



HAL
open science

Virus transmis par voie alimentaire

Sandra Martin-Latil

► **To cite this version:**

Sandra Martin-Latil. Virus transmis par voie alimentaire. Master. AgroParisTech (Palaiseau) (M2 MGB, UE MQSA), France. 2023. hal-04571220

HAL Id: hal-04571220

<https://hal.science/hal-04571220>

Submitted on 7 May 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



VIRUS transmis par la voie alimentaire

Sandra Martin-Latil, PhD

Laboratoire de Sécurité des Aliments
Unité des Virus Entériques
14 rue Pierre et Marie Curie, 94706 Maisons-Alfort

Email: sandra.martin-latil@anses.fr

Laboratoire de Sécurité des aliments

Unité des Virus Entériques

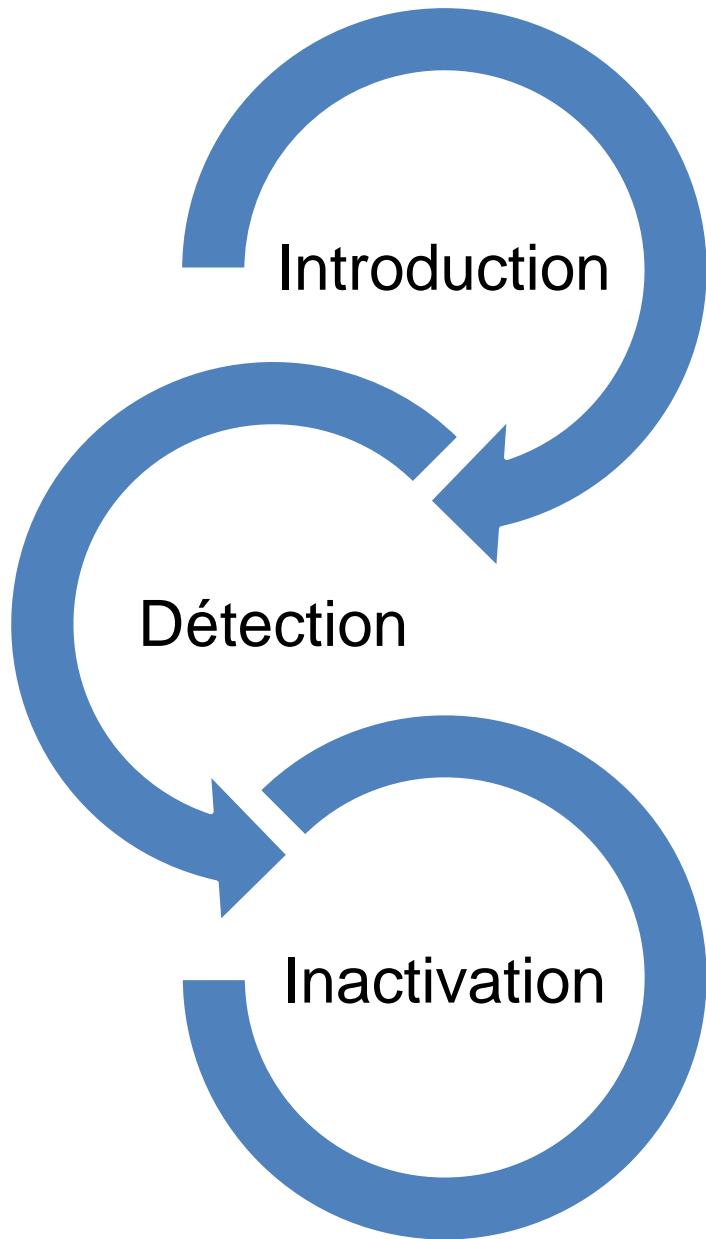
Chef d'unité: Sylvie Perelle

Recherche

- **Axe 1:** Optimisation des méthodes de détection des virus entériques dans l'eau et les aliments
- **Axe 2:** Etude du cycle viral et risque infectieux

Référence

- **Laboratoire National de Référence**
Détection des virus dans les denrées alimentaires d'origine animale hors coquillages
Recherche des virus suspectés être à l'origine de Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC)
- **Normalisation des méthodes de détection des virus dans l'eau et les aliments**



Introduction

Détection

Inactivation

- Données épidémiologiques
- Couples « Virus – Matrice »
- Problématique de la virologie alimentaire

- Principaux virus d'intérêt
- Méthodes de détection : VHA et norovirus (ISO 15216)
- Applications & évaluation du risque
- Evolution des méthodes
- Risques émergents : virus de l'hépatite E

- Etude d'inactivation: outils à disposition
- Méthodes alternatives pour la détection des virus infectieux
- Inactivation virale : efficacité fonction du virus et de la matrice

Virus transmis par la voie alimentaire



VIRUS ENTERIQUES

✓ Selon les premiers critères de classification :

« **Tropisme et transmission** »

« Les **virus entériques** se reproduisent dans le **tractus gastro-intestinal ou dans le foie** et sont excrétés dans les fèces et/ou les vomissements des personnes. Ces virus se propagent surtout par **voie fécale-orale** et sont infectieux chez l'homme. »

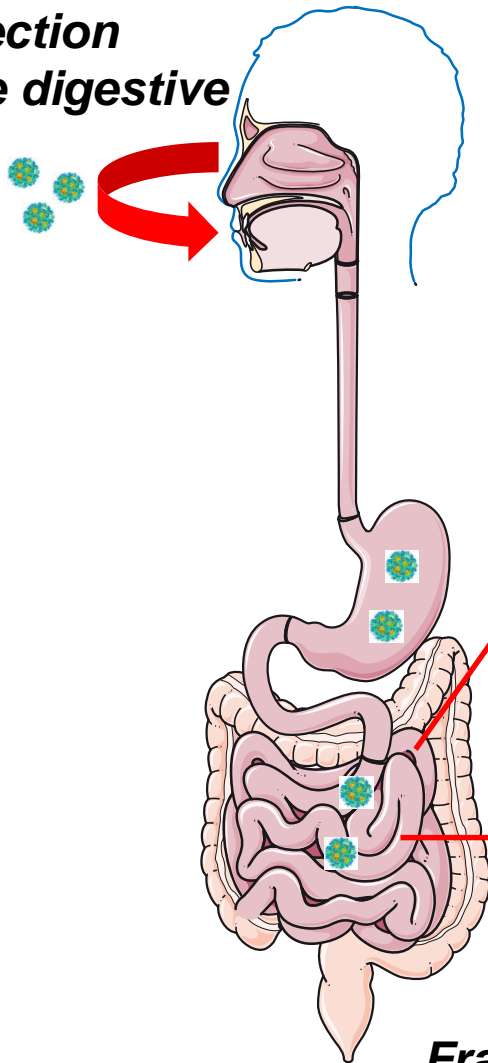
Virus entériques appartiennent à diverses familles

Class (Baltimore)	Génome	Présence d'enveloppe	Famille
I	ADNdb	Oui	<i>Poxviridae</i> <i>Herpesviridae</i>
		Non	<i>Adenoviridae</i> <i>Papillomaviridae</i> <i>Polyomaviridae</i>
II	ADNsb	Non	<i>Parvoviridae</i> <i>Circoviridae</i>
III	ARNdb	Non	<i>Reoviridae</i> <i>Birnaviridae</i>
IV	ARNss (+)	Oui	<i>Flaviviridae</i> <i>Togaviridae</i> <i>Coronaviridae</i>
		Non	<i>Picornaviridae</i> <i>Caliciviridae</i> <i>Astroviridae</i> <i>Hepeviridae</i>
V	ARNss (-)	Oui	<i>Paramyxoviridae</i> <i>Rhabdoviridae</i> <i>Filoviridae</i> <i>Bornaviridae</i> <i>Orthomyxoviridae</i> <i>Arenaviridae</i> <i>Bunyaviridae</i>
VI	ARNss (RTase)	Oui	<i>Retroviridae</i>
VII	ADNdb (RTase)	Oui	<i>Hepadnaviridae</i>

**Essentiellement
Virus nus**

Virus entériques et pathologies diverses

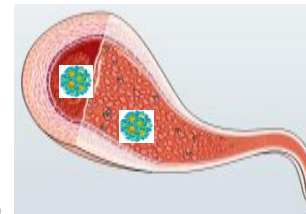
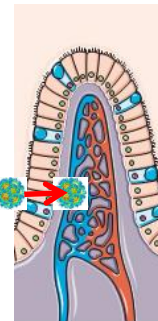
**Infection
par voie digestive**








**Pathologies gastro-intestinales
(diarrhées, vomissements...)**

Pathologies extra-intestinales

**Franchissement
de la barrière intestinale**



-  **Hépatites**
-  **Encéphalites**
-  **Méningites**
-  **Paralysie**
-  **Myocardites**

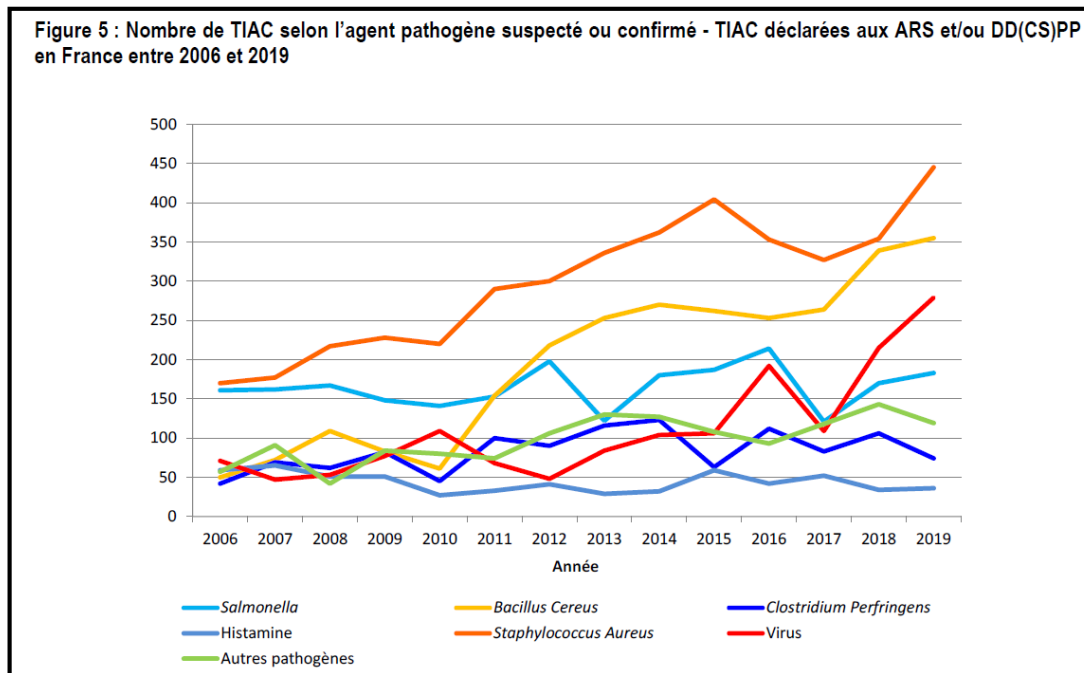
Données épidémiologiques

Agents étiologiques
impliqués dans les
infections
d'origine alimentaire

Matrices alimentaires
concernées

Toxi-infection alimentaires collectives (TIAC) en France

- **Maladie à déclaration obligatoire** depuis 1987
- **TIAC:** Apparition d'au moins deux cas similaires d'une symptomatologie, en général gastro-intestinale, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire
 - ❖ **Cas confirmé** si microorganisme isolé chez au moins un patient ou dans l'aliment
 - ❖ **Cas suspecté** en absence d'isolement sur des arguments cliniques ou épidémiologiques



Epidémies d'origine alimentaire en France (SPF)

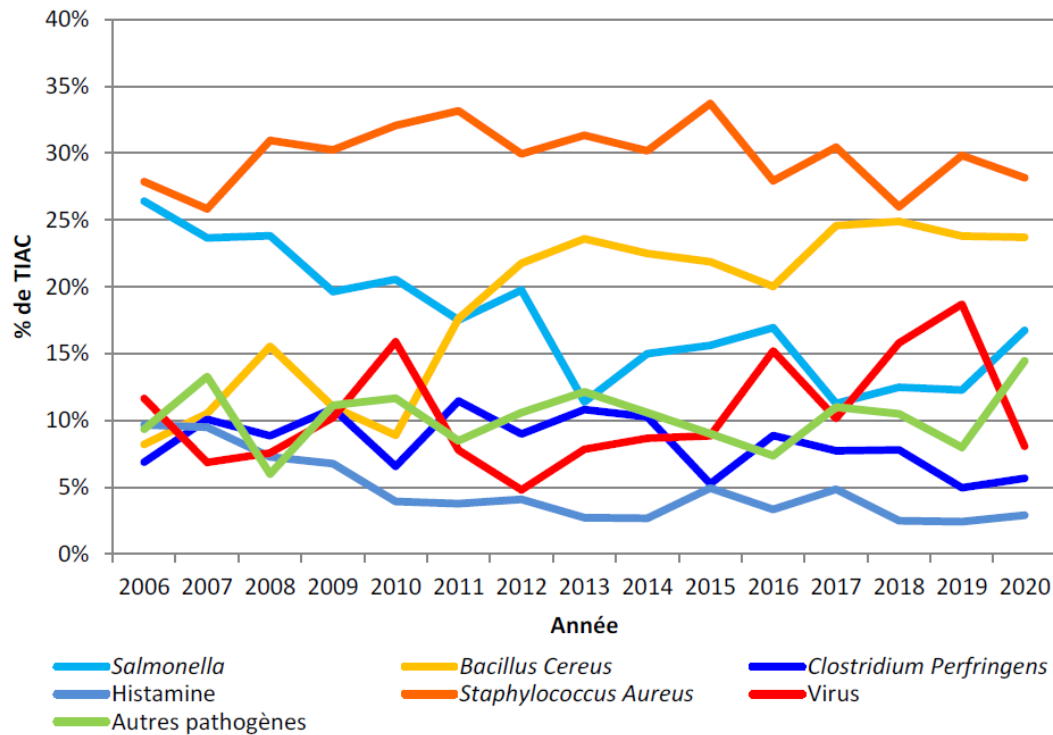


Figure 5 : Pourcentage de TIAC selon l'agent pathogène suspecté ou confirmé, TIAC déclarées aux ARS et/ou DD(CS)PP – France, 2006-2020

Virus impliqués dans 10-20 % des épidémies d'origine alimentaire

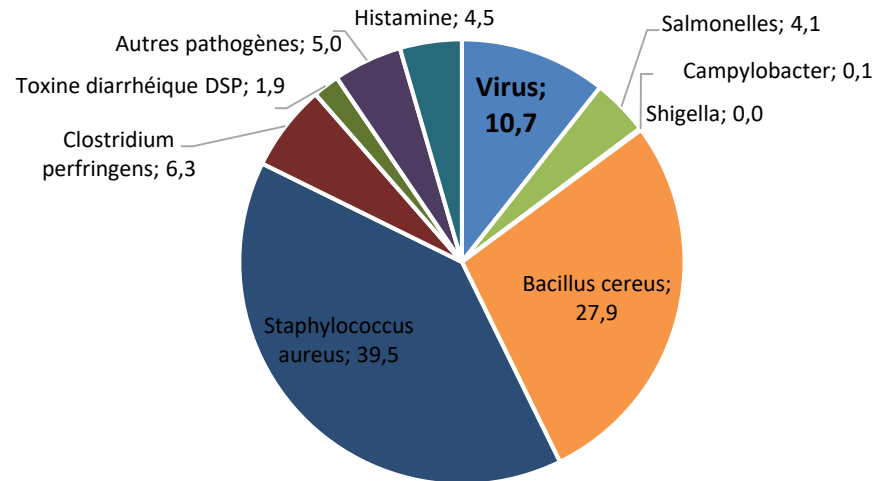
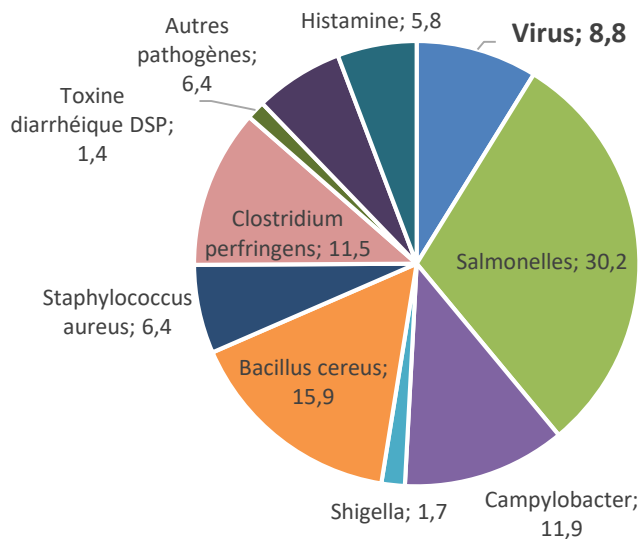
TIAC en France: données de la DO, 2017

Tableau 1 : Détail des TIAC déclarées aux ARS et/ou aux DD(CS)PP - France, 2017.

