawaï, Snow Mountain et Taunton ont été classés respectivement comme sérotypes 1, 2, 3 et 4.

Un autre groupe officiellement non classé de virus fécaux considérés préalablement comme small round structured virus (SRSV) apparaît maintenant appartenir au groupe des virus Norwalk dans la famille des *Caliciviridae*. Ils ont été baptisés initialement *minireovirus*, détectés chez des enfants

atteints de gastro-entérites d'origine nosocomiale ou hospitalisés pour gastro-entérite (Kapikian *et al.*, 1996).

Ces virus sont non enveloppés, de symétrie icosaédrique, et ont un diamètre allant de 27 à 35 nm. Ils possèdent une seule protéine de structure de 60 kDa constituant la capsid. Leur génome est composé d'ARN monocaténaire de polarité positive d'une taille de 7,5 kb. On y trouve trois cadres ouverts de lecture (open reading frame, ORF) majeurs. En allant de l'extrémité génomique 5' vers 3', le premier ORF code pour un précurseur des protéines non structurales de 1738 acides aminés, le deuxième code pour la protéine de capsid de 530 acides aminés et le troisième code pour une petite protéine de 212 acides aminés dont le rôle est encore inconnu (Kapikian *et al.*, 1996).

Ces virus sont responsables de gastro-entérites légères d'une durée de 12 à 48 heures. La maladie commence brutalement par des vomissements ou de la diarrhée dans lesquelles on retrouve du virus infectieux. L'incubation dure en moyenne 24 heures et l'excrétion virale dans les selles conti-

nue un à deux jours après la disparition des symptômes. Ces virus sont très contagieux et la transmission se fait habituellement par la voie féco-orale (Estes et Leparc-Goffart, 1999). Ils sont impliqués dans un tiers des cas de gastro-entérites si on ne tient pas compte de la classe d'âge des enfants de six à 24 mois. Dans les pays en voie de développement, il y a acquisition d'une immunité très tôt dans la vie. Plus de 90% des enfants de deux ans ont été confrontés à ce virus (Estes et Leparc-Goffart, 1999). Dans les pays industrialisés, une augmentation lente du pourcentage de personnes immunisées avec l'âge est constatée avec environ 50% de séroconversion à 18 ans. Cette immunité n'est pas permanente et les réinfections peuvent survenir. Les cas apparaissent quelle que soit la saison surtout dans des lieux comme les écoles, les restaurants, les maisons de soins et de repos.

Comme moyen de prévention hygiénique, un lavage de mains soigneux avec du savon et une évacuation efficace du matériel contaminé devraient réduire la transmission de ces virus. La vaccination, quant à elle, n'est pas encore au point. Son élaboration est

compliquée par le fait que ces virus ne se multiplient pas en culture de cellules et que les bases de leur immunité à long terme ne sont pas élucidées (Kapikian *et al.*, 1996).

Le diagnostic étiologique de ces diarrhées est réalisé par microscopie électronique, immuno-microscopie électronique ou radioimmunoassay (RIA) sur les selles. La confirmation de ces tests se fait par démonstration de la séroconversion (IgM) ou par l'augmentation d'au moins un facteur 4 du taux d'anticorps Norwalk sur des sérum couplés. Le génome viral peut être détecté par amplification génique après rétro-transcription (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) (Estes et Leparc-Goffart, 1999).

Virus de l'hépatite E

L'hépatite E est aussi appelée hépatite non A non B à transmission féco-orale. Ses propriétés physico-chimiques ont permis de classer le virus responsable parmi les virus «Calicivirus-like». Il a cependant été retiré de la famille des *Caliciviridae* en 1998 et désigné comme virus «hepatitis E like», genre non classé.

Le virus de l'hépatite E (VHE) fait 32 à 34 nm de diamètre. Son génome se compose d'ARN monocaténaire de polarité positive de 7,5 kb. Il est constitué de trois ORFs, deux majeurs et un mineur. Aux extrémités 3' et 5' du génome, on retrouve des petites séquences non codantes. Du côté 5' du génome se situent les séquences codant pour les protéines non structurales et du côté 3', pour les protéines structurales. Le premier ORF code pour des protéines non structurales comme l'hélicase, la méthyltransférase, l'ARN polymérase ARN-dépendante. Le deuxième ORF code pour la protéine de capsid unique. Le troisième code pour une protéine de 123 acides aminés dont le rôle est inconnu. Plusieurs souches ont été identifiées et séquencées complètement ou partiellement (Tam *et al.*, 1999).

Les symptômes sont très proches de ceux de l'hépatite A. L'incubation dure de deux à neuf semaines et la transmission est féco-orale. Les jeunes et les adultes jusqu'à 40 ans sont les plus touchés. Le taux de mortalité varie de 0,1 à 1% sauf pour les femmes

enceintes, où le pourcentage s'élève à 20% environ, car celles-ci sont plus sensibles au VHE.

L'épidémiologie de ce virus montre qu'il existe à la fois de façons épidémique et sporadique. Les cas sont identifiés en Asie, dans le Nord-Est de l'Afrique et en Inde dans des régions où les mesures sanitaires manquent, surtout pour l'eau. Dans les pays en voie de développement, le VHE est une cause majeure de mortalité et de morbidité. En Europe et aux USA, il n'existe pas à l'état endémique. Les cas identifiés sont des touristes ou des immigrants venant de régions où le VHE est endémique.

Les hommes sont les hôtes naturels du VHE; cependant des anticorps contre le VHE ont été aussi détectés chez des rongeurs et des singes. Cela suggère leur exposition au VHE ou à un agent proche. L'infection naturelle de certaines espèces domestiques comme les poulets, les porcs, et les bovins a récemment été décrite, surtout dans les pays où le VHE existe à l'état endémique. Les chercheurs ont longtemps essayé de trouver une explication au fait que, dans des régions non endémiques, il existe une prévalence relativement élevée contre le VHE. Il se peut qu'il existe un réservoir animal du VHE et qu'il puisse potentiellement se transmettre à l'homme.

Le diagnostic de l'hépatite E se fait par exclusion sérologique des virus des hépatites A et B, par les caractéristiques épidémiologiques et la confirmation peut être réalisée par microscopie électronique sur matières fécales prélevées en phase aiguë. On peut détecter les anticorps dans le sérum, mais il est impossible de différencier si l'infection est en cours ou terminée (Tam *et al.*, 1999).

Il n'existe pas à l'heure actuelle de vaccin sur le marché. Des tentatives de protection de primates contre le VHE par vaccin recombinant ont donné des résultats encourageants (Purcell, 1996).

Picornavirus

Genre Entérovirus

Le genre Entérovirus est subdivisé en plusieurs espèces: poliovirus (3 sérotypes), coxackievirus groupe A et B et échovirus. Cette classification est

parfois ambiguë et, en 1969, il fut décidé que les nouveaux entérovirus seraient désignés par un numéro commençant à 68. Les virus EV68 à 71 ont été décrits et parmi eux, EV68 et 69 ont peu d'importance en médecine humaine, EV70 est responsable de conjonctivites aiguës et EV71 est une cause majeure de méningite aseptique. Le virus de l'hépatite A a été provisoirement appelé EV72, et, plus tard, il a été classé dans un genre spécifique, celui des Hépatovirus (Minor, 1999).

Ces virus ont une capsid de symétrie icosaédrique et un diamètre allant de 25 à 30 nm. Leur génome se compose d'ARN monocaténaire de polarité positive de 7,5 à 8,5 kb. Une unique ORF le constitue. A l'extrémité 5' du génome on retrouve les gènes codant pour les protéines de structure (VP 1 à 4), tandis que à l'extrémité 3', on retrouve les gènes codant pour les protéines non structurales. En fait, une seule polyprotéine est synthétisée et clivée en 11 protéines individuelles.

Les hommes sont les seuls réservoirs connus pour les entérovirus humains, donc les contacts rapprochés entre ceux-ci sont la principale voie de transmission. On retrouve un grand nombre d'entérovirus au niveau de l'oropharynx et de l'intestin des personnes infectées. Le virus est excrété pendant une longue période dans les matières fécales (un mois ou plus). D'autre part, lors d'éternuement ou de toux, les aérosols projetés sont une source de contamination directe ou indirecte. La plupart des infections à entérovirus sont caractérisées par des manifestations subcliniques; malgré cela, ils peuvent aussi être à l'origine de symptômes divers tels que les méningites aseptiques, myocardites, hépatites, signes respiratoires supérieurs. Le spectre et la sévérité des manifestations cliniques varient en fonction de l'âge et du statut immunitaire de l'hôte.

L'hygiène et la vaccination sont des moyens efficaces de lutte (Melnick, 1996).

Poliovirus

Ces virus circulent dans le monde entier, majoritairement sous forme sauvage dans les pays en voie de développement, et sous forme vaccinale dans les pays industrialisés. Leurs

hôtes naturels sont les hommes et les chimpanzés. Le virus est excrété dans les matières fécales ainsi que par le naso-pharynx. La transmission de l'infection emprunte surtout la voie féco-orale.

L'évolution génétique de ces virus est rapide et s'effectue par mutation (10 mutations par génome par mois) et par recombinaison. Les poliovirus des différents sérotypes sont antigéniquement distincts et ne confèrent pas d'immunité croisée. Les jeunes enfants constituent le réservoir de l'infection. Des conditions de vie médiocres augmentent la fréquence de transmission de l'infection. Dans les pays où l'hygiène est importante, les enfants sont épargnés, mais, de ce fait, les individus plus âgés seront sensibles à l'infection et cela peut conduire à des épidémies.

Il existe des vaccins contre les poliovirus, le type Salk, c'est à dire inactivé au formol et le type Sabin, atténué trivalent (Minor, 1999). La législation belge précise que la vaccination est obligatoire en Belgique avec le vaccin Sabin oral. Un passage à la vaccination par le vaccin Salk injectable est envisagé par le Conseil Supérieur d'Hygiène dans les années à venir.