Agent	TIAC déclarées aux ARS ou DDPP, France, 2017					
	Foyers		Malades		Hospitalisations	
	N	%‡	N	%‡	N	%‡
Total agents confirmés ⁽¹⁾	295	23	4823	37	272	42
<i>Salmonella dont* :</i>	89	30	535	11	131	48
Enteritidis	22	25	138	26	36	27
Typhimurium	14	16	64	12	17	13
Variant monophasique Typhimurium	8	9	66	12	12	9
Infantis	2	2	12	2	1	1
Newport	3	3	16	3	1	1
Sérotypes indéterminés	40	45	239	45	64	49
<i>Campylobacter</i>	35	12	196	4	15	6
<i>Bacillus cereus</i>	47	16	845	18	5	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	19	6	213	4	8	3
<i>Clostridium perfringens</i>	34	12	759	16	0	0
<i>Shigella</i>	5	2	38	1	7	3
Norovirus	19	6	823	17	4	1
Autres virus	7	2	921	19	56	21
Histamine	17	6	136	3	29	11
Toxine diarrhéique DSP	4	1	18	0	0	-
Autres pathogènes ⁽²⁾	19	6	339	7	17	6
Total agents suspectés ⁽³⁾	779	59	6000	46	292	45
<i>Salmonella</i>	32	4	230	4	9	3
<i>Campylobacter</i>	1	0	2	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	217	28	1652	28	87	30
<i>Staphylococcus aureus</i>	308	40	1847	31	88	30
<i>Clostridium perfringens</i>	49	6	484	8	38	13
Virus	83	11	1223	20	30	10
Histamine	35	4	148	2	16	5
Toxine diarrhéique DSP	15	2	51	1	1	0
Autres pathogènes ⁽⁴⁾	39	5	363	6	23	8
Total agents indéterminés ⁽⁵⁾	236	18	2187	17	82	13
Total	1310	100%	13010	100%	646	100%

TIAC en France: données de la DO, 2017

- Répartition des foyers de TIAC (%) en fonction de l'agent étiologique



Etiologie virale

8,8% des foyers de TIAC confirmés

10,6% des foyers de TIAC suspectés

- Importance des virus / nombre de cas

26% des cas confirmés et 20% des cas suspectés

TIAC en France & matrices alimentaires, 2017

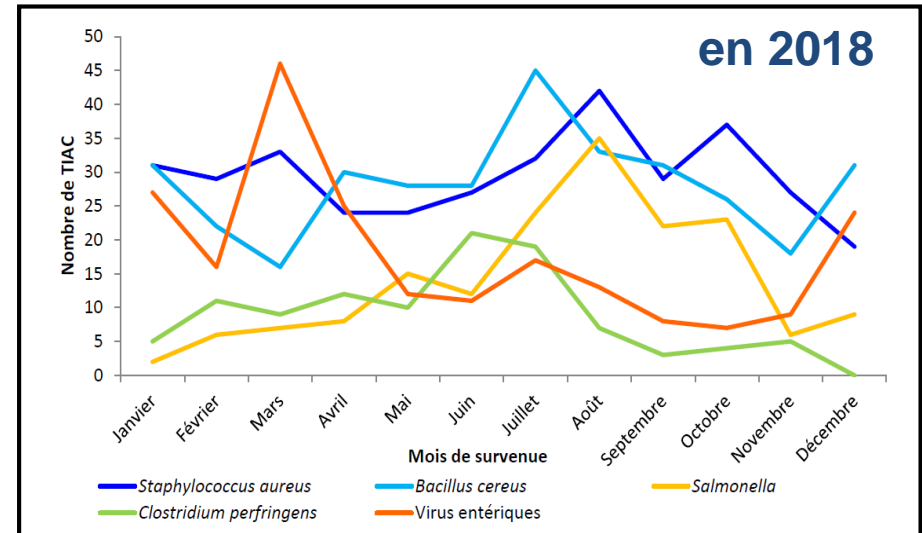
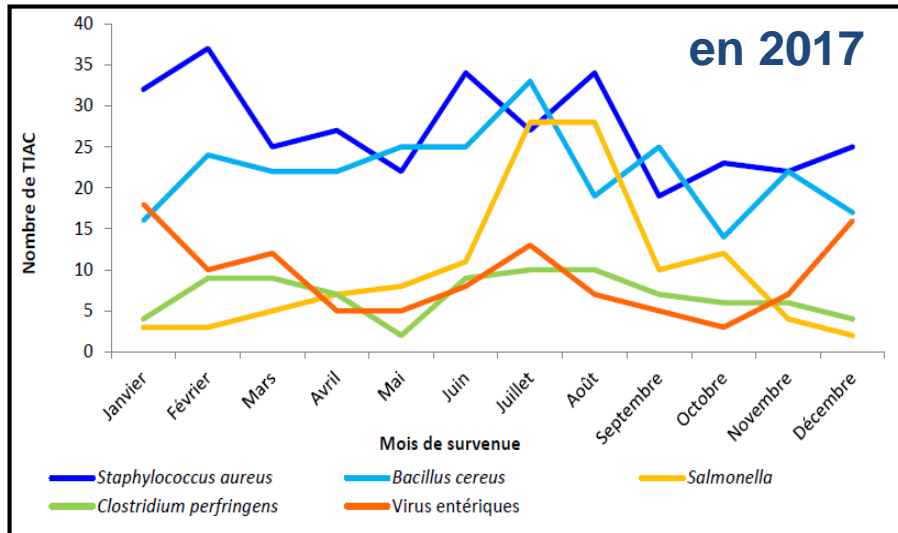
Type d'aliment	<i>Salmonella</i>		<i>Clostridium perfringens</i>		<i>Bacillus cereus</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		Virus		Autres*		Total**	
	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%
Autres aliments ⁽¹⁾	27	22%	37	45%	106	40%	130	40%	34	31%	17	10%	351	33%
Aliments non identifiés	27	22%	22	27%	79	30%	58	18%	26	24%	58	34%	270	25%
Viande	7	6%	9	11%	27	10%	44	13%	9	8%	7	4%	103	10%
Poissons	1	1%	1	1%	9	3%	19	6%	2	2%	47	28%	79	7%
Volaille	8	7%	8	10%	21	8%	17	5%	4	4%	15	9%	73	7%
Œufs / produits à base d'œufs ⁽²⁾	27	22%	1	1%	10	4%	22	7%	7	6%	0	0%	67	6%
Coquillages	3	2%	0	0%	1	0%	2	1%	20	18%	20	12%	46	4%
Charcuterie	7	6%	4	5%	6	2%	14	4%	2	2%	3	2%	36	3%
Fromage / produits laitiers	9	7%	0	0%	2	1%	15	5%	1	1%	1	1%	28	3%
Crustacés	5	4%	1	1%	3	1%	6	2%	4	4%	2	1%	21	2%
Total	121	100%	83	100%	264	100%	327	100%	109	100%	170	100%	1074	100%

(1) Plusieurs aliments suspectés, plats contenant plusieurs ingrédients, plats cuisinés ou plats prêts à être consommés

Parmi les foyers de TIAC dont un agent étiologique viral a été confirmé ou suspecté, les matrices alimentaires impliquées sont:

- **22% coquillages et crustacés**
- **31% aliments composites**

Répartition mensuelle des TIAC déclarées selon l'agent pathogène suspecté ou confirmé



**Augmentation hivernale du nombre de foyers de TIAC
dont l'étiologie est un virus entérique**

Ex. en 2018 → 53% des TIAC où des virus sont suspectés ou confirmés sont survenues entre décembre et mars

Surveillance épidémiologique en France

Maladies à Déclaration Obligatoire (DO)

- **Toxi-infections Alimentaires Collectives (TIAC)**
- Parmi les 9 maladies d'origine alimentaire: **Hépatite A**

Réseaux sentinelles

- **Diarrhées aiguës** (*à partir de 1990*)
- **Virus de l'Hépatite A** (*entre 2000-2008*)

Centres nationaux de Référence (CNR)

- Enterovirus et Parechovirus
- Virus des Hépatites à Transmission Entérique (A et E)
- Virus Gastroentérites (Entérovirus exclus)

Epidémies d'origine alimentaire en Europe 2008–2017 (EFSA)

% / Total	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2017
Salmonelles	35.4	31.0	30.5	26.6	28.6	22.5	19.9	24,4
Virus	13.1	18.8	15.0	9.3	14.1	18.1	20.4	7,8
Campylobacter	9.2	6.0	8.9	10.6	9.3	8	8.5	7,8
Toxines bactériennes	9.8	10.1	8.8	12.9	14.5	16.1	16.1	16,1
Autres agents	3.1	3.9	4.4	2.0	2.6	2.5	2.7	3,6
Autres agents bactériens	0.4	0.9	1.2	0.8	1.5	1.5	1.0	1,3
E coli	1.4	1.4	0.6	1.1	1.0	0.02	1.4	0,9
Parasites	1.3	0.9	0.6	0.5	0.7	0.8	0.6	0,6
Yersinia	0.4	-	-	0.3	0.2	0.2	0.2	-
<i>Inconnu</i>	25.9	27.1	30.1	35.8	27.6	28.9	29.2	37,6
	2^{èmes} agents étiologiques			4^{ème}	3^{ème}	2^{ème}	1^{er}	3^{ème}

Virus impliqués dans 10-20 % des épidémies d'origine alimentaire

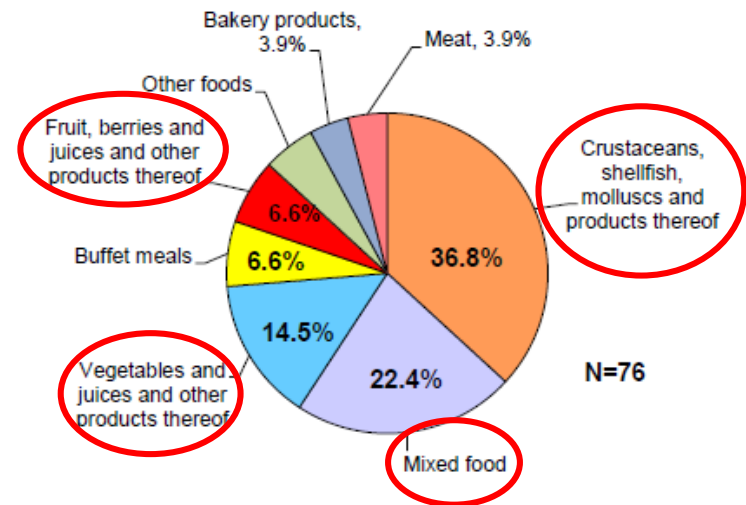
Epidémies alimentaires d'origine virale en Europe En 2014 (EFSA)

En fonction des virus incriminés (2014)

Causative agent	Country	Strong-evidence outbreaks				
		Number	Cases	Hospitalised	Deaths	
Calicivirus – norovirus (Norwalk-like virus)	Austria	3	308	8	0	
	Belgium	2	220	0	0	
	Denmark	16	1,047	1	0	
	Finland	4	109	0	0	
	France	14	128	3	0	
	Germany	2	247	0	0	
	Hungary	4	350	0	0	
	Lithuania	1	41	41	0	
	Netherlands	2	22	0	0	
	Poland	6	230	31	0	
	Spain	8	326	6	0	
	Sweden	4	188	0	0	
	United Kingdom	10	349	2	0	
	Norway	2	15	0	0	
	Flavivirus	Lithuania	1	4	4	0
	Hepatitis A virus	Finland	1	12	10	0
France		1	3	3	0	
Norway		1	33	0	0	
Rotavirus	Croatia	1	26	0	0	
	Poland	1	2	2	0	
Viruses	Spain	1	5	1	0	
	France	1	6	0	0	
	Spain	1	31	0	0	
Total (MS)		84	3,654	112	0	

Norovirus

En fonction des aliments incriminés pour les épidémies à norovirus (2014)



**Coquillages et crustacés;
végétaux; fruits et plats
mélangés = 80%**

Systeme d'alerte pour les denrees alimentaires

RASFF – the Rapid Alert System for Food and Feed

<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/search>

Commission européenne | RASFF Window

SEARCH CONSUMERS TRACES

Date: 01/01/2020 – 15/09/2022
Countries: Any
Type: Any
Product: Any
Risk: Any

Reference	Subject	Per page
1234.5678	Virus	25

Search Reset

RASFF Window
Version 2.2.1

The Commission publishes a searchable online database of RASFF notifications classified as alert, information notification or border rejection as part of its RASFF Portal. As it is necessary to strike the balance between openness and the protection of commercial information, the trade names and the identity of individual companies are not published. This is not detrimental to consumer protection, as a RASFF notification implies that all required measures have been or are in the process of being taken. The public must be aware that the Commission is not in a position to release more information other than that published here. However, in exceptional circumstances where the protection of human health requires greater transparency, the Commission takes the appropriate action through its usual communication channels. The Commission informs the authorities of third countries of notifications concerning products manufactured in, distributed to or dispatched from these countries. However, the fact that a country is mentioned as the origin of a product does not necessarily imply that the identified hazard(s) originated in the country concerned. The Commission cannot and does not take any responsibility for the accuracy of the information in the RASFF portal online database. The information is published as it has been received from the official contact points in the Member States/EEA-EFTA countries. In the event that further information received from a contact point regarding an already published notification leads to modification or withdrawal of the notification, the Commission shall correct the information in its RASFF portal database at once or shall withdraw the notification concerned.

[Cookies policy](#)

Bilan des données _ portail RASFF

Nombre de notifications impliquant des Virus

2000 - 2004	2005 - 2009	2010 - 2015						2016
		2010	2011	2012	2013	2014	2015	
12	26	22	12	12	47	61	20	25

174

Virus

84% Norovirus (199)

16% VHA (38)

Aliments

**70 % Coquillages, crustacés,
mollusques** (166)

30 % Fruits et végétaux (71)

Viral outbreaks : NoV & food

Virus	Food	Cases	Date	Countries	References
Norovirus	Oysters	334 (65 clusters)	2010	UK, Norway, France, Sweden, Denmark	Westrell, 2010
<p><i>Detection of GI and GII in isolates from patients and oysters; common finding in oysters-related outbreaks. Reflects an environmental source of contamination</i></p>					
Norovirus	Pasta Raw vegetables	147 (French military parachuting unit)	2011	France	Mayet, 2011
<p><i>Same norovirus (genogroup I) was found in some of the food items consumed by the cases and in a cook who prepared the meals → Food-handler contamination</i></p>					
Norovirus	Frozen strawberries	11000	2012	Germany	Bernard, 2014
<p><i>Analytical epidemiological studies identified dishes containing strawberries as the most likely vehicle: strawberries of one lot, imported frozen from China</i></p>					
Norovirus	Bottled water	4146	2016	Spain	Blanco, 2016
<p><i>Suggested cause of water contamination: high number of affected persons from 381 offices that received water coolers; many different genotypes found in some patients “fecal specimens”, point toward sewage pollution of the spring aquifer</i></p>					

Viral outbreaks : HAV & food

Virus	Food	Cases	Date	Countries	References
HAV	Semi-dried tomatoes	550	2009	Australia	Donnan, 2009
		59	2010	France	Gallot, 2011
		13	2010	Netherland	Petrignani, 2010

- **Australia:** Hepatitis A RNA detected in 22 samples of semi-dried tomatoes. Genotype IB was identified in 144 of 153 (94%) patients tested from 2009, and partial sequence analysis showed complete identity with an isolate found in a food
- **Netherland:** Virus not detected in any of 81 tested food samples
- **France:** batch no longer available at the supplier or at the sandwich shops for virologic analysis or for recall

HAV	Mixed frozen berries (smoothies, cakes)	1589	2013 2014	13 European countries	Severi, 2015
-----	--	------	--------------	--------------------------	--------------

*Largest food-borne HA outbreak involving such a wide geographical area in Europe
Suspected / contaminated food batches recalled:*

EFSA trace-back could not indicate a single point source of contamination but identified **Bulgarian blackberries and Polish redcurrants** as the most common ingredients in the lots of berries associated with cases

Viral foodborne & typing to determine source of infection

Many difficulties : low level of contamination, presence of inhibitors

As possible... Molecular typing of human viral foodborne pathogens isolated from food has again proven indispensable for the **detection, investigation and monitoring of geographically dispersed or protracted outbreaks**

As an example: Foodborne outbreak, Germany, 2012 (frozen strawberries)
(Bernard et al., 2014)

- Noroviruses detected in 7/11 samples derived from the lot of strawberries implicated in the outbreak
 - **Typing of NoV : three different genotypes** including a combination of norovirus genotype II.16 (viral polymerase) and II.13 (viral capsid)
 - **Genotype combination also found in some of the patients** that were involved in the outbreak, but that had not been reported in Germany so far
- Detection of **several different genotypes in the strawberries may suggest contamination from sewage** rather than from a single infected food handler: strawberries imported from China

Transmission des virus entériques

Transmission féco-orale

Contact direct



Contact indirect

Eau et aliments contaminés par les fèces

Contamination manu-portée



Manipulateurs

Contamination environnementale (eau d'irrigation, eau de mer...)



Végétaux, fruits...



Fruits de mer

Transmission zoonotique (HEV)

Réservoir animal



Porc, sanglier, cervidés

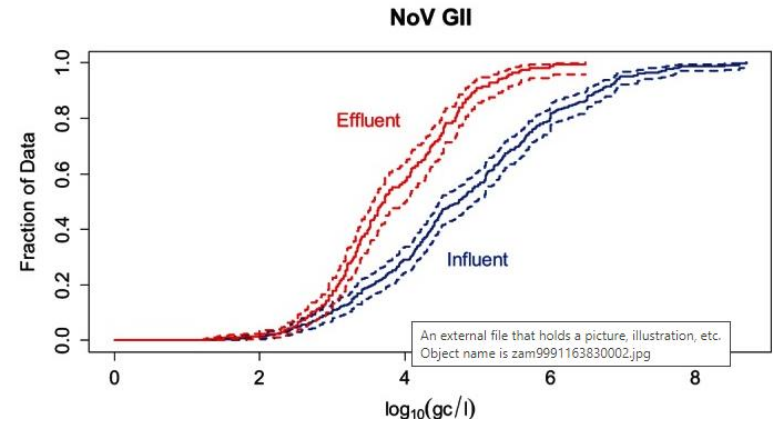
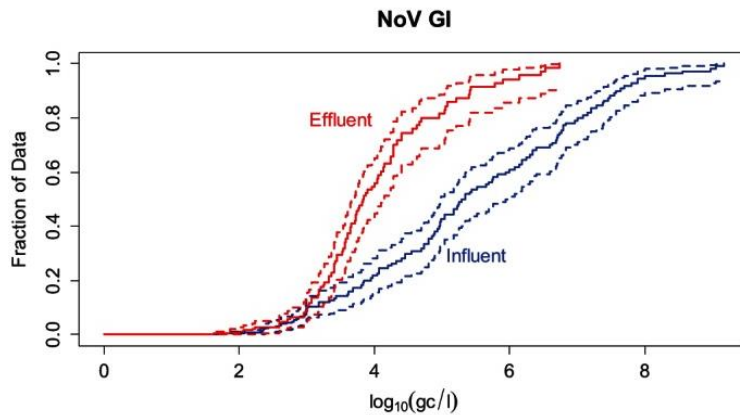
Aliments HEV+ provenant d'animaux infectés



Figatelli

Viral contamination of waste waters (1)

Meta-analysis that evaluates NoV concentrations (in copies genome / L) in influent and effluent of *Waste Water Treatment Plan* (WWTP)
→ Relevant data reported in the literature (until sept. 2013, in USA and Canada) (*Pouillot R, et al., 2015*)



Mean influent concentration NoV GI ($1.5 \log_{10} \text{ gc/L}$), NoV GII ($3.9 \log_{10} \text{ gc/L}$)
Efficacy of treatment applied dependent of one WWTP to another
Effluent concentrations → Viral genome reductions

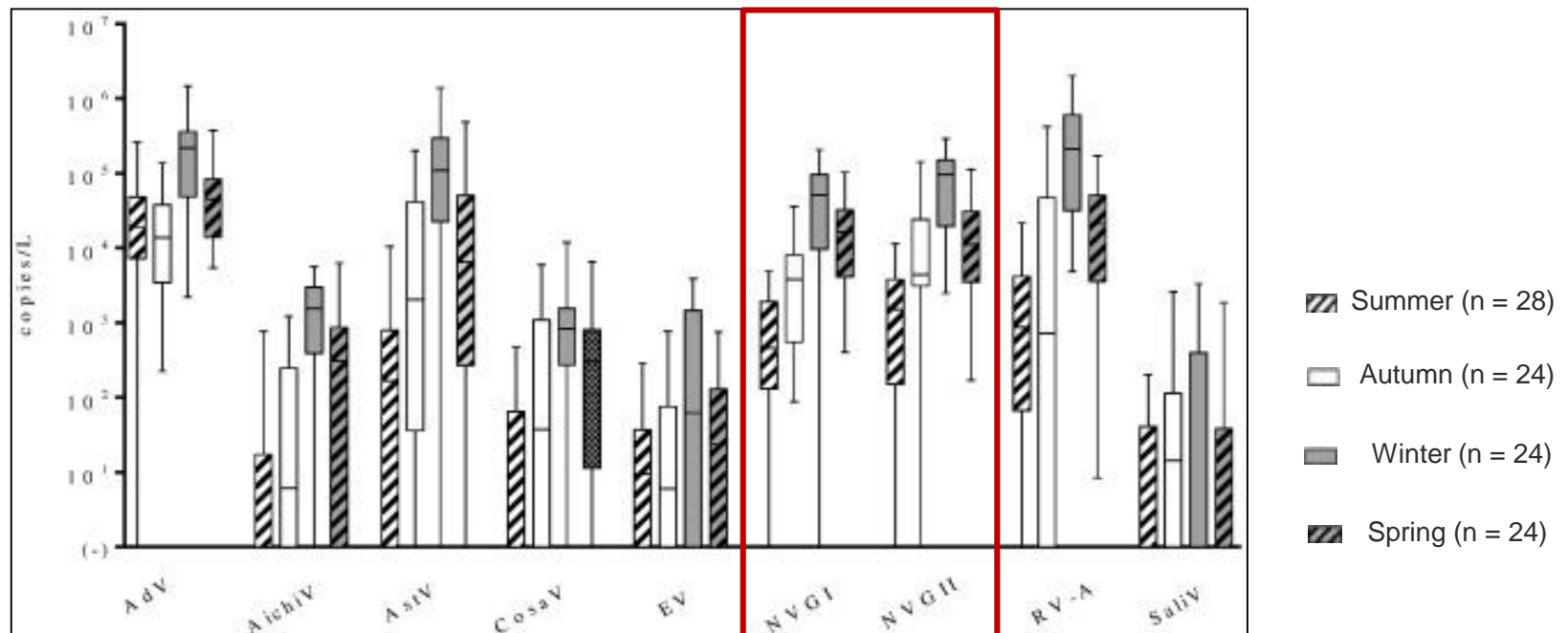
NoV GI \log_{10} reduction (95% CI, $-3.9, 0.5 \log_{10} \text{ gc/liter}$)

NoV GII (95% CI, $-3.6, -0.3 \log_{10} \text{ gc/liter}$)

Viral contamination of waste waters (2)

Monitoring of **enteric viruses** in the **Seine river** (*Prevost et al., 2015*)
275 water samples were collected, twice a month for one year

- Viral load and the detection frequency increased significantly between the samples collected the most upstream and the most downstream of the Paris urban area
- **Seasonal viral load** for almost all enteric viruses: correlation with gastroenteritis cases recorded by the French medical authorities



Contamination virale des coquillages & variations saisonnières

Analysis of the European baseline survey of norovirus in oysters
 European Food Safety Authority (EFSA) 2019, doi: 10.2903/j.efsa.2019.5762

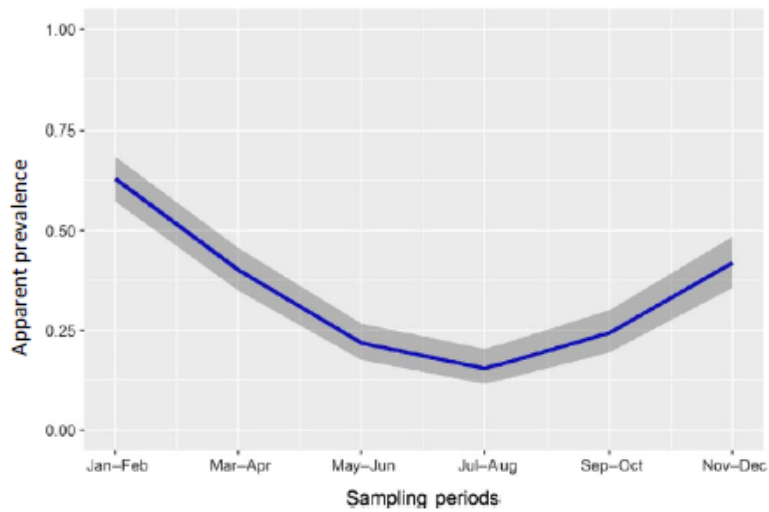
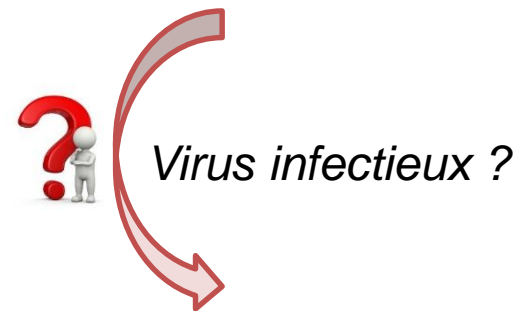


Figure 10: Apparent prevalence trend over a year in production areas and its confidence interval

Table 31: Estimated apparent prevalence of norovirus trend over a year in production areas and confidence interval for each sampling period

Period	Estimated prevalence	Lower bound	Upper bound
Jan-Feb	0.630	0.572	0.684
Mar-Apr	0.401	0.349	0.456
May-Jun	0.218	0.176	0.267
Jul-Aug	0.155	0.116	0.203
Sep-Oct	0.244	0.195	0.301
Nov-Dec	0.419	0.356	0.484

Novembre - Avril
 35-68% huitres
NoV+ GENOME



Risque infectieux ?

Contamination des végétaux lors de l'irrigation avec des eaux souterraines contaminées par les VE

Enteric Viruses in Raw Vegetables and Groundwater Used for Irrigation in South Korea[∇]

Sooryun Cheong,^{1†} Cheonghoon Lee,^{1,2†} Sung Won Song,¹ Weon Cheon Choi,¹
Chan Hee Lee,³ and Sang-Jong Kim^{1,2*}

School of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Seoul National University, Seoul, South Korea¹; Institute of Microbiology, Seoul National University, Seoul, South Korea²; and Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, South Korea³

Received 10 July 2009/Accepted 12 October 2009

- ✓ 29 échantillons d'**eau souterraine**
=> **17%** contaminés par des VE
- ✓ 30 échantillons de **végétaux**
=> **10%** contaminés par VE

Eau d'irrigation utilisée lors de la culture des végétaux est à l'origine de leur contamination

Origine de la contamination des fruits par les VE

International Journal of Food Microbiology 167 (2013) 177–185

Contents lists available at ScienceDirect

 ELSEVIER

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro

 CrossMark

Tracing enteric viruses in the European berry fruit supply chain

Leena Maunula ^{a,*}, Agnieszka Kaupke ^b, Petra Vasickova ^c, Kirsi Söderberg ^a, Iwona Kozyra ^b, Sava Lazić ^d, Wim H.M. van der Poel ^e, Martijn Bouwknegt ^f, Saskia Rutjes ^f, Kris A. Willems ^{g,h}, Rita Moloney ⁱ, Martin D'Agostino ^j, Ana Maria de Roda Husman ^f, Carl-Henrik von Bonsdorff ^a, Artur Rzeżutka ^{b,**}, Ivo Pavlik ^{c,***}, Tamas Petrovic ^{d,****}, Nigel Cook ^j

^a Department of Food Hygiene and Environmental Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland
^b National Veterinary Research Institute, Pulawy, Poland
^c Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic
^d Scientific Veterinary Institute "Novi Sad", Serbia
^e Central Veterinary Institute of Wageningen University and Research Centre, The Netherlands
^f National Institute for Public Health and the Environment, RIVM, The Netherlands
^g Centre of Industrial Microbiology and Biotechnology (CIMB), Department of Microbial and Molecular Systems (M²S), Faculty of Engineering Technology, KU Leuven, Belgium
^h Scientia Terrae Research Institute (STRI), Belgium
ⁱ Environmental Health Service, Health Service Executive, Sandfield Centre, Ennis, Co. Clare, Ireland
^j Food and Environment Research Agency (FERA), Sand Hutton, York, United Kingdom

Essentiellement au stade production

- Eau d'irrigation contaminée
- Manipulateurs

Contamination manuportée

[J Infect Dis](#). 2015 Feb 15;211(4):563-70. doi: 10.1093/infdis/jiu479. Epub 2014 Aug 25.