L'organisation mondiale de la santé (OMS) a adopté en 1988 un programme d'éradication globale de la poliomyélite pour la fin de l'an 2000. En Belgique, le dernier cas de poliomyélite remonte à 1983 (Smith *et al.*, 1998). La réduction considérable de l'incidence globale de la poliomyélite, liée au succès de la vaccination par le vaccin Sabin oral atténué et l'absence de cas indigènes dans la majorité des pays industrialisés depuis plusieurs années, laisse prévoir l'interruption de la vaccination contre cette affection à moyen terme. Elle sera autorisée lorsque l'OMS certifiera l'éradication de la maladie au niveau global sur base d'enquêtes réalisées dans chaque pays. Dans de nombreux pays au sein desquels la maladie sauvage est absente depuis plusieurs années et dont la politique de vaccination repose sur l'utilisation du vaccin Sabin vivant atténué, le risque de syndrome poliomyélitique postvaccinal, bien qu'extrêmement faible, a amené les autorités sanitaires à recommander le passage au vaccin Salk injectable inac-

tif (Levy, 1999). Aux Etats-Unis, il est utilisé depuis 1997 et remplace progressivement le vaccin Sabin oral. Il est prévu qu'en 2001 seul l'emploi du vaccin Salk y soit autorisé (Anonyme, 1999).

En conclusion, le vaccin Sabin est utilisé dans les pays en voie de développement car il est d'une efficacité supérieure dans le cadre d'une politique d'éradication, par contre, là où le virus sauvage est éliminé, on passe progressivement à l'utilisation du vaccin Salk.

Echovirus

Ce groupe a été défini en 1955 comme faisant partie du genre *Entérovirus* de la famille des *Picornaviridae*. Les sous-groupes des échovirus consistent en 31 types: 1-9, 11-27, 29-33. Ces virus sont retrouvés dans le monde entier. Ils sont surtout présents en été et au début de l'automne dans les régions au climat tempéré et résident à l'état endémique dans les régions tropicales.

Les hommes sont le seul réservoir connu pour les échovirus et de ce fait les contacts rapprochés sont la voie primaire de dissémination. La voie féco-orale est le principal mode de contamination. Les échovirus, représentés par une population très hétérologue de virus, ont un génome possédant une grande adaptabilité ainsi qu'une évolution rapide, expliquée par des mutations ponctuelles.

Il n'existe pas de vaccin contre les échovirus (Kopecka, 1999).

Genre Hépatovirus

Virus de l'hépatite A

Le virus de l'hépatite A (VHA) a été classé dans un genre spécifique, celui des Hépatovirus. Plusieurs caractéristiques ont permis ce classement: son tropisme pour le foie, sa thermostabilité, sa multiplication lente, l'absence de cytopathogénicité et sa forte tendance à initier une infection persistante en culture de cellules (Beard et Lemon, 1999).

Il a un diamètre de 27 nm et est grossièrement sphérique en microscopie électronique. Sa capsidé est de symétrie icosaédrique avec 60 copies de chacun des 3 polypeptides majeurs: 1B (VP2), 1C (VP3), 1D (VP1). On

ne sait pas s'il existe une petite protéine de capsidé (1A,VP4) qui est présente chez les autres picornavirus. Son génome est composé de ARN monocaténaire de polarité positive, d'environ 7,5 kb. Aux extrémités 5' et 3' du génome, on trouve des régions non codantes, respectivement de 735 et 64 bases, encadrant l'unique ORF. La région non codante située en 5' est conservée parmi les virus de l'hépatite A (souvent plus de 92% de nucléotides identiques). L'ORF code pour onze protéines, son expression se faisant en une seule grande polyprotéine (Beard et Lemon, 1999).

Le virus de l'hépatite A existe dans beaucoup de populations humaines, surtout dans les pays en voie de développement où les conditions d'hygiène ne sont pas satisfaisantes. La transmission est féco-orale (Hollinger et Ticehurst, 1996). La période d'incubation peut durer de 4 à 6 semaines. Les symptômes présentés sont une apparition soudaine de fièvre, de malaise, des nausées, d'un inconfort abdominal suivis de quelques jours par de l'ictère (jaunisse, urines foncées, selles claires). Un facteur important qui influence la gravité de la maladie est l'âge du patient. En dessous de deux ans, l'infection reste asymptomatique. Au-delà de 18 ans, l'infection est dans la plupart des cas symptomatique avec de l'ictère dans deux tiers des cas (Beard et Lemon, 1999).

L'homme ainsi que plusieurs espèces de primates supérieurs comme le chimpanzé et plusieurs espèces de macaques sont les hôtes de ce virus. Dans les pays en voie de développement, l'incidence de l'hépatite clinique est faible car les individus sont exposés dès leur plus jeune âge au virus. Ainsi la plupart des personnes de plus de 18 ans ont acquis une immunité qui les protégera à vie contre une réinfection éventuelle. Dans les pays industrialisés, le pourcentage de personnes immunisées augmente avec l'âge (de 10% à 18 ans jusqu'à 65% à plus de 50 ans). Aux USA, on estime à 22.700 le nombre de cas d'hépatite A par an, ce qui représente 38% des cas d'hépatites (Anonyme, 1995). En Belgique, le réseau de laboratoire de microbiologie de l'Institut Pasteur a diagnostiqué 504 cas dont 204 en Wallonie pour l'année 1998 (Ducoffre, 1999).

Il existe un vaccin inactivé au formol contre l'hépatite A. Un autre moyen de prévention et de lutte contre la maladie est l'administration d'IgG issues de sérum immuns. Ils préviennent une infection et, s'ils sont administrés dans les 2 semaines suivant l'exposition au virus, diminuent la gravité des symptômes (Beard et Lemon, 1999).

L'isolement du VHA en culture de cellules est difficile, lent et fastidieux. La multiplication est lente, presque toujours non cytopathogène et le virus a tendance à établir une infection persistante. Le diagnostic de l'hépatite A consiste en la mise en évidence, aussi bien pendant la phase aiguë qu'en convalescence, des IgM dans le sérum. Des paramètres chimiques permettant d'objectiver les lésions hépatiques aident au diagnostic, comme le dosage de l'alanine aminotransférase (ALT) qui augmente de plusieurs fois par rapport à la norme et celui de l'aspartate aminotransférase (AST) qui augmente, mais de façon plus faible comparée à l'ALT. Cependant, des tests sérologiques sont nécessaires pour différencier les différentes hépatites (Beard et Lemon, 1999).

Reovirus

Rotavirus

On reconnaît 6 groupes sérologiques parmi les rotavirus dont 3 infectent l'homme (A, B et C) et sont responsables de gastro-entérites aiguës. Chez les animaux, on retrouve les groupes A à F. Le groupe A est divisé en fonction de la réaction d'anticorps monoclonaux reconnaissant la protéine VP6 en deux sous-groupes I et II.

Il existe une classification sérologique ressemblant à celle utilisée pour les virus influenza (HN), ici on utilise les protéines VP4 et VP7 respectivement rebaptisées P et G. Toutes deux induisent la formation d'anticorps neutralisants, VP4 étant hémagglutinante et responsable de l'attachement du virus à la cellule (Glass, 1996). VP7 est la protéine la plus représentée sur la capsid externe, elle est glycosylée bien que les rotavirus ne soient pas enveloppés.

Le génome segmenté est composé de 11 segments d'ARN bicaténaire de 18 à 27 kpb au total. Un segment est bicistrone, 10 sont monocistro-

niques. L'ARN viral est entouré d'une capsid double (2 couches distinctes de protéines) de 60 à 80 nm de diamètre, dont la partie interne est de symétrie icosaédrique, et il est non enveloppé. Les protéines structurales sont nommées VP et numérotées de 1 à 7. VP4 et VP7 forment la capsid externe; VP6, la capsid interne tandis que VP2 avec VP1 et VP3 constituent le cœur du virus. Parmi les protéines non structurales, on retrouve la transcriptase ARN polymérase ARN dépendante. Au niveau des extrémités 5' et 3' du génome sont situées de courtes séquences répétées spécifiques d'un même groupe sérologique. Pour pouvoir pénétrer dans les cellules, il faut le clivage de VP4 en VP5 et VP8 par la trypsine (Estes et Cohen, 1989; Cohen, 1996).

Les rotavirus du groupe A existent à l'état endémique dans le monde entier et sont la cause majeure de diarrhées sévères parmi les nourrissons et les enfants. Il existe une variation saisonnière de l'émergence des cas. Dans les zones tempérées, on retrouve le virus surtout en janvier et février tandis que, sous les tropiques, on le retrouve toute l'année. Les nourrissons dans les hôpitaux (cas fréquents de diarrhée à rotavirus d'origine nosocomiale), les immunodéprimés, les jeunes enfants dans les garderies sont les plus touchés. Les rotavirus du groupe B sont responsables de diarrhées aiguës chez l'adulte (tous les âges) en Chine surtout (Kapikian et Chanock, 1996; Shaw et Greenberg, 1999). Les rotavirus du groupe C sont retrouvés dans des cas rares et sporadiques de diarrhée aiguë dans beaucoup de pays (Estes et Cohen, 1989).

La voie de contamination est la voie féco-orale et la période d'incubation dure moins de 48 heures. Les rotavirus sont responsables de gastro-entérites aiguës avec vomissements, diarrhée aqueuse et peu de fièvre. Jusqu'à l'âge de trois mois, il y a protection par les anticorps maternels, ensuite les cas de diarrhée avec grave déshydratation sont fréquents jusqu'à l'âge de 3 ans environ. Durant les 5 premières années de la vie, on retrouve la même incidence des diarrhées à rotavirus dans les pays en voie de développement que dans les pays industrialisés. Il semblerait donc que l'hygiène ait peu d'impact sur leur

contrôle. Pour les enfants de plus de trois ans et les adultes, l'infection est légère, voire asymptomatique (Glass, 1996).