Sources of Calicivirus contamination in foodborne outbreaks in Denmark, 2005-2011--the role of the asymptomatic food handler.

[Franck KT](#)¹, [Lisby M](#)², [Fonager J](#)³, [Schultz AC](#)⁴, [Böttiger B](#)⁵, [Villif A](#)², [Absalonsen H](#)², [Ethelberg S](#)⁶.

⊕ Author information

Abstract

BACKGROUND: Norovirus (NoV) is the predominant cause of foodborne disease outbreaks. Virus contamination may occur during all steps of food processing, from production to preparation and serving. The relative importance of these different routes of contamination is unknown.

METHODS: The purpose of this study was to estimate the proportions of outbreaks caused by asymptomatic and symptomatic food handlers (FHs). Reports of foodborne NoV and sapovirus outbreaks (n=191) that occurred over a 7-year period were extracted, reviewed, and categorized according to the available evidence for source of contamination.

RESULTS: In 64 (34%) of the outbreaks, contamination from FHs took place during preparation or serving of food. In the majority of these outbreaks (n=41; 64%), the FHs were asymptomatic during food handling. Some had been in contact with ill household members before handling the food and remained asymptomatic; others developed symptoms shortly after or were post-symptomatic. In 51 (27%) of the outbreaks, contamination occurred during production of the food, and in 55 (29%) of the outbreaks, contamination had supposedly occurred after serving a guest at a self-serve buffet.

CONCLUSIONS: Guidelines regarding exclusion of FHs where household members suffer from gastroenteritis could limit the number of outbreaks.

© The Author 2014. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

KEYWORDS: Caliciviridae; food; food handlers; foodborne outbreaks; foodborne transmission; norovirus; sapovirus; viral gastroenteritis

Nombre total d'épidémies: 191 (NoV et sapovirus)

- ✓ **34%** => Contamination par un manipulateur lors de la préparation des aliments et au moment du service (**dont 64% provenant de manipulateurs asymptomatiques**)
- ✓ **27%** => Contamination au stade de la production

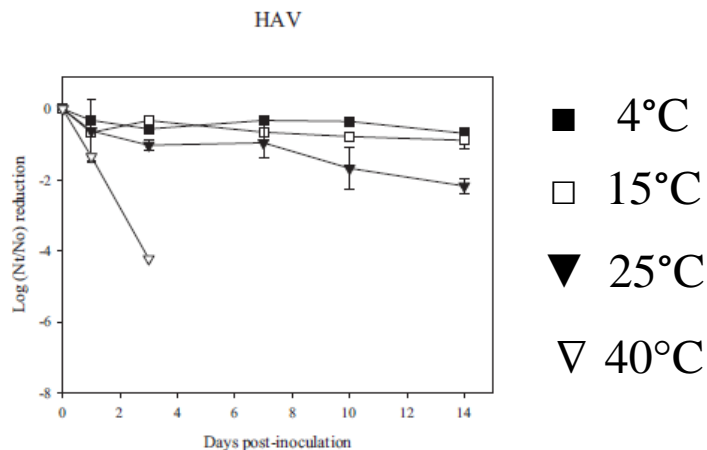
Grande stabilité des virus entériques

Les virus entériques humains sont des **parasites obligatoires**, ils **ne se multiplient pas dans l'environnement** mais résistent bien aux conditions naturelles

Résistance dans l'eau et dans l'environnement (*Température, UV...*)

Persistance du **virus de l'hépatite A** dans les **huitres** (bioaccumulation) en fonction de la température (*Lee et al., 2015*)

A. 50% RH



Quantification des virus infectieux
(*Méthode Plages de lyse*)

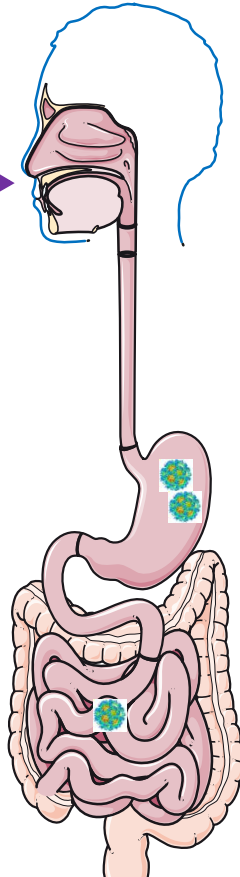
→ Stabilité du VHA à 4°C et à température ambiante

Caractéristiques communes des virus entériques

Transmission par voie féco-orale

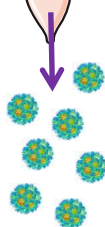
Faible dose infectieuse

(<10² particules virales)



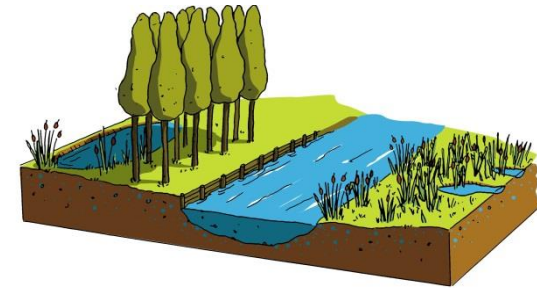
Excrétion à forte dose dans les selles

(10⁷ particules infectieuses par gramme de selles)



Dissémination des virus entériques dans l'environnement

via les selles et les vomissements

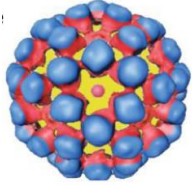


Grande stabilité en dehors de leur hôte

- **Résistance dans l'environnement** (Température, UV...)
- **Résistance aux procédés technologiques (IAA) et aux procédés de désinfection** (pression, désinfectants, radiations UV, acides, chlore)

Couples

« danger viral - matrice alimentaire »



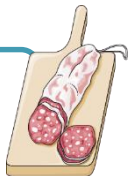
- **Norovirus**
- **Virus de l'hépatite A**

- Coquillages bivalves
- Végétaux crus: légumes, fruits, herbes et épices
- Jus de fruits et de légumes non pasteurisés
- Plats contenant ces ingrédients et/ou manipulés



- **Virus de l'hépatite E**

- Produits à base de foie cru de porc

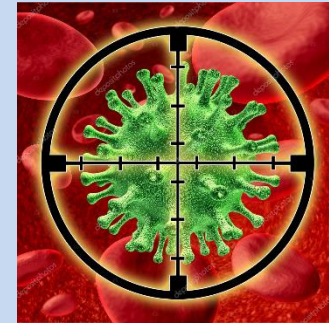


Moyens de contrôle

Détection



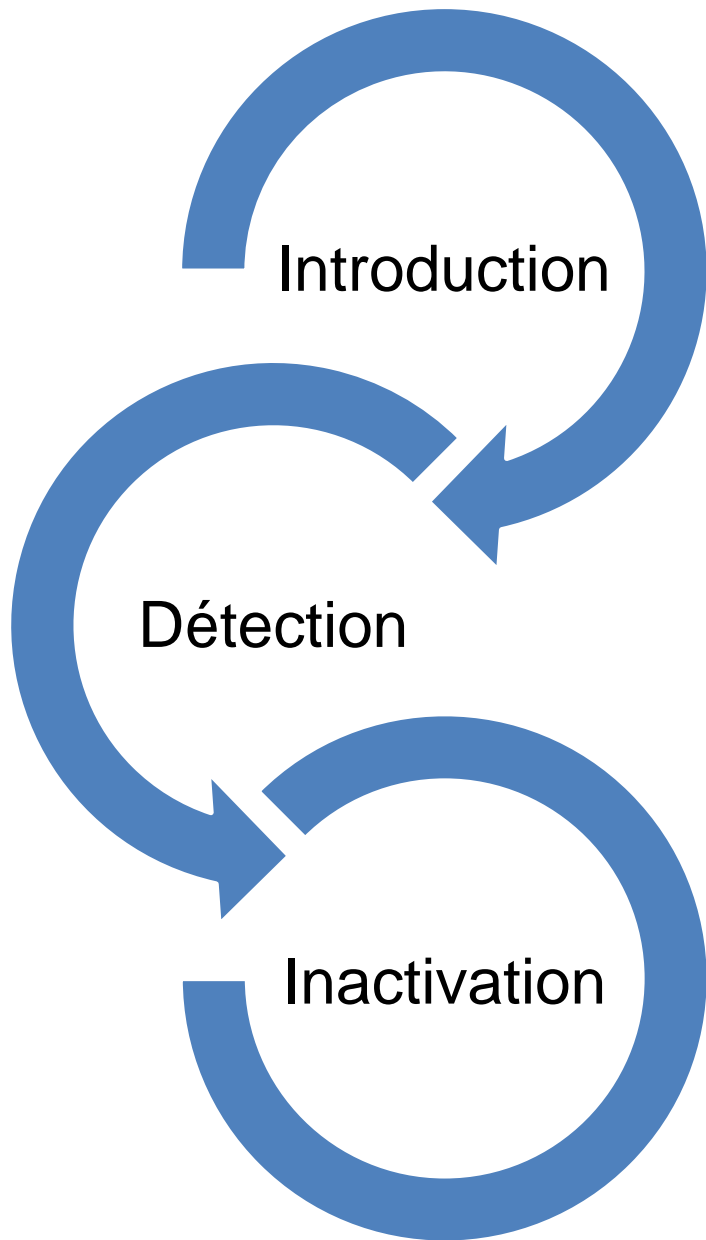
Inactivation



**Détecter les virus
dans l'eau et les aliments**

**Inactiver les virus présents
dans l'eau et les aliments**

Nécessité de disposer des méthodes de détection adaptées



- Données épidémiologiques
- Couples « Virus – Matrice »
- Problématique de la virologie alimentaire

- Principaux virus d'intérêt
- Méthodes de détection : VHA et norovirus (ISO 15216)
- Applications & évaluation du risque
- Evolution des méthodes
- Risques émergents : virus de l'hépatite E

- Etude d'inactivation: outils à disposition
- Méthodes alternatives pour la détection des virus infectieux
- Inactivation virale : efficacité fonction du virus et de la matrice

Principaux virus transmissibles par voie alimentaire

Agents pathogènes impliqués dans les TIAC en France

Pathologies gastro-intestinales

(diarrhées, vomissements...)

- **Norovirus**

Transmission par voie alimentaire (12-16%)

Parmi les **maladies alimentaires** (34%)

Responsable du plus grand nombre de cas

Pathologies extra-intestinales

Virus des hépatites à transmission entérique

- **Virus de l'hépatite A (HAV)**

Transmission par voie alimentaire (16%); Maladies alimentaires (0,2%)

- **Virus de l'hépatite E (HEV)**

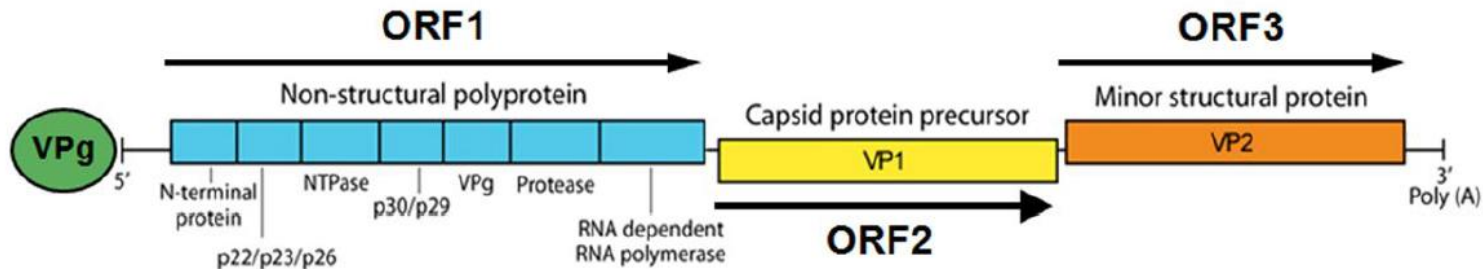
Transmission par voie alimentaire (75-100%); Maladies alimentaires (3,9%)

Norovirus

✓ Famille *Caliciviridae*, genre Norovirus

Virus non enveloppé à capside icosaédrique (Φ 27-40 nm)

ARN simple brin de polarité positive (*ARNsb +*) (7600 nt)



✓ Grande diversité génétique et antigénique

5 Génogroupes (I à V) (comparaison des séquences des régions du génome codant l'ARN polymérase et VP1)

✓ Seuls les **génogroupes I** (8 génotypes), **II** (19 génotypes) et **IV** sont impliqués dans les **infections humaines**

✓ **GII.4** prédomine = responsable de **80-90% des infections à norovirus chez l'homme**

Importance épidémiologique des norovirus

- 1^{ère} cause de diarrhée sporadique non bactérienne chez l'adulte
- 2^{ème} cause chez l'enfant < 5 ans
- 1^{ère} cause de diarrhée épidémique tout âge confondu

✓ 85-90% des diarrhées virales

≈ 267 millions de cas et 218.000 décès /an

→ pays à bas revenus (enfants +++)

✓ Enfants < 5 ans

6,5 fois plus fréquents que chez les enfants > 5ans

1^{ère} cause en médecine générale si politique de vaccination anti-rotavirus

✓ Sujets > 65 ans

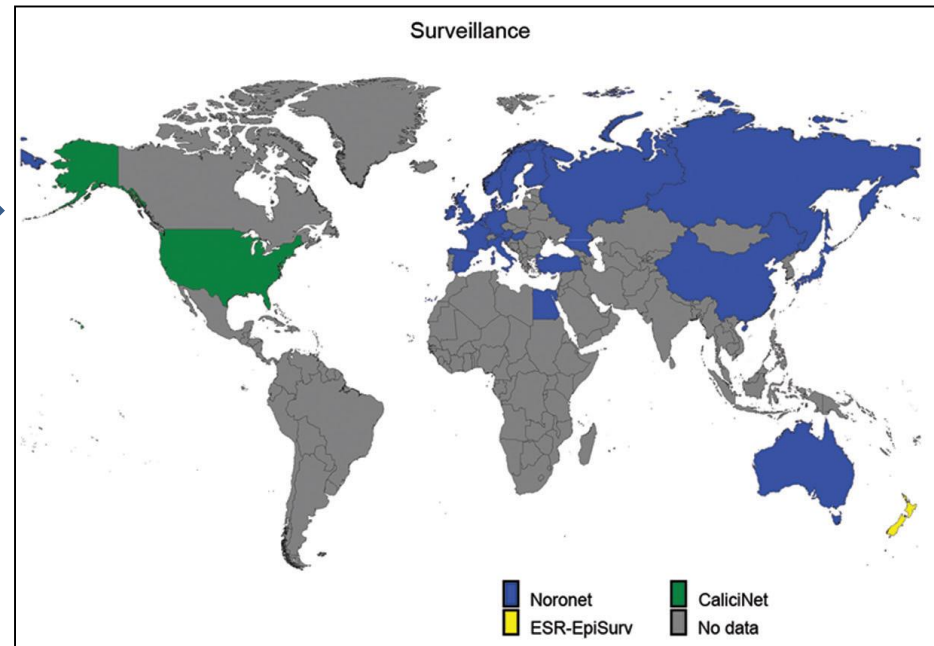
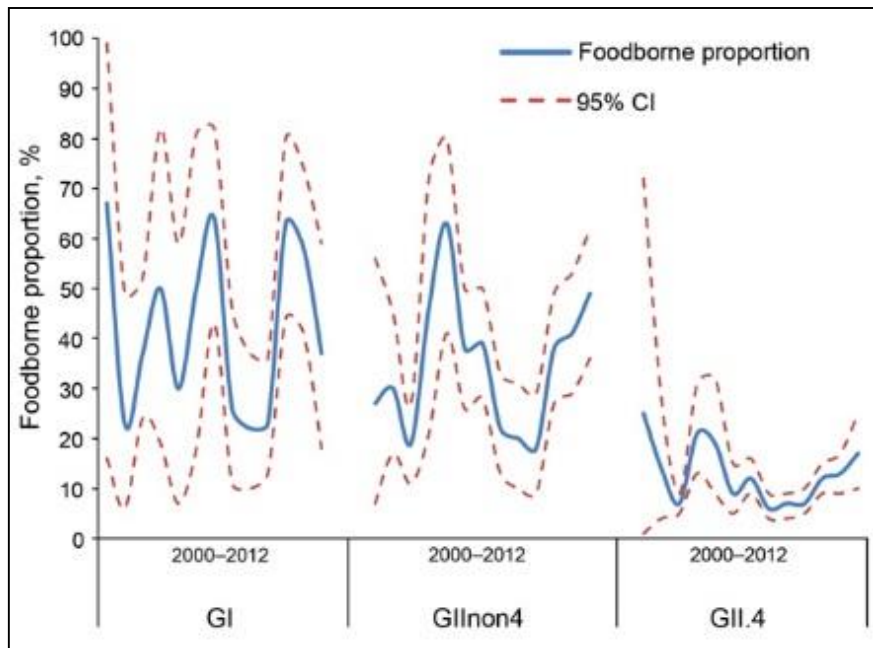
Vulnérabilité +++ ; Décès = 6 cas / 10.000 (20 fois plus que les 18-64 ans)

✓ **Aux USA:** $\left\{ \begin{array}{l} 19 - 21 \text{ millions de cas} \\ 56\ 000 - 71\ 000 \text{ hospitalisations} \\ 570 - 800 \text{ morts (Lopman et al., 2011, 2012; Hall, 2013)} \end{array} \right.$

✓ Absence de vaccin

Transmission du Norovirus par voie alimentaire : 1999 – 2012

Surveillance des épidémies à
Norovirus



- 10% des épidémies dues à GII.4
- 27% des épidémies dues aux autres génotypes

Virus de l'hépatite A (VHA)

✓ Famille *Picornaviridae*, Genre Hepatovirus

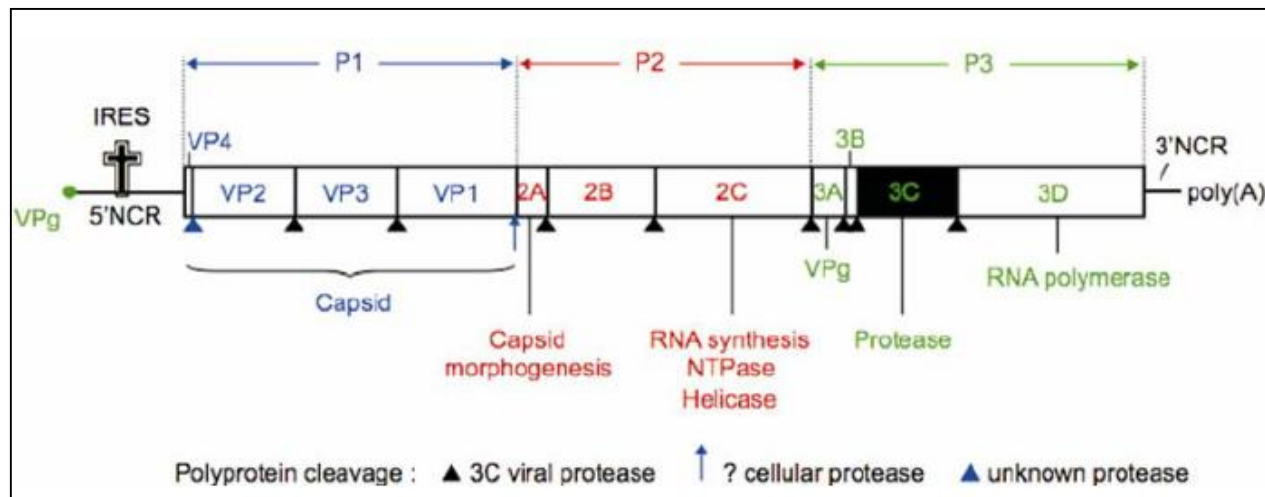
Virus non enveloppé à capsid icosaédrique (Φ 27-32 nm)

ARN simple brin de polarité positive (ARNsb +) (7500 nt)

✓ 6 génotypes (séquence de VP1) dont 3 humains

Génotypes I, II et III divisés en sous-types A/B infectent l'homme

✓ Génotype IA majoritaire en Amérique, Chine, Japon et Europe. Co-circulation avec d'autres génotypes et sous-types



D'après Kumar et al., 2010

Hépatite A

- ❖ Infection aiguë bénigne ou grave
- ❖ 126 millions cas / an dans le monde ; 30-35000 décès imputables (OMS)
- ❖ Durée d'incubation: 28 jours (15-50 jours)

Sévérité des signes cliniques augmentent avec l'âge

90% des enfants infectés avant l'âge de 5 ans :

Infection asymptomatique

70 à 80 % des adultes infectés présentent une hépatite aiguë
(fièvre, troubles digestifs, ictère, urines foncées, selles décolorées, augmentation des ALAT)

Maladie résolutive dans la plupart des cas

Mortalité liée à l'infection par le VHA : 0,2-0,4% des cas symptomatiques > 2% après 40 ans

⇒ *Formes graves (hépatites fulminantes) s'observent plus fréquemment chez l'adulte et en particulier ceux porteurs d'une hépatopathie chronique sous-jacente*

Absence de chronicité même si des infections à rechute peuvent apparaître après une Hépatite A apparemment guérie

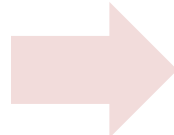
Modification du profil épidémiologique

✓ **Diminution de la séroprévalence dans la plupart des pays** depuis 20 ans liée à l'amélioration du niveau d'hygiène

↪ Baisse de la séroprévalence chez les enfants

↪ **Adultes davantage susceptibles**

Contamination
chez des sujets plus âgés



Infections symptomatiques
plus fréquentes et plus
sévères

Risque d'épidémies d'origine alimentaire s'accroît
dans des populations qui n'ont jamais rencontré le virus
et qui ne sont pas vaccinées

France: 74% des sujets de 6 à 49 ans ne sont pas immunisés

✓ **Vaccination** recommandée pour voyages en zone d'endémie

Hépatite A en France

✓ **En France: Maladie à DO depuis 2006**

700 à 2000 cas déclarés/an

Incidence faible (< 1/100 000 ha)

Maximale sur la classe d'âge 6-15 ans

Contact sujet infecté 30-40%;

Séjour hors métropole 30-40%

Selon les années **25-38% des cas sont groupés**

En 2015: 2 épisodes de cas groupés (Landes (9 cas); Ile-et-Vilaine (17 cas))

✓ **Transmission féco-orale du VHA**

Contact direct : diffusion communautaire par transmission interpersonnelle est limitée par les standards élevés d'hygiène et l'intervention vaccinale au sein de groupes

Indirecte *via* l'ingestion d'aliments contaminés => **Risque potentiel d'épidémies d'origine alimentaire s'accroît**

(Séroprévalence faible; Contamination ponctuelle des eaux côtières si dysfonctionnement; Aliments importés de zone d'endémie ++)

Virus de l'hépatite E (VHE)

✓ Famille *Hepeviridae*, Genre *Hepevirus*

Virus non enveloppé à capside icosaédrique

ARN simple brin de polarité positive (ARNsb +)

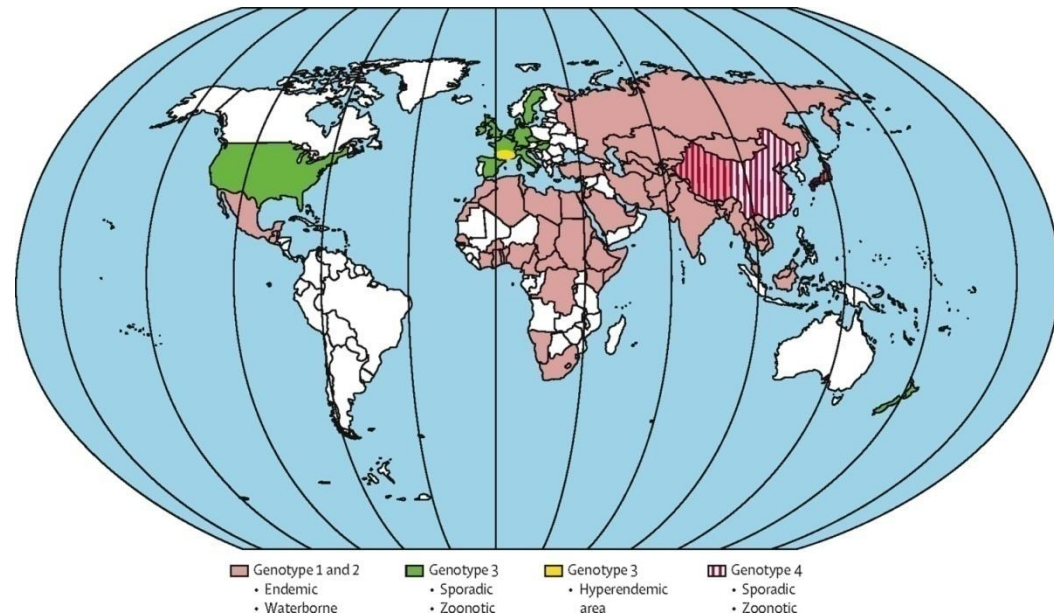
✓ 4 génotypes majeurs répartis / origine géographique

Génotypes 1 et 2 :

Asie; Amérique Centrale et Afrique
Infections strictement humaines

Génotypes 3 et 4 :

Infections humaines et animales



Kamar et al., 2012. *The Lancet*. 379, 2477-88

Importance épidémiologique du VHE

✓ Cause majeure d'hépatites aiguës

[20 millions d'infections symptomatiques par le VHE,
Plus de 3 millions d'hépatites aiguës
70 000 décès liés à la maladie

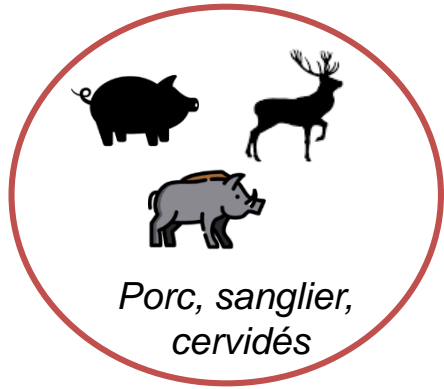
✓ **Transmission féco-orale indirecte *via* contamination de l'eau** : *Faible hygiène, assainissement inadéquat, distribution de l'eau de boisson contaminée*
=> Majorité des épidémies en zone d'endémie (Génotypes 1 et 2)

✓ **Transmission zoonotique** (Génotypes 3 et 4)

Par contact direct des animaux infectés: *Séroprévalence élevée chez le personnel exposé (vétérinaires, bouchers, abattoirs, gardes forestiers)*

Par voie alimentaire ...