Les études épidémiologiques sont réalisées par tests sérologiques ou électrophorèse sur matières fécales. Aux USA, il est estimé qu'annuellement, dans la classe d'âge des enfants de un à quatre ans, 1 million de cas de diarrhées sévères à rotavirus dont 150 mortelles sont dénombrées. On constate un taux élevé de morbidité mais avec un taux de mortalité faible dû à l'utilisation, depuis 1940, de la réhydratation et des électrolytes. Dans les pays en voie de développement, 125 millions de cas sont recensés, dont on estime que 873.000 sont mortels (ces chiffres concernent les enfants de moins de cinq ans) (Kapikian et Chanock, 1996).

Très tôt dans la vie, on constate qu'il y a présence d'anticorps. Par exemple, à Washington, plus de 90% des enfants de moins de 3 ans ont acquis une immunité (Kapikian et Chanock, 1996).

La désinfection efficace de matériel contaminé et le lavage conscientieux des mains avec du savon constituent des mesures importantes pour contenir l'infection, surtout dans les hôpitaux et les institutions. Les rotavirus sont résistants à l'inactivation physique et un très grand nombre de particules virales sont libérées dans les selles, ce qui favorise leur transmission. La vaccination apparaît comme la seule mesure de contrôle efficace. Celle-ci est en cours d'étude. L'aptitude souhaitée pour un vaccin contre les rotavirus serait de protéger durant les deux premières années de la vie contre les gastro-entérites sévères. Il ressort de plusieurs études sur les animaux que l'immunité intestinale locale joue un rôle important dans la résistance aux infections à rotavirus. L'efficacité d'un vaccin reposera donc sur sa capacité à stimuler les IgA intestinales ainsi que les autres formes d'immunité locale. Les rotavirus humains et animaux partagent un antigène majeur, ce qui explique l'utilisation de virus bovins dans les vaccins à usage humain. De bons résultats avaient été obtenus par passages en culture de cellules d'une souche de rotavirus bovin de sérotype 6, mais ce

vaccin ne parvenait pas à induire une protection contre la maladie dans plusieurs pays en voie de développement et certains pays industrialisés (Kapikian et Chanock, 1996). D'autres essais ont été menés et la meilleure protection est obtenue grâce à un vaccin quadrivalent qui inclut la spécificité de VP7 des 4 sérotypes importants. Cela tient compte de la segmentation du génome et de sa capacité à subir des réassortiments génétiques (Kapikian et Chanock, 1996). Aucun vaccin n'est actuellement commercialisé.

L'identification des rotavirus dans les selles peut être faite par microscopie électronique et électrophorèse sur gel de polyacrylamide. La microscopie électronique est une ancienne méthode ayant une haute spécificité pour les rotavirus car leur morphologie est caractéristique. Pour les rotavirus du groupe A, il existe des kits commerciaux ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay). Cette technique, hautement sensible, ne nécessite pas un équipement spécialisé et permet le contrôle des réactions non spécifiques. D'autres techniques ont déjà été employées par certains laboratoires comme l'électrophorèse en gel de l'ARN et l'agglutination sur billes de latex. Des kits commerciaux existent pour ces techniques. La détection de l'ARN est possible par RT-PCR pour les 3 groupes sérologiques A, B et C. La meilleure technique est la PCR, plus sensible que les méthodes évoquées ci-dessus (Kapikian et Chanock, 1996).

Il faut signaler que ces virus se multiplient en culture cellulaire (Kapikian et Chanock, 1996).

Astrovirus

Ils font partie d'une nouvelle famille virale dont ils sont les seuls membres: les *Astroviridae*. Huit sérotypes humains (HAstV1 à 8) ont été identifiés, le premier est de loin le plus répandu en Europe. Ces virus ont été décrits pour la première fois en 1975 lors de l'observation en microscopie électronique de selles d'enfants souffrant de gastro-entérites (Madeley et Cosgrove, 1975).

Ce sont de petits virus de 28 nm de diamètre avec des motifs de surface en étoile à 5 ou 6 branches observables

sur environ 10% des particules virales, ce qui leur a valu leur nom.

Leur génome est composé d'ARN monocaténaire à polarité positive de 6,8 kb environ. Il contient trois ORFs nommés 1a, 1b et 2. Ils sont respectivement formés de 2760, 1560 et 2380 bases. Le génome est bordé aux extrémités 5' et en 3' de régions non codantes d'environ 80 bases de longueur. Les premiers (1a et 1b) coderaient pour des protéines non structurales tandis que 1b coderait pour la polymérase virale. Le deuxième code pour une protéine de 90 kDa qui est le précurseur de 3 à 5 protéines de capsid. Trois ou quatre protéines structurales ont été décrites pour les souches humaines. Dans les cultures cellulaires infectées par les astrovirus humains, il existe une protéine virale de 90 kDa ayant un rôle de précurseur, dont le clivage enzymatique conduit à la maturation des protéines de capsid. La trypsine est une protéase essentielle au clivage de ce précurseur.

Les cellules infectées contiennent des amas pseudo-cristallins observables en microscopie électronique. Ces amas sont localisés dans le cytoplasme qui est chargé de protéines virales comme le démontrent les observations en immunofluorescence de cultures de cellules infectées par des astrovirus animaux ou humains. Cela suggère donc que la multiplication des astrovirus soit intracytoplasmique (Traoré *et al.*, 1998^a).

Les infections à astrovirus ont une distribution mondiale. Ces virus occuperaient la troisième place après les rotavirus et les adénovirus entériques dans les causes de gastro-entérites virales, certaines études les ayant même classés en deuxième position.

Des pics saisonniers ont été observés durant les mois d'hiver dans les régions tempérées et durant la saison des pluies en climat tropical (Traoré *et al.*, 1998^a).

La transmission est féco-orale. Depuis la description initiale des astrovirus, effectuée à partir de cas pédiatriques de gastro-entérites nosocomiales, de nombreuses épidémies d'origine hospitalière ont été rapportées principalement chez l'enfant, plus rarement chez les sujets âgés (Traoré *et al.*,

1998^a). La population à risque est représentée par les enfants, les immunodéprimés et les personnes âgées.

L'incidence réelle des infections à astrovirus est difficile à évaluer car les symptômes de ces gastro-entérites sont généralement modérés et entraînent rarement une hospitalisation ou même une consultation médicale. Leur importance est de toute évidence sous-estimée. C'est une des principales causes de gastro-entérite chez les jeunes enfants à travers le monde. Son incubation dure deux à quatre jours et les symptômes, deux à trois jours. Il s'agit de diarrhée aqueuse légère accompagnée de vomissements, fièvre, douleurs abdominales et anorexie (Mastui et Greenberg, 1996).

L'acquisition d'anticorps anti-astrovirus est précoce dans l'enfance. Récemment, une étude a montré que 50% des enfants de cinq à douze mois avaient des anticorps anti-sérotype 1. Par contre, les anticorps spécifiques des sérotypes plus rares, tels les sérotypes 4 et 6, sont acquis beaucoup plus lentement et seuls 10 à 30% des adultes ont des anticorps anti-sérotype 6 (Traoré *et al.*, 1998^a).

Pour l'analyse du virus dans les selles, la microscopie électronique est une technique lourde, peu spécifique, peu sensible et qui conduit souvent à confondre les astrovirus avec d'autres petits virus ronds entériques. Néanmoins, l'immuno-microscopie électronique réalisée avec des sérum immuns provenant de patients s'est avérée utile pour l'analyse d'échantillons contenant des quantités faibles de particules virales et pour la mise en évidence de séroconversions. Un test ELISA a été mis au point pour la détection des antigènes viraux. Cette technique est plus sensible et plus souple à mettre en œuvre que la microscopie électronique. La technique ELISA est également utilisée pour la détermination des sérotypes. La RT-PCR est utilisée pour la détection des astrovirus humains (Traoré *et al.*, 1998^a).

Il n'existe pas de vaccination à l'heure actuelle.

Adénovirus entériques

Ces virus font partie de la famille des *Adenoviridae*. Chez l'homme, au moins

47 sérotypes ont été identifiés et répartis en 6 groupes distincts: A, B, C, D, E et F. Il existe deux types d'adénovirus entériques associés à de la diarrhée. Ce sont les types 40 et 41 (Shenk, 1996).

Ces deux virus sont des causes importantes de maladie gastro-intestinale aiguë chez les enfants hospitalisés. Des signes respiratoires semblent faire partie de leur manifestation clinique. Les adénovirus sont présents dans le monde entier chez l'homme et les animaux (Horwitz, 1996).

Beaucoup d'adénovirus sont capable de se multiplier efficacement dans l'intestin et d'être excrétés dans les matières fécales. On pensait dès lors qu'ils étaient des candidats importants comme responsables de diarrhée. Cependant, des études épidémiologiques ont montré qu'il n'y avait pas de corrélation entre la présence d'adénovirus dans les selles et la maladie. Les enfants éliminent des adénovirus dans leurs selles et développent une immunité sans manifester de signes cliniques. Ces infections subcliniques conduisent à une immunité qui couvre la vie.

Leur génome, composé d'ADN bica-ténaire linéaire de 30 à 37 kpb, est entouré par une capsid de 60 à 90 nm de diamètre de symétrie icosaédrique, composée de 252 capsomères. Ce virus est non enveloppé mais on notera la présence de glycoprotéines qui sont projetées à sommet de l'icosaèdre. Sa multiplication est intranucléaire.

Le génome viral code pour au moins 30 protéines et inclut à ses extrémités des séquences répétées inversées appelées ITR (Inverted Terminal Repeat) de 100 à 200 pb. Les gènes situés entre ses deux régions codent pour des protéines précoces et tardives. Situés entre ses deux régions, les gènes précoces codent pour des protéines non structurales (activité de régulation, enzymatique), alors que les gènes tardifs codent principalement pour des protéines structurales du virion (Gogev et Thiry, 1999; Shenk, 1996). Ce virus touche surtout les enfants de 6 à 24 mois. Plus de 90% des enfants de plus de 6 ans ont développé une immunité et il semble que celle-ci soit protectrice à long terme (Lebaron *et al.*, 1990). Il existe

un vaccin contre les adénovirus de type 4 et 7, utilisé dans l'armée américaine (Horwitz, 1996).