Transmission zoonotique par voie alimentaire



Virus de l'hépatite E

Animaux réservoirs

Contamination fécale de l'environnement
(Lisier / fumier / effluents d'élevage)



Eau de boisson

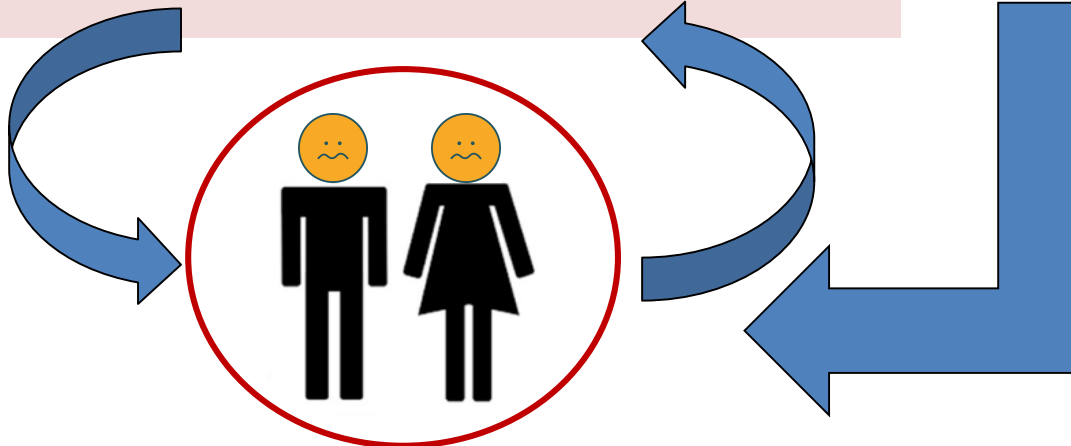


Fruits et végétaux



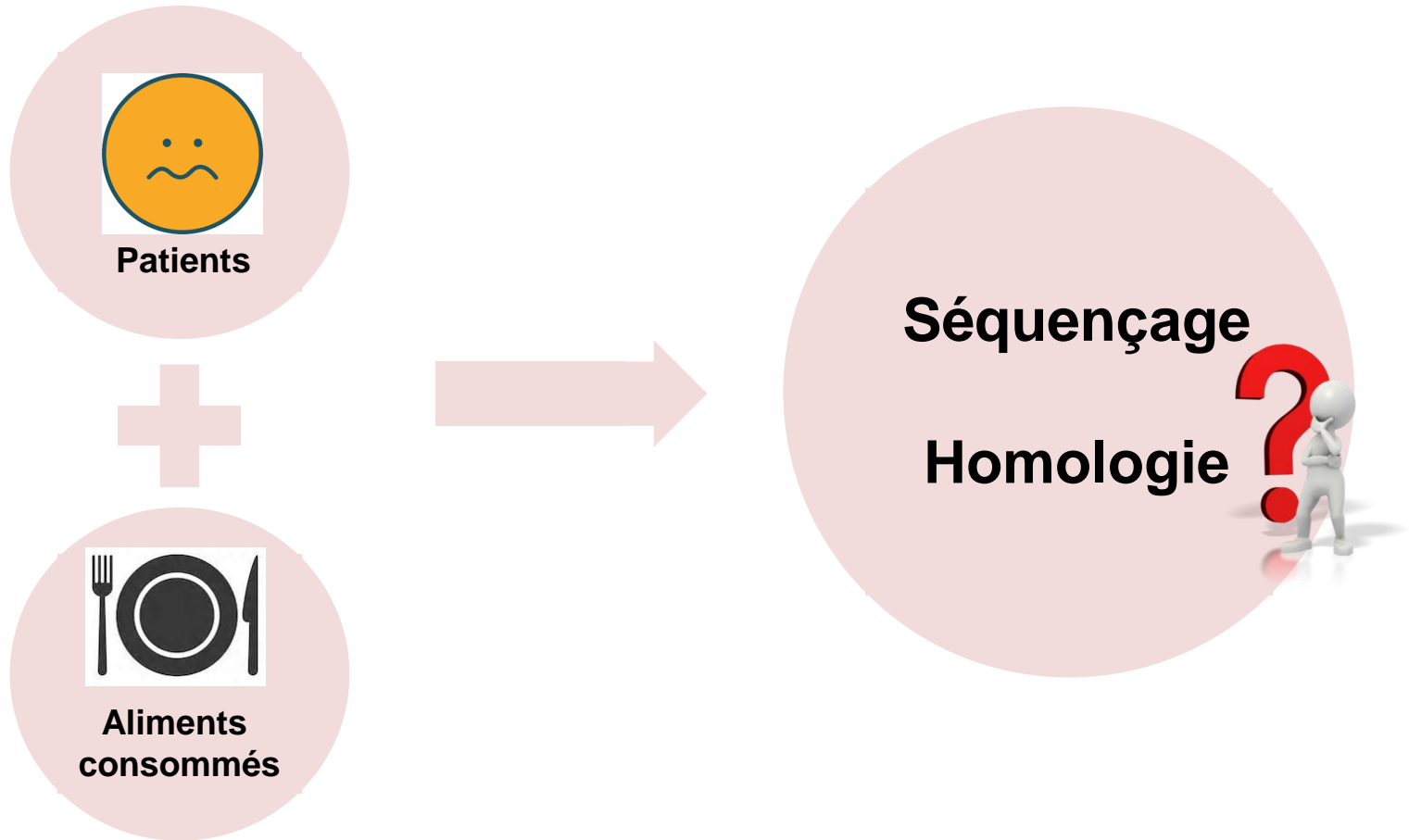
Fruits de mer

Produits alimentaires d'origine animale



Confirmation de l'origine alimentaire d'une infection virale

Isolement virus



Détection du VHE

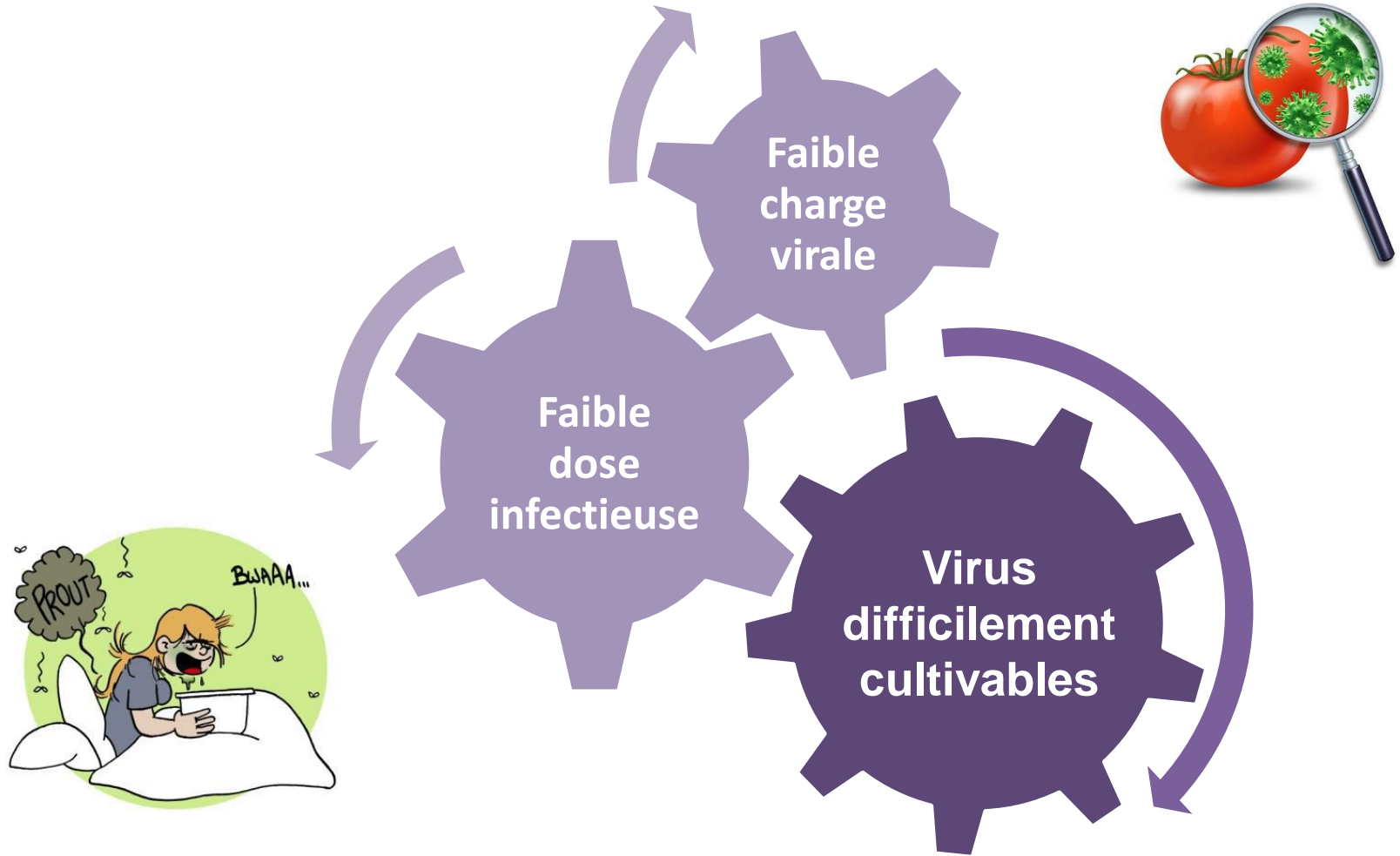
dans les aliments à l'origine de l'infection

Nb de cas / Période d'incubation	Espèce animale	Mode de préparation	Génotype	Éléments indiquant une transmission zoonotique	Pays / Réf
4 cas 6-7 semaines	Cerf	Viande crue (sushi)	3	100% d'homologie entre les séquences des patients et celle du reste de la viande congelée (Titre 10^5 copies /g)	Japon Tei, 2003
1 cas 8-11 semaines	sanglier	-	3	99.95% d'homologie entre les séquences des patients et celle du reste de la viande congelée	Japon Li, 2005



Transmission zoonotique avérée

Problématique pour la détection des virus entériques dans les aliments



Détection des virus dans l'eau et les aliments

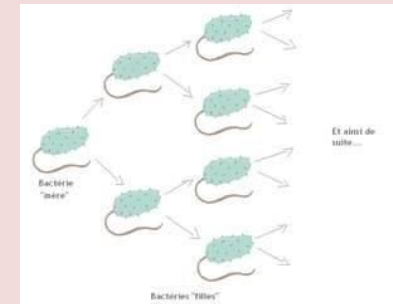
BACTERIES



Aliments



Multiplication



VIRUS

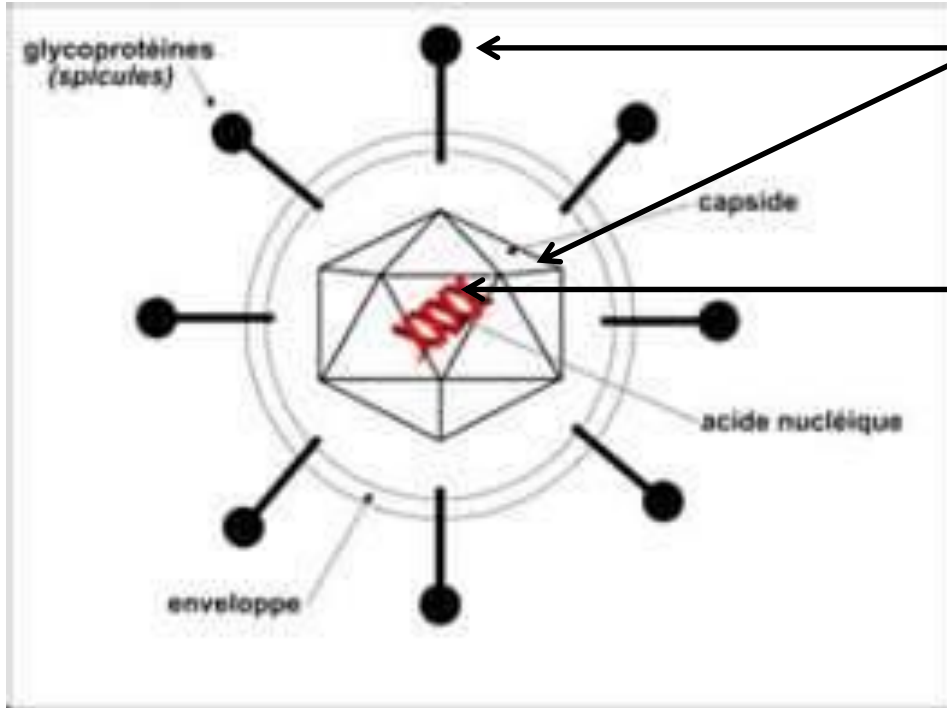


Pas de
Multiplication

Faible charge virale
Détection difficile

Détection des virus

Morphologie: *Microscopie électronique*

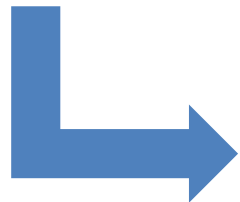


Antigènes de surface

*Méthodes immunologiques
(ELISA, IF...)*

Acides nucléiques

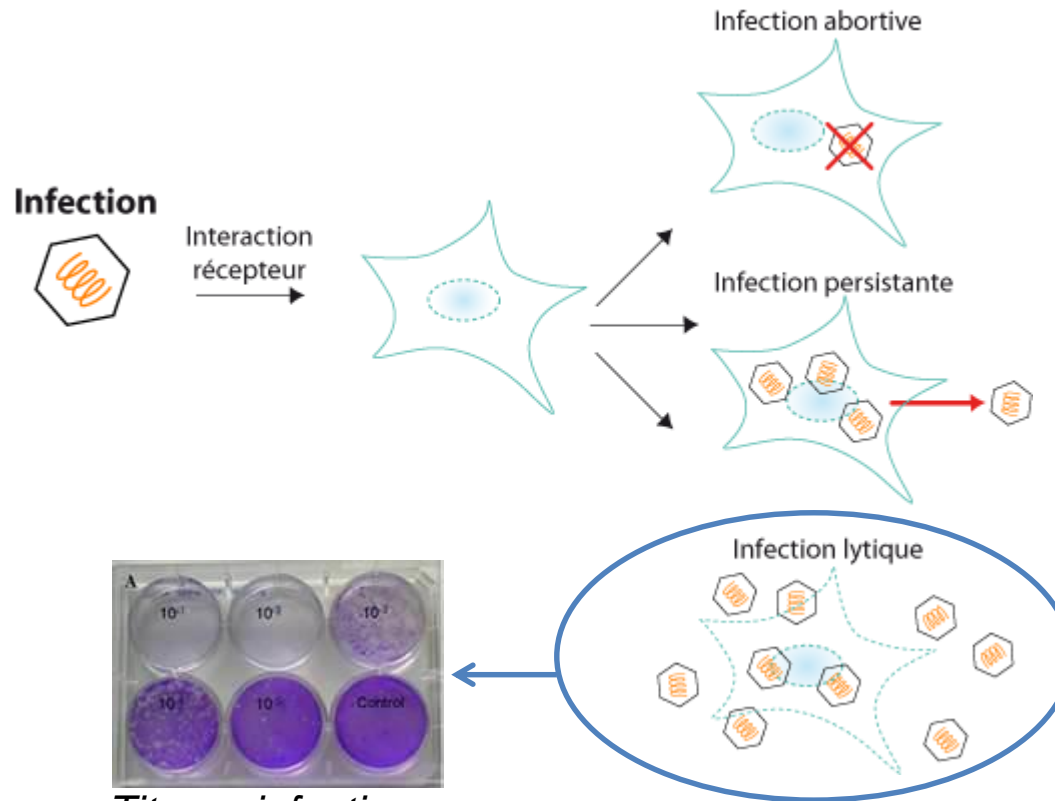
*Méthodes moléculaires
(PCR, RT-PCR, séquençage...)*



Effets biologiques

culture cellulaire, animaux

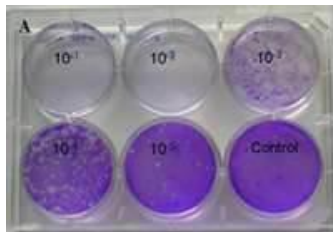
Nécessité d'une cellule hôte pour se multiplier



Cellule hôte susceptible

Cellule hôte susceptible et permissive

Infection productive
Virus cultivables
± Effet CytoPathogène (ECP)



Titrage infectieux par plages de lyse

Virus infectieux dans les aliments

Un vrai challenge...



Méthodes de culture cellulaire : « Gold standard method »

Eluer / Récupérer les virus infectieux
à partir des matrices alimentaires

Mise en culture des virus isolés d'aliments
Infection de modèles *in vitro*
Nécessité: cellules sensibles & permissives

Détection et/ou Quantification
± présence d'ECP (effet cytopathogène)

Norovirus

- **Modèle d'entéroïdes** (*Ettayebi et al., 2016 & 2021*)
Fastidieux / Utilisation en routine ?

HEV

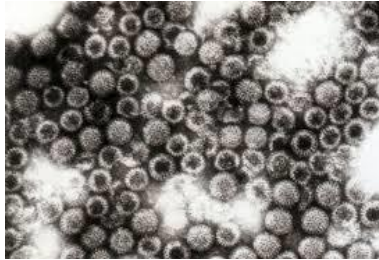
- Plusieurs modèles cellulaires décrits
Cycle \pm long / productif et \emptyset d'ECP
- **Cellules HepaRG** \rightarrow Com. Virginie Doceul

VHA

- Souches sauvages difficilement cultivables
Infection persistante *in vitro* (Réplication lente; infection peu productive ; \emptyset d'ECP)
- **Souches adaptées (HM175/18f)**
Infection lytique (ECP)

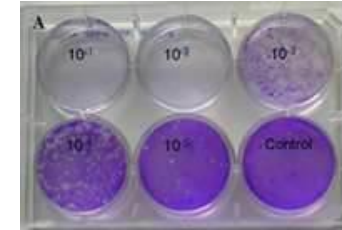
Détection des virus dans les aliments

Microscopie électronique



Virus entier

Isolement par culture cellulaire



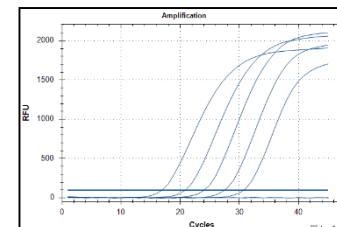
Virus infectieux

Méthode immunologique



Antigènes viraux

Méthodes de biologie moléculaire
(RT-qPCR)



Génomes viraux

Détection d'un des constituants de la particule virale

Détection des virus dans les aliments: Méthodologie

Eau / Aliments



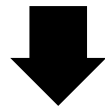
Présence de virus ?



1 Extraction virus



2 Purification
ARN viraux



3 Détection moléculaire des ARN viraux par Reverse
Transcription en temps réel (RT-qPCR)

Choix méthodologique dépendant
de la matrice alimentaire

Matrices alimentaires concernées par le risque de contamination virale

Aliments = vecteurs de transmission virale indirecte

←
Cultures maraîchères
(Fruits, légumes)



↓
Crustacés



↘
Eaux de
consommation



↘
Matrice carnée à
base de foie de
porc cru



Extraction des particules virales

Dépend de la nature et de la composition des aliments (*fruits / végétaux; aliments préparés; crustacés (accumulation / concentration des VE dans les tissus digestifs)*)

**Elution-concentration
Purification
des particules virales**

✓ **Elution dans un Tampon basique** (pH 9-10.5)
(Tris-Glycine extrait bœuf)

✓ **Digestion enzymatique** (pectinase)

✓ **Concentration des particules virales**
Précipitation au PEG; Ultracentrifugation;
Ultrafiltration; Immunocapture...

✓ **Purification des particules virales**
*Enlèvement des débris alimentaires, substances
inhibitrices*

Chloroforme-butanol

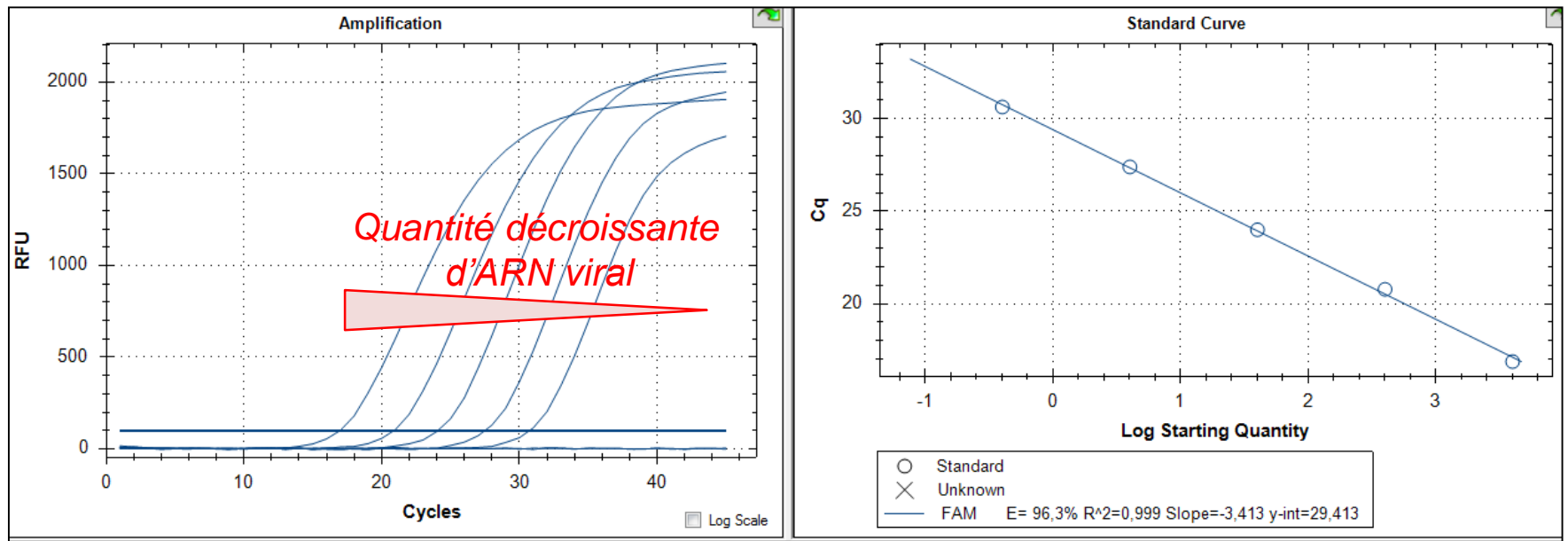
Méthodes d'extraction directe : Traitement protéinase K

Extraction / purification des génomes viraux
Utilisation de l'extracteur automatique d'acides nucléiques
(*EasyMAG, Biomérieux*)

Détection moléculaire des ARN viraux

Reverse Transcription (RT)-PCR en temps réel

- ✓ RT-qPCR en une étape
 - ✓ Utilisation de **sondes « Taqman »**
 - ✓ **Quantification** possible en utilisant une « **gamme standard** »
- => Dilutions sériées du virus « cible » (quantité connue)



Le nb de cycles nécessaires pour que la fluorescence atteigne une valeur seuil est inversement corrélé au nb de molécules cibles à l'origine

CEN/TC275/WG6/TAG4

Working group

43 membres provenant de 15 pays

CEN is ISO equivalent body

TC275 - FOOD ANALYSIS - HORIZONTAL METHODS

WG6 – Microbial Contamination

TAG4 – Detection of viruses in Food

2004

Méthodes standardisées CEN/ISO pour la détection du VHA et des norovirus humains génogroupes I et II dans les matrices à risque :
coquillages bivalves, fruits rouges, végétaux, eaux embouteillées, surfaces alimentaires

2013

Publication de la spécification technique (TS) 15216:

Part 1 (Détection quantitative); Part 2 (Détection qualitative)

2014

Validation inter-laboratoire

*Evaluer leur performance
Fixer des critères d'acceptabilité*

2017 & 2019

Publication dans sa VF

ISO 15216-1 (2017); ISO 15216-2 (2019)

Détection des virus dans l'eau

Eaux (0.3 à 5L)

Méthode ISO/CEN 15216-1

Méthode alternative
(Schultz, 2011; Martin-Latil, 2012)



Concentration des virus par Filtration
(*filtre électropositif*)

Élution en tampon basique
des virus adsorbés sur le filtre
et des virus adsorbés sur la bouteille
(*Eluat ~ 16 mL*)

Concentration de l'éluat viral par
ultrafiltration ($16 \text{ mL} > 500\mu\text{L}$)

Extraction des ARN viraux

Détection par RT-qPCR

Lyse directe des
virus sur le filtre

Détection des virus dans les fruits rouges et végétaux (ISO/CEN 15216-1)

Fruits rouges, végétaux (25g)



- ✓ Éluion en tampon basique des virus adsorbés sur la matrice alimentaire (éluat ~ 40 mL)
- ✓ Clarification par centrifugation



Fruits rouges:
Traitement enzymatique (+ pectinase)

Concentration des virus par précipitation au PEG

Purification des particules virales au chloroforme-butanol

Pour les fruits rouges uniquement

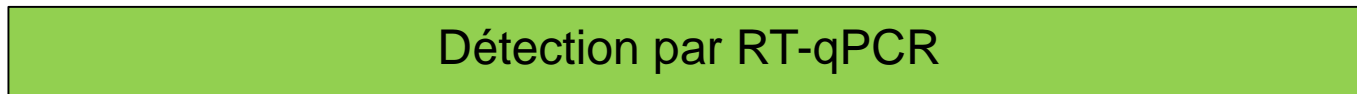
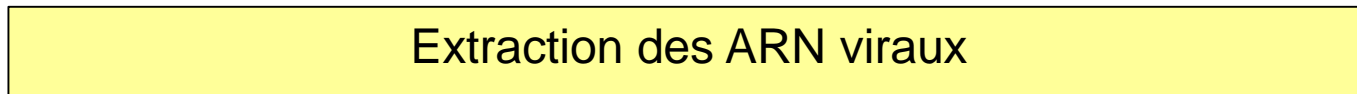
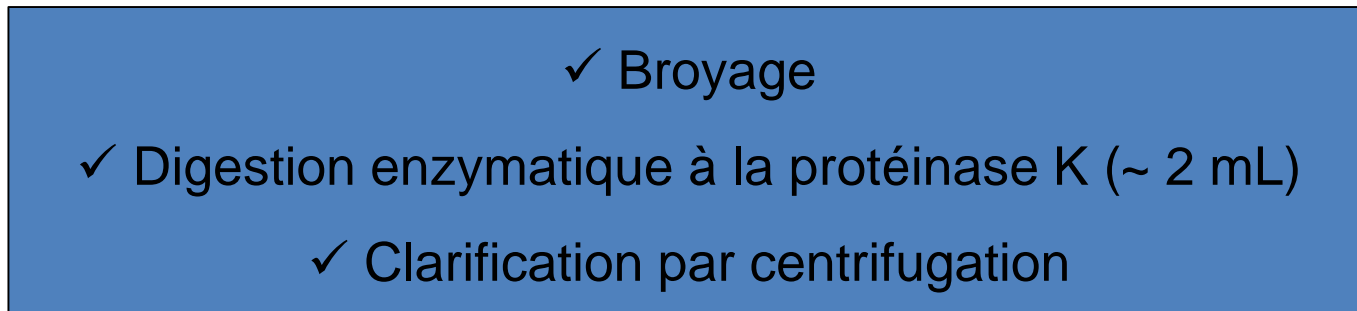
Extraction des ARN viraux

Détection par RT-qPCR

Détection des virus dans les coquillages (ISO/CEN 15216-1)



Disséquer les glandes digestives des coquillages (~ 2g)



ISO 15216 : Extraction / purification des ARN viraux

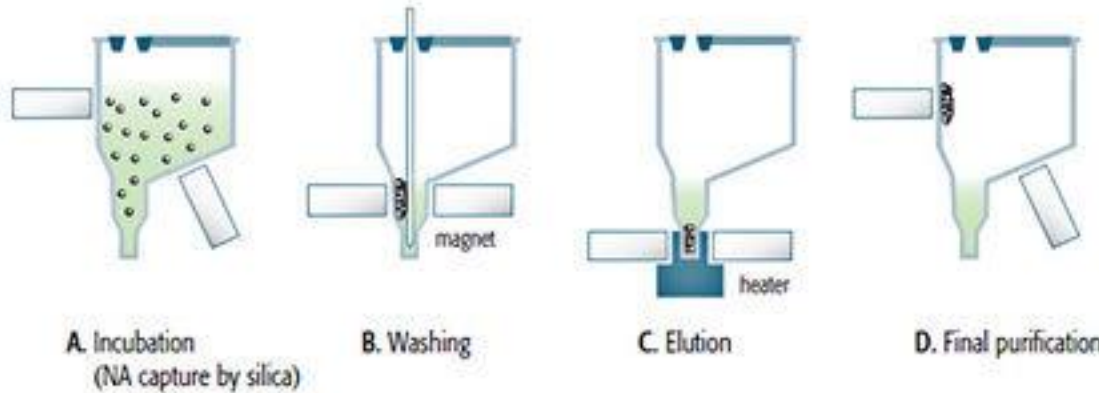
- Méthode basée sur l'utilisation de billes de silice magnétique
Principe de la méthode de Boom (1989)
- **Utilisation de l'extracteur automatique d'acides nucléiques**

(NucliSens® easyMAG™ (Biomérieux))



Extraction Principle

- During incubation of the lysed samples, all the target nucleic acid is captured by magnetic silica particles.
- The NucliSens® easyMAG™ magnetic device attracts all the magnetic silica, enabling the system to purify the nucleic acids through several washing steps.
- The heating step releases the nucleic acids from the silica.
- At the final step, the magnetic silica particles are separated from the eluate by the magnetic device.



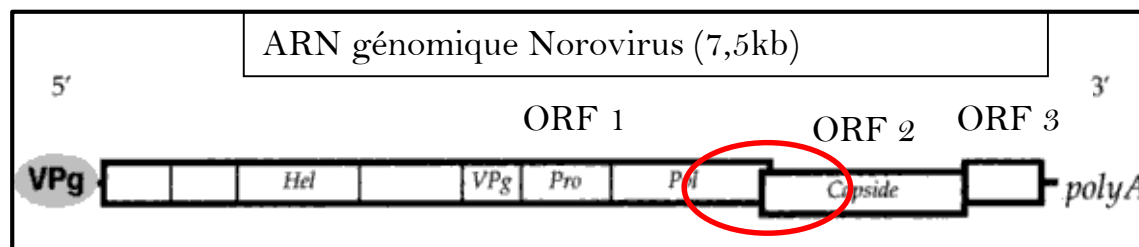
ISO 15216 : Détection des ARN viraux par RT-qPCR

- **RT-qPCR en une étape** ; Technologie Taqman (hydrolyse de sondes)
(*kit RNA Ultrasense® One-step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen)*)
- **Quantification à l'aide d'une « gamme standard »**
(*ADN plasmidique portant la séquence virale cible; quantification par spectrométrie*)

✓ Région ciblée pour la détection des Norovirus (GI et GII)

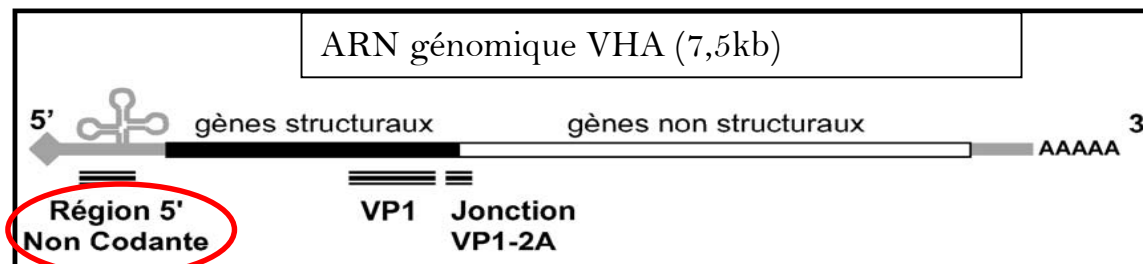
Région ORF1 / ORF2 (capside)

(NoV GI (*Svraka et al, 2007 & da Silva et al, 2007*)- NoV GII (*Kageyama et al, 2003 & Loisy et al, 2005*))



A.Mammette, 2002 Presses universitaires de Lyon (p298).