Parvovirus

Parmi les *Parvoviridae*, on distingue deux sous-familles qui sont les *Parvovirinae*, infectant les vertébrés, et les *Densovirinae* infectant les invertébrés. La sous-famille des *Parvovirinae* est elle-même composée de 3 genres, le genre Parvovirus infectant les animaux domestiques, le genre Erythrovirus infectant l'homme et les primates (incluant le parvovirus B19) et le genre Dependovirus nécessitant la présence d'un adénovirus (virus helper) (Astell, 1999). Le parvovirus humain B19 est impliqué dans la contamination alimentaire.

Ce virus non enveloppé possède une capsid de 20 à 26 nm de diamètre de symétrie icosaédrique composée de 60 capsomères. Son génome consiste en un ADN monocaténaire de 4,6 à 6 kb de polarité positive ou négative (dans des particules séparées) en proportions équivalentes. Il comprend 4 protéines de structure, la 1 et la 4 proviennent en fait de l'épissage alternatif du même ARN messager, la 3 est formée par le clivage de 15 à 20 aa de la 2. Il ne s'agit donc pas de 4 protéines différentes. Le génome est composé de deux larges ORFs, responsables de la synthèse des protéines structurales et non structurales, encadrés par des ITR aux extrémités de l'ADN qui permettent la formation d'épingles à cheveux aux extrémités (Astell, 1999).

Les parvovirus sont réputés pour leur spécificité d'espèce. Le parvovirus B19 est le seul parvovirus pathogène pour l'homme. Les cellules infectées sont en division active car il faut nécessairement des cellules en phase S ou G2 pour que le virus se multiplie. Pour le parvovirus B19, il s'agit des précurseurs de la lignée rouge. On ne connaît pas de lignée cellulaire apte à leur multiplication *in vitro*, même pas les cellules d'érythrocytose. Ils infectent la moelle osseuse chez l'adulte et le foie chez le fœtus (Astell, 1999).

Il est très stable et peut donc contaminer l'environnement. La transmission est aisée à d'autres individus indemnes et se fait par aérosol, par

voie féco-orale, vénérienne et transplacentaire. Ce virus est très contagieux et touche tous les âges, mais se retrouve surtout chez les enfants en âge scolaire et ne génère pas une immunité permanente. Beaucoup de parvovirus existent à l'état endémique. Les jeunes enfants sont protégés par les anticorps maternels.

Le parvovirus B19 est l'agent causal de l'érythème infectieux ou «cinquième maladie» qui est une maladie fébrile relativement bénigne; les signes cliniques sont souvent confondus avec la rubéole. D'autres signes cliniques peuvent se produire en fonction de sensibilité particulière des personnes atteintes et de la gravidité tels que des crises d'aplasie médullaire transitoire, de l'hydropisie fœtale et des malformations congénitales.

Plus de 80% des adultes sont séro-positifs. Les enfants sont exposés durant la période scolaire et, s'il n'y a pas séroconversion, une deuxième vague de séroconversion a lieu quand, devenus adultes, ils sont en contact avec des enfants en âge scolaire. Les anticorps d'isotype IgG spécifiques de ce virus apparaissent 2 semaines après infection et persistent pour la vie. Les individus ayant une immunité faible risquent de développer une infection persistante à parvovirus B19.

Il existe des immunoglobulines commerciales issues de donneurs normaux servant à guérir ou à améliorer l'état des infectés persistants par le parvovirus B19. Il n'existe pas de vaccin actuellement, mais des recherches sont en cours. L'immunogène serait une capsid recombinante plutôt que du virus atténué ou inactivé. Chez les animaux, il existe des vaccins contenant des virus atténués ou inactivés contre les parvovirus canin, félin et porcin (Young, 1996).

Le parvovirus B19 ne pouvant pas être multiplié en culture de cellules, on utilise des techniques d'hybridation de l'ADN pour sa détection et sa quantification dans le sang et dans les tissus. La PCR est la meilleure technique, parfois combinée avec l'hybridation *in situ*. Des tests sérologiques avec la mise en évidence des IgM par test RIA ou ELISA ont été mis au point (Young, 1996).

EPIDEMIOLOGIE DESCRIPTIVE DES MALADIES VIRALES LIEES A LA CONSOMMATION

Les données épidémiologiques belges relatives aux épidémies ou au cas sporadiques dus à ces virus sont incomplètes, car ils ne sont pas, pour la plupart, recherchés ou déclarés. Aux Etats-Unis, les CDC (Centers for Disease Control and prevention) ont publié un rapport concernant les maladies liées à la consommation alimentaire. Le tableau II montre des chiffres moyens rapportés à la population américaine de l'année 1997, calculés à partir des épidémies déclarées depuis 1983 à 1992 (pour certains pathogènes, il s'agit des données de 1996 ou

1997) concernant les maladies dues à des bactéries, des parasites et des virus. On peut ainsi voir l'importance que prennent les virus dans les affections d'origine alimentaire. Les virus de type Norwalk ont la part de responsabilité la plus grande par rapport aux bactéries, aux parasites et aux autres virus. Ils couvrent 66,6% de la totalité des infections d'origine alimentaire.

SOURCES ALIMENTAIRES

Les sources alimentaires de virus sont représentées à la figure 1. La contamination des aliments par manipulation est une voie importante qui intervient si les préparateurs n'ont pas

une hygiène suffisante lors de la fabrication des aliments. Les ustensiles, l'environnement, des vecteurs animés comme des insectes ou des rongeurs peuvent également intervenir dans ce schéma de contamination. Les problèmes surviennent surtout lorsque l'aliment n'est plus cuit après sa mise sur le marché. L'eau est un cas particulier dans cette figure, d'une part parce qu'elle peut intervenir dans la préparation ou le nettoyage d'un autre aliment, d'autre part, elle peut être une source de contamination directe. Ce cas particulier de contamination par le milieu hydrique est abordé à la figure 2. Les eaux souillées peuvent être des eaux de boisson ou de baignade; elles peuvent également contaminer les cultures maraîchères par arrosage, épandage ou aspersion. Un cas particulier est celui des mollusques bivalves (huîtres, moules, coques), qui concentrent les bactéries et les virus présents dans l'eau environnante, au niveau de leur système digestif. Cela est dû à leur mode d'alimentation par filtration. Un autre facteur augmentant le risque de transmission est le fait qu'ils soient souvent dégustés crus. La cuisson des coquillages pendant une minute à une température de 85 à 90 degrés Celsius est nécessaire à l'inactivation du virus de l'hépatite A et du poliovirus de type 1 (Murphy *et al.*, 1993). Pour les virus de type Norwalk, le calicivirus félin a été utilisé comme modèle et est inactivé par une cuisson d'une minute et demi à une température de 90 degrés Celsius (Slomka et Appleton, 1998). Plusieurs épidémies virales liées à la consommation d'huîtres ou de moules ont été décrites (Gunn *et al.*, 1982; Gill *et al.*, 1983; Anonyme, 1997; Delarocque-Astignau et Désenclos, 1998; Miossec *et al.*, 1998).

Des enquêtes épidémiologiques effectuées lors de certaines épidémies ont permis de retrouver les aliments impliqués ainsi que les virus à l'origine de celles-ci. Dans le tableau III, des exemples sont repris concernant les principaux acteurs de la problématique de la contamination virale des aliments, à savoir les SRSV de type Norwalk, le HAV et les rotavirus. On peut voir la nature très diversifiée des aliments à l'origine de ces épidémies. Des fruits de mer sont souvent impliqués dans ces problèmes.

Tableau II
Estimation du nombre de malades infectés par des micro-organismes transmissibles par les aliments aux Etats-Unis entre 1983 et 1992 (d'après Mead *et al.*, 1999)

Agents pathogènes	Malades	
	Total	origine alimentaire (pourcentage du total général)
Bactéries	5.204.934	4.175.565 (30,23 %)
Parasites	2.541.316	357.190 (2,59 %)
Virus	30.629.941	9.282.170 (67,19 %)
Type Norwalk	23.000.000	9.200.000 (66 %)
Rotavirus	3.900.000	39.000 (0,28 %)
Astrovirus	3.920.000	39.000 (0,28 %)
Hépatite A	83.391	4.170 (0,03 %)
Total général	38.629.641	13.814.924

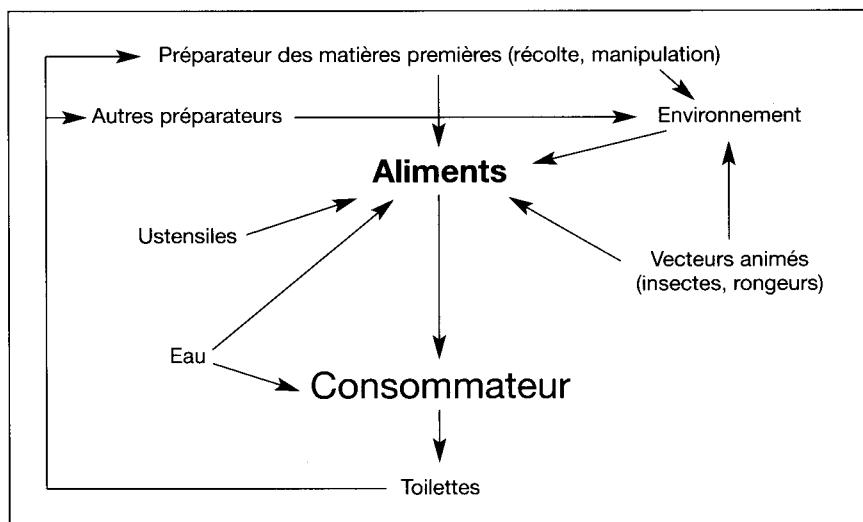


Figure 1

Sources de contamination virale des aliments.

La source majeure de contamination est la manipulation par les préparateurs faisant preuve d'un manque d'hygiène. Les autres sources sont représentées par les vecteurs animés, les ustensiles, l'environnement et l'eau dont on se sert pour certaines préparations ou pour le nettoyage de certains aliments. L'eau contaminée peut également infecter directement le consommateur.

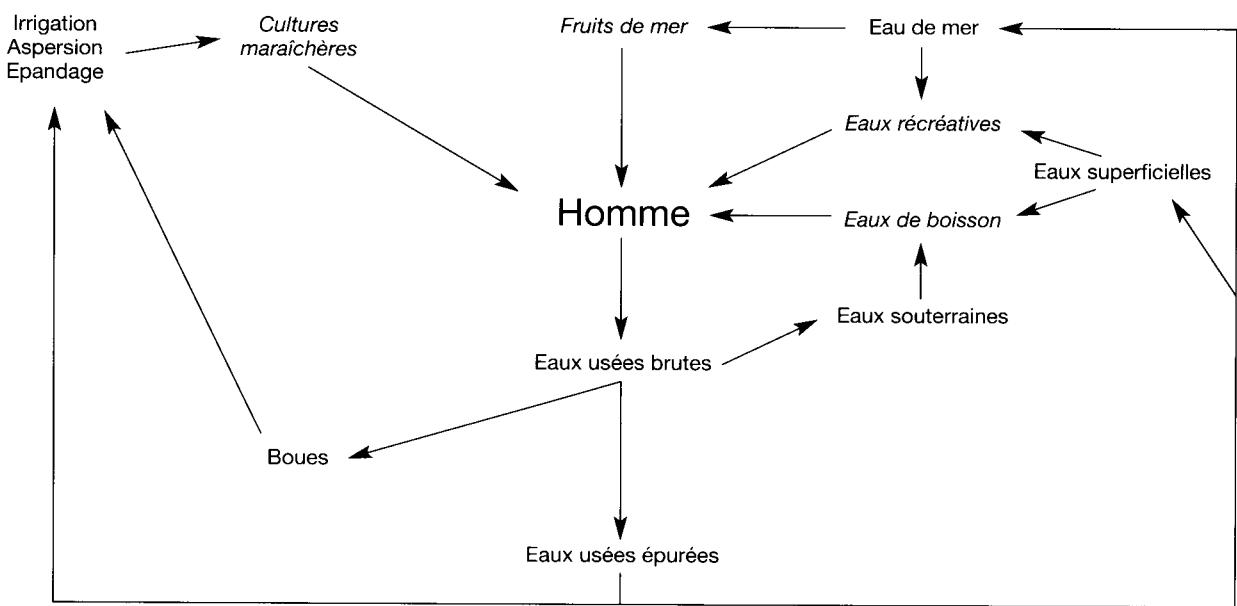


Figure 2

Cycle de contamination virale du milieu hydrique (d'après Gantzer *et al.*, 1998).

Cette figure illustre les multiples voies de contamination possibles au départ d'eau souillée par des matières fécales contenant des virus. Il peut y avoir transmission virale via les eaux récréatives, les eaux de boisson ou les cultures maraîchères. Les fruits de mer sont un cas particulier car ils concentrent les virus au niveau de leur tube digestif.

Tableau III

Exemples d'épidémies virales d'origine alimentaire pour les virus de type Norwalk, le virus de l'hépatite A et les rotavirus.

Virus	Nombre de personnes	Aliments impliqués	Lieu	Période	Source
Calicivirus SRSV type Norwalk	130 personnes	Eau	Pays de Galles	août 1994	Brugha <i>et al.</i> , 1999
	150 conférenciers	Huîtres	Congrès à Poitiers (France)	3 au 5 mars 1997	Miosec <i>et al.</i> , 1998
	217 passagers	Salade de fruits frais	Bateau de croisière (Hawaii)	17 au 24 mars 1990	Herwaldt <i>et al.</i> , 1994
	509 cas	Coulis de framboises	Finlande	avril 1998	Pönkä <i>et al.</i> , 1999
Virus de l'hépatite A	400 cas 150 cas 470 cas	Coquillages Moules crues Coquillages	Loire-Atlantique Hérault Morbihan (France)	décembre 1991 à mars 1992 mai 1995 à août 1995 décembre 1991 à mai 1992	Delarocque-Astagneau et Desenclos, 1998
	230 cas	Sandwiches préparés par un employé malade	Wisconsin (Etats-Unis)	1991	Skala <i>et al.</i> , 1993
	61 cas	Huîtres	Floride (Etats-Unis)	1988	Jones <i>et al.</i> , 1990
	205 cas	Huîtres	Midi-Pyrénées (France)	décembre 1996 à mai 1997	Anonyme, 1997
Rotavirus	20000 adultes	Eau	Anhui (Chine)	mai et juin 1983	Su <i>et al.</i> , 1986
	675 cas enfants et adultes	Repas servis dans 7 écoles	Fukui (Japon)	1989	Matsumoto <i>et al.</i> , 1989
	12000 adultes	Eau	Chine	2 épidémies fin 1982 et début 1983	Hung <i>et al.</i> , 1984

La Directive européenne 91/492/EEC prévoit la désignation de laboratoires nationaux de référence pour la qualité microbiologique des mollusques bivalves. Ces laboratoires doivent notamment gérer la problématique de la contamination virale de ces produits. Pour les autres aliments, aucune législation spécifique n'existe à ce jour.

DETECTION DES VIRUS

De multiples problèmes se posent pour la détection des virus dans l'eau ou les aliments. Tout d'abord, les virus ne se multiplient pas dans l'environnement, il faut donc des techniques qui permettent de les concentrer et ensuite de les purifier. En effet, pour la plupart d'entre eux, la dose infectante est faible, quelques particules virales, et donc la méthode de détection doit être très sensible. Par ailleurs, la plupart de ces virus, surtout les plus intéressants d'un point de vue épidémiologique (SRSV de type Norwalk et HAV), ne se multiplient pas, ou très difficilement, en culture de cellules. La génétique moléculaire offre le meilleur moyen de mettre en évidence la présence de ces particules virales. C'est la technique d'amplification génique (PCR) précédée d'une transcription inverse (RT-PCR), vu la composition en ARN de ces génomes viraux, qui semble la plus performante.

Dès à présent, il faut distinguer les méthodes de purification-concentration des virus contenus dans l'eau de celles partant des aliments, matrices beaucoup plus complexes. La figure 3 donne un aperçu des différentes étapes.

Purification-Concentration

Dans l'eau

Pour la purification et la concentration des virus contenus dans l'eau, il existe une norme (AFNOR XP T 90-451) concernant la recherche des entérovirus dans l'eau. Cinq à 1000 litres d'eau sont filtrés au travers d'un filtre en laine de verre. Les virus sont adsorbés et ensuite élués de ce composant par variation des conditions électro-chimiques (pH inférieur ou supérieur au point isoélectrique du virus) (Schwartzbrod, 1997). L'éluant utilisé est une solution protéique conte-

nant de l'extrait de bœuf et de la glycine. Les virus sont alors précipités par la technique de flocculation organique (Katzenelson *et al.*, 1976). Cette méthode convient pour l'analyse virale par culture cellulaire. Dans la littérature, on retrouve des étapes de purification-concentration qui lui sont proches mais ayant chacune leur spécificité.

La première étape est quasi toujours une filtration avec adsorption des particules virales sur filtres. Il existe trois types de filtration. Le premier utilise la poudre de verre chargée négativement, le second, la laine de verre, dont les charges sont mixtes, et le troisième consiste en des filtres vendus dans le commerce dont les charges sont soit négatives, soit positives. La connaissance de ces charges est importante puisque les virus possèdent une capsid protéique dont la charge, au pH environnemental, est négative. Pour cette raison, l'emploi de filtres chargés négativement requiert un abaissement du pH préalable à la filtration, ce qui n'est pas le cas pour les filtres composés de charges positives ou mixtes (Gantzer *et al.*, 1997). L'éluant le plus souvent utilisé est l'extrait de bœuf mélangé à de la glycine dont le pH se situe entre 9 et 9,5 (Hurst *et al.*, 1984). Les particules virales sont ensuite précipitées par l'ajout de polyéthylène glycol (PEG) (Lewis et Met-

calf, 1988). Le problème majeur de cette technique est que l'éluant ainsi que le PEG persistent dans le concentré viral et inhibent les enzymes nécessaires à la RT-PCR. Il en est de même pour les substances qui sont concentrées en même temps que les virus: protéines, carbohydrates, acide humique. Des étapes supplémentaires de purification doivent donc être ajoutées à ce schéma.

Pour enlever un maximum d'inhibiteur d'enzymes, divers composants sont utilisés: le fréon (trichlorotrifluoroéthane) (Atmar *et al.*, 1993; Lees *et al.*, 1994; 1995), le procipitate (Jaykus *et al.*, 1996; Dix *et al.*, 1998) ou le CTAB (cetyltriméthylammonium bromide) (Atmar *et al.*, 1995; Jaykus *et al.*, 1995; Le Guyader *et al.*, 1996; Schwab *et al.*, 1998).

Tsai et collaborateurs (1993), ont proposé l'utilisation de l'ultrafiltration pour concentrer les virus. Cette méthode évite l'emploi de l'éluant et du PEG et donc leur interférence avec la réaction.

Dans les mollusques bivalves

Les problèmes majeurs liés à la concentration et la purification virales à partir des aliments sont la très faible quantité de virus que l'on veut retrouver dans une masse relativement importante d'échantillon ainsi que l'interaction entre particules virales et aliments rendant l'extraction et la concentration virale complexes. Les aliments le plus souvent étudiés sont les mollusques bivalves tels les huîtres, les moules et les coques pour les raisons invoquées plus haut. C'est pour cette raison que la littérature leur fait presque exclusivement référence.

Les virus, comme les autres particules en suspension dans l'eau, sont concentrés par l'appareil de filtration des mollusques bivalves au niveau de leur hépato-pancréas et de leur tube intestinal (Romalde *et al.*, 1994). Une première approche pour faciliter la détection des virus consiste à disséquer le système digestif des mollusques et à analyser celui-ci uniquement.

La plupart des méthodes reposent sur des principes identiques de contrôle du pH et des conditions ioniques à travers plusieurs étapes d'adsorption-

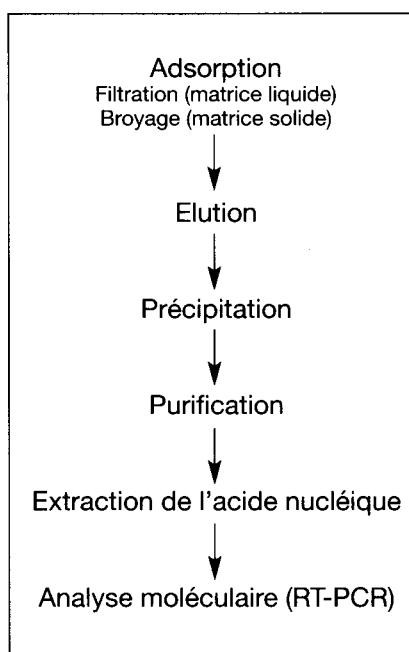


Figure 3
Principales étapes de l'analyse virale d'un échantillon.

élution-précipitation, ce qui conduit à un extrait compatible avec, d'une part, la mise en culture cellulaire, ou d'autre part, avec l'analyse par des techniques de biologie moléculaire (Traoré *et al.*, 1998b; Cliver *et al.*, 2000).

Trois grands schémas d'adsorption-élation se démarquent dans la littérature. Une des premières méthodes est celle décrite par Sobsey et collaborateurs (1978). Les virus sont adsorbés sur la fraction solide des broyats de coquillages pour en être ensuite élués. Ces deux étapes sont réalisées par variation du pH et des conditions de salinité (Jaykus *et al.*, 1995; 1996; Dix et Jaykus, 1998). Une autre approche est celle d'Atmar et collaborateurs (1993). Le principe reste identique mais ils améliorent l'étape de purification de l'échantillon (Atmar *et al.*, 1995; 1996; Le Guyader *et al.*, 1996; Schwab *et al.*, 1998). Le troisième protocole, inspiré de la méthode développée par Lewis et Metcalf en 1988, propose l'utilisation d'un tampon d'élation différent (Lees *et al.*, 1994; 1995).

Le surnageant contenant le virus, récupéré après chacun de ses traitements est alors traité par flocculation organique (Katzenelson *et al.*, 1976), précipitation au PEG (Lewis et Metcalf, 1988), ou ultra filtration (Tsai *et al.*, 1993) pour obtenir un échantillon final d'un volume aussi petit que possible pour être compatible avec les techniques d'identification moléculaire.

Pour les entérovirus, il est possible de les détecter par la méthode des plages de lyse en culture de cellules. Il faut pour cela éliminer toute contamination bactérienne par l'utilisation d'antibiotiques, de chloroforme ou passage à travers un filtre de 0,2 µm de porosité (Schwartzbrod, 1997).

La technique qui fait l'unanimité pour mettre en évidence les virus présents dans l'alimentation est la RT-PCR. Pour cela, il faut une étape supplémentaire d'extraction du génome viral, tout en diminuant, par la même occasion, le volume de l'échantillon.

Extraction de l'acide nucléique viral

La technique classique de digestion par la protéinase K, double extraction

au phénol chloroforme puis précipitation à l'éthanol est souvent employée (Jothikumar *et al.*, 1993; Atmar *et al.*, 1993; 1995; 1996; Le Guyader *et al.*, 1996; Abbaszadegan *et al.*, 1999). D'autres méthodes reposent sur l'extraction sur poudre de verre (Chomczynski et Sacchi, 1987; Lees *et al.*, 1994; 1995). Il est possible d'utiliser des kits commerciaux qui sont basés sur ces différentes méthodes.

Analyse moléculaire

L'ARN extrait est analysé par RT-PCR. Très brièvement, dans un premier temps, la transcription inverse aboutit au brin d'ADN complémentaire de l'ARN viral présent. L'étape suivante consiste en la synthèse de brins d'ADN complémentaires et de dénaturation successives. Cela permet l'amplification de manière considérable des quantités d'acide nucléique présent. La technique doit être validée quant à sa sensibilité et sa spécificité. L'idéal serait de mettre au point une PCR multiplex qui détecterait tous les virus, précédemment cités, dans la même réaction. Plusieurs tentatives vont dans ce sens (Tsai *et al.*, 1994; Rosenfield *et al.*, 1999).

INDICATEURS DE CONTAMINATION VIRALE

Vu la complexité de ces techniques, des études ont été menées afin d'essayer de trouver un indicateur de contamination fécale humaine en corrélation avec la présence potentielle de ces virus. D'après Gantzer et collaborateurs (1998b), pour les eaux, un indicateur idéal doit posséder les caractéristiques suivantes:

- toujours être présent lorsque les agents pathogènes recherchés sont présents;
- d'un ratio constant et plus abondant que les agents pathogènes;
- présenter la même écologie que les agents pathogènes;
- être analogue aux agents pathogènes quant à la survie dans les eaux et sa résistance aux traitements d'épuration et de désinfection;
- ne pas se multiplier dans l'environnement;
- ne pas être pathogène;
- être facilement détectable et quantifiable à faible coût.

Toujours d'après ces mêmes auteurs, trois solutions peuvent être envisagées pour prendre en compte le paramètre virologique lors des contrôles sanitaires des eaux:

- considérer les indicateurs bactériens de contamination fécale comme de bons indicateurs de contamination virale;
- mettre en évidence des indicateurs de contamination virale plus spécifiques;
- détecter directement les virus pathogènes infectieux.

A l'heure actuelle, le contrôle de la qualité microbiologique des eaux et des aliments est effectué par la recherche de bactéries dont certaines sont considérées comme des indicateurs de contamination fécale. On considère que ces bactéries pourraient refléter également une contamination virale puisque ces deux agents ont la même origine.

Cependant, la résistance des bactéries aux conditions extérieures, aux divers processus d'épuration et de désinfection ne reflète pas celle des virus entériques. De plus, certaines de ces bactéries se multiplient dans le milieu extérieur ou ont une origine qui n'est pas humaine. Par exemple, les coliformes totaux sont de piètres témoins de la contamination fécale tandis que les coliformes thermotolérants sont de meilleurs indicateurs. Cependant leur origine n'est pas exclusivement fécale. *Escherichia coli*, quant à lui, est recommandé par l'OMS comme indicateur de contamination fécale. Il s'est révélé un mauvais indicateur de la dépurlation virale des moules par comparaison avec l'élimination des poliovirus (Power et Collins, 1989) et de la dépurlation des coquillages ainsi que de leur qualité sanitaire (de Mesquita *et al.*, 1991). Les streptocoques fécaux, surtout le genre *enterococcus*, sont également utilisés. Ils ne se multiplient pas dans l'environnement et possèdent une meilleure résistance aux conditions défavorables. Il s'ensuit que, parmi ces bactéries, *E. coli* et les entérocoques sont les meilleurs indicateurs de la contamination fécale bactérienne mais pas virale.

La détection de certains bactériophages pourrait être plus performante que celle de bactéries indicatrices de

contamination fécale. Cette proposition est basée sur le postulat que la résistance d'un bactériophage serait plus proche de celle d'un virus entérique que ne le sont ces bactéries.

Trois bactériophages différents ont été considérés. Il s'agit des coliphages somatiques, des bactériophages à ARN F-spécifiques et des phages de *Bacteroides fragilis*.

Les coliphages satisfont à une partie des critères pour être un indicateur de contamination virale (Stetler, 1984), mais ils ne sont pas spécifiques des selles humaines et peuvent se multiplier si des *E. coli* sont présents dans le milieu extérieur. De plus, leur résistance par rapport à certains traitements est plus faible que celle des virus entériques.

Pour ce qui est des phages à ARN F-spécifiques, ils ont peu de chance de se multiplier dans l'environnement, car ils nécessitent la présence de pili qui sont absents à une température inférieure à 30°. Ils se multiplient dans le tube intestinal des hommes et des animaux à sang chaud.

Enfin, *Bacteroides fragilis* est une bactérie anaérobie stricte très peu résistante dans l'environnement et son phage ne peut donc pas s'y multiplier. Cette bactérie est un hôte normal de l'intestin des hommes et des animaux à sang chaud. Le phage de la souche HSP40 est spécifique des souches bactériennes humaines, ce qui est un bon critère pour l'indicateur recherché.

Le phage de *Bacteroides fragilis* a le meilleur potentiel pour être un indicateur de la contamination virale dans les moules (Lucena *et al.*, 1994), dans le traitement des eaux de boisson (Jofre *et al.*, 1995), ou l'évaluation des eaux usées traitées (Gantzer *et al.*, 1998^a). Une autre solution est de détecter un virus entérique qui serait un indice de contamination fécale virale. Les entérovirus ont été le plus souvent proposés pour jouer ce rôle. Une étude a été menée par Pina et collaborateurs (1998) concernant

cette application pour les adénovirus. Elle montre que ces derniers possèdent des qualités supérieures à celles des entérovirus. Le nombre d'échantillons positifs est supérieur et leur origine est plus fréquemment humaine que celle des entérovirus.

Il n'y a donc pas à l'heure actuelle de bon indicateur de contamination virale. La méthode plus fiable est la mise en évidence des virus pathogènes eux-mêmes.

CONCLUSION

La contamination virale des aliments et de l'eau représente pour les consommateurs un risque potentiel important qui, à l'heure actuelle, n'est pratiquement pas mesuré dans notre pays. Cependant, les données épidémiologiques montrent clairement que ce risque existe et que certaines maladies peuvent avoir des conséquences graves pour la santé même si, dans la plupart des cas, il s'agit de gastro-entérites et que la guérison apparaît en quelques jours.

Les deux principales sources alimentaires connues sont l'eau et les mollusques bivalves, mais il est évident que de nombreux autres aliments sont directement contaminés par des personnes infectées.

Pour assurer la qualité et une sécurité supérieures des aliments aux consommateurs, il est souhaitable de pouvoir s'assurer en routine de l'absence de ces virus entériques dans notre alimentation. Du chemin reste à parcourir dans la mise au point de techniques simples et automatisées compatibles avec une analyse de routine, mais il est nécessaire pour cela de continuer les efforts de recherche effectués dans ce sens.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un projet «Wallonie-Développement-Université», intitulé Sécurité et qualité microbiologique des aliments

(SECALIM), subventionné par le Ministère de la Région Wallonne, Direction Générale des Technologies, de la Recherche et de l'Energie.

Nous remercions Jean Content (Institut Pasteur, Bruxelles) pour les informations fournies.

SUMMARY

Contamination of food and water by human pathogenic viruses

Food and water contamination by human viruses is a great health problem. These viruses are shed in stools. Norwalk-like viruses, hepatitis E virus, poliovirus, echovirus, hepatitis A virus, rotavirus, astrovirus, enteric adenovirus and parvovirus B19 have been described. The most important ones are Norwalk-like viruses, rotavirus and hepatitis A virus as reported in epidemiological surveys. The most frequently implicated foods are shellfish (bivalve mollusks) harvested from waters contaminated with human sewage, as well as water itself. The other source of infection is the handling of food in poor hygienic conditions. In this case contaminated foods are vegetables, sandwiches, fruits, pastries that are soiled.

The detection of viruses in foods is difficult for several reasons: Virus-food interactions make difficult the concentration and the purification of viruses, several virus species are difficult or unable to grow in cell culture, furthermore viruses are present in the sample in very low amounts.

Molecular techniques are therefore the methods of choice for detecting these viruses, especially the polymerase chain reaction which is often described. Another possibility consists in a fecal viral indicator. Bacteriophages seem to be the most promising in this respect.

BIBLIOGRAPHIE

- ABBASZADEGAN M., STEWART P., LECHEVALLIER M. A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**, 444-449.
- ANONYME Summary of notifiable diseases, United States, 1995. *Mor. Mortal. Wkly Rep. CDC Surveill. Summ.*, 1996, **44**, 1-87.
- ANONYME Epidémie d'hépatites aiguës virales A Midi-Pyrénées – 1997. *Rapport d'investigation, Institut de Veille Sanitaire*, 1997, URL: <http://www.invs.sante.fr/publications/hepatiteA/rapport.html>. Consulté le 24 novembre 1999.
- ANONYME Poliomyelitis prevention: revised recommendations for use of inactivated and live oral poliovirus vaccines. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases. *Pediatrics*, 1999, **103**, 171-172.
- ASTELL C.R. Parvoviruses. In: Granoff A., Webster R.G. (Eds.), *Encyclopedia of Virology*, second edition. Academic Press: San Diego, 1999, 1151-1159.
- ATMAR R.L., METCALF T.G., NEILL F.H., ESTES M.K. Detection of enteric viruses in oysters by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**, 631-635.
- 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 R.L., NEILL F.H., WOODLEY C.M., MANGER R., FOUT G.S., BURKHARDT W., LEJA L., MCGOVERN E.R., LE GUYADER F., METCALF T.G., ESTES M.K. Collaborative evaluation of a method for the detection of Norwalk virus in shellfish tissues by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, **62**, 254-258.
- BEARD M.R., LEMON S.M. Hepatitis A virus. In: Granoff A., Webster R.G. (Eds.), *Encyclopedia of Virology*, second edition. Academic Press: San Diego, 1999, 631-639.
- BRUGHA R., VIPOND I.B., EVANS M.R., SANDIFER Q.D., ROBERTS R.J., SALMON R.L., CAUL E.O., MUKERJEE A.K. A community outbreak of food-borne small round-structured virus gastroenteritis caused by a contaminated water supply. *Epidemiol. Infect.*, 1999, **122**, 145-154.
- CHOMCZYNSKI P., SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 1987, **162**, 156-159.
- CLIVER D.O., CROMEANS T.L., SOBSEY M.D. Viruses. In: Robinson R.K., Batt C.A., Patel P.D. (Eds.), *Encyclopedia of food microbiology*. Academic Press: San Diego, 2000, 2264-2279.
- COHEN J. Structure et réplication des rotavirus. In: Dodet B., Rajnachapel-Messai J., Therre H., Antoine H.M., Saliou P. *Les Rotavirus – Comptes rendus de la réunion sur les rotavirus en Médecine Humaine et Vétérinaire*. Imprimerie Bosc France: Oullins, 1996, 15-22.
- DE MESQUITA M.M.F., EVISON L.M., WEST P.A. Removal of faecal indicator bacteria and bacteriophages from the common mussel (*Mytilus edulis*) under artificial depuration conditions. *J. Appl. Bacteriol.*, 1991, **70**, 495-501.
- DELAROCQUE-ASTIGNEAU E., DESENCLOS J.C. Epidémies d'hépatite A et coquillages: bilan de l'investigation de quatre épidémies récentes. In: POMMEPUY M., *Epidémie, virologie et coquillages*. Société Française de Microbiologie: Paris, 1998, 12.
- DIX A.B., JAYKUS L.A. Virion concentration method for the detection of human enteric viruses in extracts of hard-shelled clams. *J. Food Prot.*, 1998, **61**, 458-465.
- DUCOFFRE G. Surveillance des maladies infectieuses par un réseau de laboratoires de microbiologie, tendances épidémiologiques 1983-1997. Institut scientifique de la santé publique – Louis Pasteur, Bruxelles, 1999.
- ESTES M.K., COHEN J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.*, 1989, **53**, 410-449.
- ESTES M.K., LEPARC-GOFFART I. Norwalk and related viruses. In: Granoff A., Webster R.G. (Eds.), *Encyclopedia of Virology*, second edition. Academic Press: San Diego, 1999, 1035-1041.
- GANTZER C., SENOUCI S., MAUL A., LEVI Y., SCHWARTZBROD L. Enterovirus genomes in wastewater: concentration on glass wool and glass powder and detection by RT-PCR. *J. Virol. Methods*, 1997, **65**, 265-271.
- GANTZER C., MAUL A., AUDIC J.M., SCHWARTZBROD L. Detection of infectious enteroviruses, enterovirus genomes, somatic coliphages, and Bacterioides fragilis phages in treated wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, **64**, 4307-4312.
- GANTZER C., LUCENA F., SCHWARTZBROD L., JOFRE J. Indicateurs de contamination virale du milieu hydrique: mythe ou réalité ? *Virologie*, 1998, **2**, 117-126.
- GILL O.N., CUBITT W.D., MCSWIGGAN D.A., WATNEY B.M., BARTLETT C.L. Epidemic of gastroenteritis caused by oysters contaminated with small round structured viruses. *Br. Med. J.*, 1983, **287**, 1532-1534.
- GLASS R.I. Épidémiologie des infections à rotavirus. In: Dodet B., Rajnachapel-Messai J., Therre H., Antoine H.M., Saliou P. *Les Rotavirus – Comptes rendus de la réunion sur les rotavirus en Médecine Humaine et Vétérinaire*. Imprimerie Bosc France: Oullins, 1996, 11-14.
- GOGEV S., THIRY E. Les adénovirus recombinants comme vecteurs vaccinaux. *Ann. Méd. Vét.*, 1999, **143**, 323-334.
- GUNN R.A., JANOWSKI H.T., LIEB S., PRATHER E.C., GREENBERG H.B. Norwalk virus gastroenteritis following raw oyster consumption. *Am. J. Epidemiol.*, 1982, **115**, 348-351.
- HERWALDT B.L., LEW J.F., MOE C.L., LEWIS D.C., HUMPHREY C.D., MONROE S.S., PON E.W., GLASS R.I. Characterization of a variant strain of Norwalk virus from a food-borne outbreak of gastroenteritis on a cruise ship in Hawaii. *J. Clin. Microbiol.*, 1994, **32**, 861-866.
- HOLLINGER F.B., TICEHURST J.R. Hepatitis A Virus. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.), *Fields Virology*, third edition. Lippincott Raven Press: Philadelphia, 1996, 735-782.
- HORWITZ M.S., Adenoviruses. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.), *Fields Virology*, third edition. Lippincott Raven Press: Philadelphia, 1996, 2149-2171.
- HUNG T., CHEN G.M., WANG C.G., YAO H.L., FANG Z.Y., CHAO T.X., CHOU Z.Y., YE W., CHANG X.J., DEN S.S., LIONG X., CHANG W. Waterborne outbreak of rotavirus diarrhoea in adults in China caused by a novel rotavirus. *Lancet*, 1984, **1**, 1139-1142.
- HURST C.J., DAHLING D.R., SAFFERMAN R.S., GOYKE T. Comparison of commercial beef extracts and similar materials for recovering viruses from environmental samples. *Can. J. Microbiol.*, 1984, **30**, 1253-1263.
- JAYKUS L.A., DE LEON R., SOBSEY M.D. Development of a molecular method for the detection of enteric viruses in oysters. *J. Food Prot.*, 1995, **58**, 1357-1362.
- JAYKUS L.A., DE LEON R., SOBSEY M.D. A virion concentration method for detection of human enteric viruses in oysters by PCR and oligoprobe hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**, 2074-2080.
- JIANG X., WANG M., WANG K., ESTES M.K. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology*, 1993, **195**, 51-61.
- JOFRE J., OLLE E., RIBAS F., VIDAL A., LUCENA F. Potential usefulness of bacteriophages that infect *Bacteroides fragilis* as model organisms for monitoring virus removal in drinking water treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, **61**, 3227-3231.
- JONES M.E., JENKERSON S.A., MIDDAUGH J.P., BENTON J., SYLVESTER P., KLONTZ K.C., WILDER M.H., CALDER R.A., WOERNLE C.H., SIKES R.K., VEUTHY E., WYRICK S.W., WEANT B.D., TYSINGER E., MAC CORMACK, HOGAN J.F., CUMMINGS S., HARRIS N., NOLAN C.M., KOBAYASHI J.M., FLEMING D., FOSTER L.R. Foodborne Hepatitis A — Alaska, Florida, North Carolina, Washington. *Mor. Mortal. Wkly. Rep. CDC Surveill. Summ.*, 1990, **39**, 228-232.

- JOTHIKUMAR N., APARNA K., KAMATCHIAMMAL S., PAULMURUGAN R., SARAVANADEVI S., KHANNA P. Detection of hepatitis E virus in raw and treated wastewater with the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**, 2558-2562.
- APIKIAN A.Z., ESTES M.K., CHANOCK R.M. Norwalk Group of Viruses. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.), *Fields Virology*, third edition. Lippincott Raven Press: Philadelphia, 1996, 783-810.
- APIKIAN A.Z., CHANOCK R.M. Rotaviruses. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.), *Fields Virology*, third edition. Lippincott Raven Press: Philadelphia, 1996, 1657-1708.
- KATZENELSON E., FATTAL B., HOSTOVESKY T. Organic flocculation: an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1976, **32**, 638-639.
- KOPECKA H. Echovirus. In: Granoff A., Webster R.G. (Eds.), *Encyclopedia of Virology*, second edition. Academic Press: San Diego, 1999, 411-417.
- LAMBDEN P.R., CAUL E.O., ASHLEY C.R., CLARKE I.N. Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science*, 1993, **259**, 516-519.
- LEBARON C.W., FUTURAN N.P., LEW J.F., ALLEN J.R., GOUVEA V., MOE C., MONROE S.S. Viral agents of gastroenteritis public health importance and outbreak management. *Mor. Mortal. Wkly Rep. CDC Surveill. Summ.*, 1990, **39**, 1-24.
- LE GUYADER F., NEILL F.H., ESTES M.K., MONROE S.S., ANDO T., ATMAR R.L. Detection and analysis of a small round-structured virus strain in oysters implicated in an outbreak of acute gastroenteritis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**, 4268-4272.
- LEES D.N., HENSHILWOOD K., DORE W.J. Development of a method for detection of enteroviruses in shellfish by PCR with poliovirus as a model. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **60**, 2999-3005.
- LEES D.N., HENSHILWOOD K., GREEN J., GALLIMORE C.I., BROWN D.W. Detection of small round structured viruses in shellfish by reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, **61**, 4418-4424.
- LEVY J. Vaccination of children in 1999. *Rev. Med. Brux.*, 1999, **20**, A317-A320.
- LEWIS G.D., METCALF T.G. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, **54**, 1983-1988.
- LUCENA F., LASOBRAS J., MCINTOSH D., FORCADELL M., JOFRE J. Effect of distance from the polluting focus on relative concentrations of *Bacteroides fragilis* phages and coliphages in mussels. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **60**, 2272-2277.
- MADELEY C.R., COSGROVE B.P. 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet*, 1975, **2**, 451-452.
- MAED P.S., SLUTSKER L., DIETZ V., MCCAIG L.F., BRESEE J.S., SHAPIRO C., GRIFFIN P.M., TAUXE R.V. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 1999, **5**, URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol5no5/mead.htm>
- MASTUI S.M., GREENBERG H.B. Astroviruses. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.), *Fields Virology*, third edition. Lippincott - Raven Press: Philadelphia, 1996, 811-822.
- MATSUMOTO K., HATANO M., KOBAYASHI K., HASEGAWA A., YAMAZAKI S., NAKATA S., CHIBA S., KIMURA Y. An outbreak of gastroenteritis associated with acute rotaviral infection in schoolchildren. *J. Infect. Dis.*, 1989, **160**, 611-615.
- MELNICK J.L. Enteroviruses: Polioviruses, Coxackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.), *Fields Virology*, third edition. Lippincott Raven Press: Philadelphia, 1996, 655-712.
- MINOR P.D. Polioviruses. In: Granoff A., Webster R.G. (Eds.), *Encyclopedia of Virology*, second edition. Academic Press: San Diego, 1999, 1326-1330.
- MIOSSEC L., LE GUYADER F., HAEGHEBAERT S., GASNIER P., BELLIER J.-Y., VAILLANT V., CAMUS P., POMMEPUY M., ABOU-SALEH M.-J., CLAVELIN P., BO BO J.-P., MASSON D., DESCENCLOS J.-C. Contamination virale de coquillages responsables d'une épidémie de gastro-entérites à Poitiers, mars 1997. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, 1998, **30**, 1-10.
- MURPHY P., NOWAK T., LEMON S.M., HILFENHAUS J. Inactivation of hepatitis A virus by heat treatment in aqueous solution. *J. Med. Virol.*, 1993, **41**, 61-64.
- NICAND E., TEYSSOU R., BUISSON Y. Le risque fécal viral en 1998. *Virologie*, 1998, **2**, 103-116.
- 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.
- PÖNKÄ A., MAUNULA L., VON BONSDORFF C.H., LYTTIKÄINEN O. Epidémie d'infections à calicivirus associée à la consommation de framboises congelées. *Eurosurveillance*, 1999, **4**, 66-69.
- POWER U.F., COLLINS J.K. Differential depuration of poliovirus, *Escherichia coli*, and a coliphage by the common mussel, *Mytilus edulis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, **55**, 1386-1390.
- PURCELL R.H. Hepatitis E Virus. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.), *Fields Virology*, third edition. Lippincott Raven Press: Philadelphia, 1996, 2831-2841.
- ROMALDE J.L., ESTES M.K., SZUCS G., ATMAR R.L., WOODLEY C.M., METCALF T.G. In situ detection of hepatitis A virus in cell cultures and shellfish tissues. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **60**, 1921-1926.
- ROSENFIELD S.I., JAYKUS L.A. A multiplex reverse transcription polymerase chain reaction method for the detection of foodborne viruses. *J. Food Prot.*, 1999, **62**, 1210-1214.
- SCHWAB K.J., NEILL F.H., ESTES M.K., METCALF T.G., ATMAR R.L. Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. *J. Food Prot.*, 1998, **61**, 1674-1680.
- SCHWARTZBROD L. Recherche des virus entériques. In: Larpent, J.P. (ed), *Microbiologie alimentaire: Techniques de laboratoire*. Lavoisier Technique et Documentation: Paris, 1997, 490-511.
- SHAW R., GREENBERG H. Rotaviruses. In: Granoff A., Webster R.G. (Eds.), *Encyclopedia of Virology*, second edition. Academic Press: San Diego, 1999, 1576-1592.
- SHENK T. Adenoviridae: The Viruses and their Replication. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.), *Fields Virology*, third edition. Lippincott Raven Press: Philadelphia, 1996, 2111-2148.
- SKALA M., COLLIER C., HINKLE C.J., DONNELL H.D., SCHLENKER T., FESSLER M.D., HOTELING M., HOPFENSPERGER D., SCHLOSS M., MIDDAUGH J.P. Foodborne Hepatitis A — Missouri, Wisconsin, and Alaska, 1990-1992. *Mor. Mortal. Wkly Rep. CDC Surveill. Summ.*, 1993, **42**, 526-529.
- SLOMKA M.J., APPLETON H. Feline calicivirus as a model system for heat inactivation studies of small round structured viruses in shellfish. *Epidemiol. Infect.*, 1998, **121**, 401-407.
- SMITH J., AYLWARD R.B., SALISBURY D., WASSILAK S., OBLAPENKO G. Certifying the elimination of poliomyelitis from Europe: advancing towards global eradication. *Eur. J. Epidemiol.*, 1998, **14**, 769-773.
- SOBSEY M.D., CARRICK R.J., JENSEN H.R. Improved methods for detecting enteric viruses in oysters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1978, **36**, 121-128.
- STETLER R.E. Coliphages as indicators of enteroviruses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1984, **48**, 668-670.
- STOLLE A., SPERNER B. Viral infections transmitted by food of animal origin: the present situation in the European Union. *Arch. Virol. Suppl.*, 1997, **13**, 219-228.

- SU C.Q., WU Y.L., SHEN H.K., WANG D.B., CHEN Y.H., WU D.M., HE L.N., YANG Z.L. An outbreak of epidemic diarrhoea in adults caused by a new rotavirus in Anhui Province of China in the summer of 1983. *J. Med. Virol.*, 1986, **19**, 167-173.
- TAM A.W., YARBOUGH P.O., BRADLEY D.W. Hepatitis E virus. In: Granoff A., Webster R.G. (Eds.), *Encyclopedia of Virology*, second edition. Academic Press: San Diego, 1999, 669-676.
- TRAORE O., BELLION G., MONROE S., LAVERAN H. Les astrovirus humains. *Virologie*, 1998a, **2**, 33-40.
- 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.*, 1998b, **64**, 3118-3122.
- TSAI Y.L., SOBSEY M.D., SANGERMANO L.R., PALMER C.J. Simple method of concentrating enteroviruses and hepatitis A virus from sewage and ocean water for rapid detection by reverse transcriptase- polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**, 3488-3491.
- TSAI Y.L., TRAN B., SANGERMANO L.R., PALMER C.J. Detection of poliovirus, hepatitis A virus, and rotavirus from sewage and ocean water by triplex reverse transcriptase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **60**, 2400-2407.
- YOUNG N.S. Parvoviruses. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley PM (Eds.), *Fields Virology*, third edition. Lippincott Raven Press: Philadelphia, 1996, 2199-2220.