✓ Région ciblée pour la détection du VHA (5' NCR) (*Costafreda et al, 2006*)



Roque-Afonso A.M., et al. 2006. Le virus de l'hépatite A – Actualités. Elsevier 202–209

ISO 15216: Principe et recommandations

Eau / Aliments



+ MNV-1

Présence de virus ?



Contrôle de processus
(*norovirus murin (MNV-1)*)

Extraction virus

Purification
ARN viraux

Détection
Par RT-qPCR

Contrôle Externe
d'Amplification
(EAC)

Efficacité d'extraction

Inhibition RT-qPCR

ISO recommendations : Process control virus

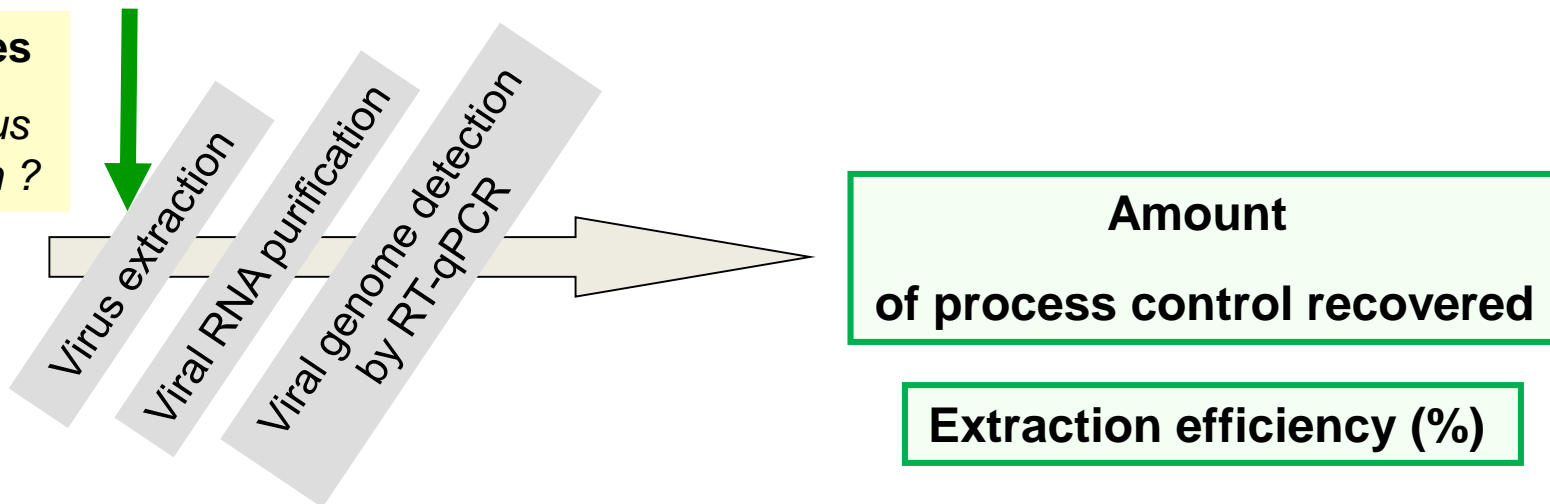
To monitor the losses of target virus during samples processing

e. g. mengovirus, murine norovirus (MNV-1): a **non-pathogenic** virus for humans; **Similar size and environmental persistence to the target pathogenic viruses**; **Culturable non-enveloped positive-sense ssRNA** ; **Unlikely to naturally contaminate the tested food samples.**

A defined amount of
process control virus

Food samples

HAV, norovirus
contamination ?



Analysis is validated if extraction efficiency is higher than 1%

Efficacité des méthodes ISO 15216

Contamination artificielle

Quantités connues

Virus pathogène (hNoV et VHA)
± virus contrôle de processus



Quantité détectée
Efficacité (%)

Laitues
(1,5-18,2%)

Fraises framboises
(1-26%)

Eau embouteillée
(38-63%)

Efficacité dépendante des matrices alimentaires

- Elution des virus
- Détection par RT-qPCR

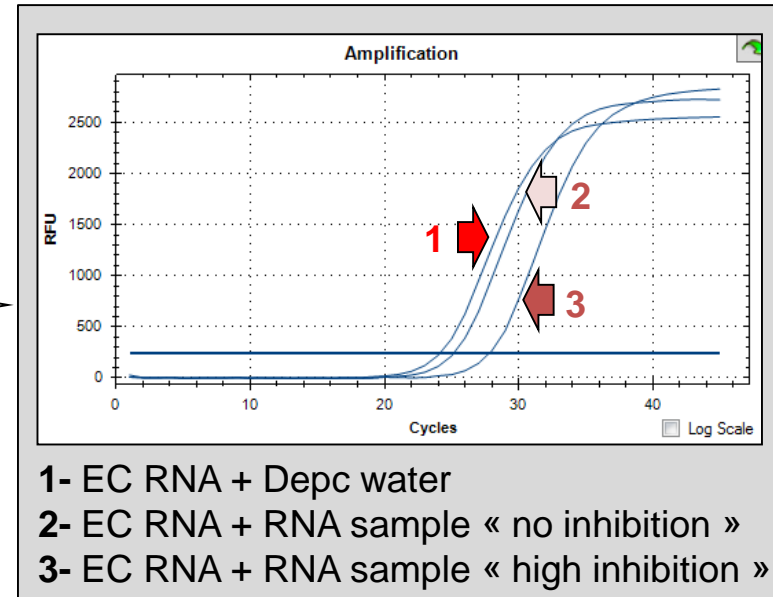
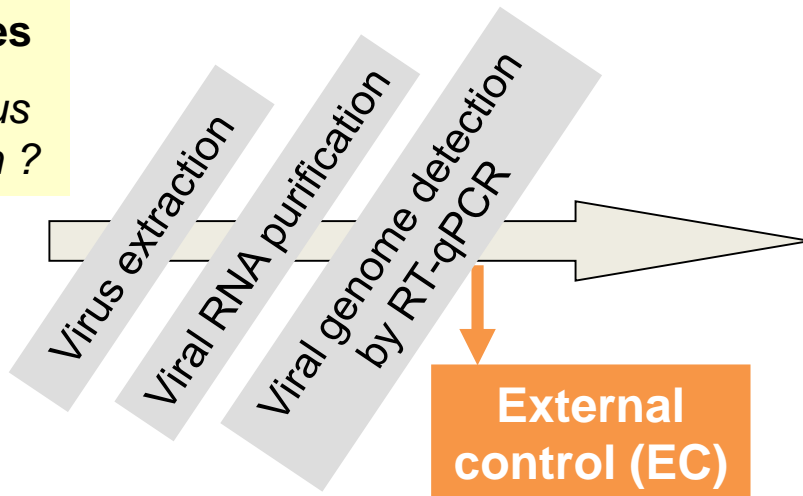
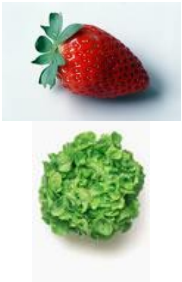
(Hennechart-Collette et al., 2015; Perrin et al., 2015; Fraise et al., 2017)

ISO recommendations : External control RNA

To monitor the inhibition of viral target amplification by real-time RT-PCR assay
e.g. RNA synthesized by *in-vitro* transcription from a plasmid carrying a copy of the target gene
EC RNA is added in a defined amount to RNA extracts before RT-qPCR assay

Food samples

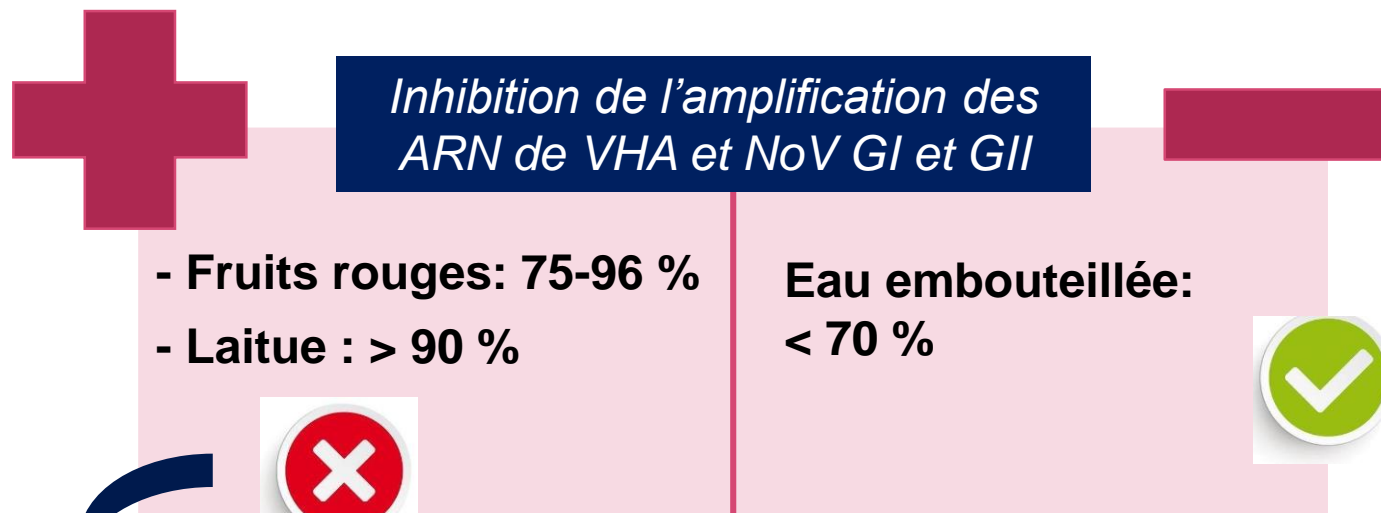
HAV, norovirus
contamination ?



Analysis is validated if RT-PCR inhibition is lower than 75%

Méthodes ISO 15216 & Inhibition RT-qPCR (%)

- Présence de molécules inhibitrices des réactions de RT-qPCR dans les extraits d'ARN provenant des aliments
- **Mesure du % inhibition RT-qPCR:** Contrôle externe d'amplification (EAC)



Importance d'analyser les extraits **d'ARN dilués**
MAIS pas suffisant (Laitue: 30 à 95%)



(Coudray-Meunier et al., 2015; Fraisse et al., 2017; Hennechart-Collette et al., 2017)

Applications de la norme ISO 15216

Enquêtes épidémiologiques

Surveillance / Autocontrôles



Rechercher la présence de génomes viraux



DéTECTÉS



Forte évidence que
l'aliment soit à
l'origine de la TIAC

Cas confirmé

Non détectés

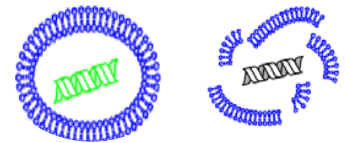
Contrôles

- Validés: Résultat « non détecté »
- Au moins un des 2 contrôles non validés: Résultat « inexploitable »



**Amélioration des méthodes de
détection**

DéTECTÉS



**Risque
infectieux**



Absence de réglementation pour l'analyse virologique des aliments

Aucun critère spécifique des virus entériques n'est en vigueur à l'heure actuelle au niveau national ou européen.

Le paquet hygiène mentionne néanmoins, au niveau du considérant 27 du règlement 2073/2005 « *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* ».

- Implication des **coquillages** dans des épidémies connue depuis plus d'un siècle: **réglementation européenne** mise en place pour protéger le consommateur

- ❖ **Classement sanitaire des zones de production**

- ❖ Critères microbiologiques permettant la mise sur le marché des coquillages

Critère de pollution par la flore fécale : indicateur d'hygiène

Détection & numération d'*Escherichia coli*

Suivi régulier de la contamination bactérienne des zones exploitées

MAIS présence de *E. coli* pas corrélée avec la présence de virus entériques et inversement

Nécessité de faire évoluer les méthodes de détection des virus dans les aliments

NoV
VHA

Matrices alimentaires
ciblées (ISO/CEN)

Dangers émergents
HEV

Matrices impliquées dans
les TIAC plus diversifiées

Autres dangers

- Améliorer les performances analytiques
Couples « dangers viraux – aliments » : ISO + Nouveaux



Apport des nouvelles technologies
(*digital PCR, RT-qPCR haut débit, NGS*)

Foodborne outbreaks & virological analysis: Anses (2012 – 2017)

- Trace-back investigations → Food suspected to be at the origin of viral gastroenteritis or hepatitis (*e.g. symptoms, incubation period*)
- Request of the official authorities, DGAL¹ : 56 viral foodborne outbreaks in collective catering (5 hepatitis, 51 NoV) → 246 samples

Food category	Foodstuffs	% total analyzed
Composite foods	Sandwiches, pizzas, hamburgers, quiche, pies, beef and potato bakes, paella, potato pancake dishes, omelets, salt crepes	34%
Vegetable foods	Vegetables, fruits (raw, salad, cooked)	20%
Food of animal origin	Meat, fish, seafood cooked, mixed	17%
Starchy foods	Pate, rice and corn	9%
Waters	Tap water, bottled water or spring water	7%
Milk products	cheese, yogurt, ice, smoothie, cream	2%
Others	Meat in sauce, vegetables in sauce or fish in sauce, cake, baked items	11%

Hennechart-Collette C, et al., 2020

Detection of viral genome in 33 samples (*out of 246*) suspected to be involved in 18 foodborne outbreaks (*out of 56*)

Food category	RNA virus detected (%)
Composite foods	18%
Vegetable foods	47%
Food of animal origin	8%
Starchy foods	11%
Waters	11%
Milk products	5%
Others	0%

Table 5

Genomic levels of NoV and hepatitis quantified by RT-qPCR in contaminated samples.

Level of virus detection per g or per mL	NoV GI	NoV GII	HAV	HEV
< 10 ² genome copies	7	5	-	2
10 ² - < 10 ³ genome copies	4	9	-	-
10 ³ - < 10 ⁴ genome copies	1	2	1	-
10 ⁴ - < 10 ⁵ genome copies	1	3	-	-
10 ⁵ - < 10 ⁶ genome copies	1	1	-	-
≥ 10 ⁶ genome copies	0	1	-	-

Among positive samples:
Almost **50%** contaminated with
viral load < **10³ cg / g or ml**

Methods used had to be improved regarding the various food involved

No. Samples with extraction of **process control > 1%**

Food category	No. (%)
Composite foods	38/83 (45%)
Vegetable foods	24/48 (50%)
Food of animal origin	31/42 (73%)
Starchy foods	16/23 (69%)
Waters	17/18 (94%)
Milk products	5/6 (83%)
Others	11/28 (39%)
Total	142/246 (57%)



Results no validated 43%

Vegetables

Fruits

Water

ISO 15216 methods

Composite foods

ISO 15216 adapted methods

Foodstuffs of animal origin

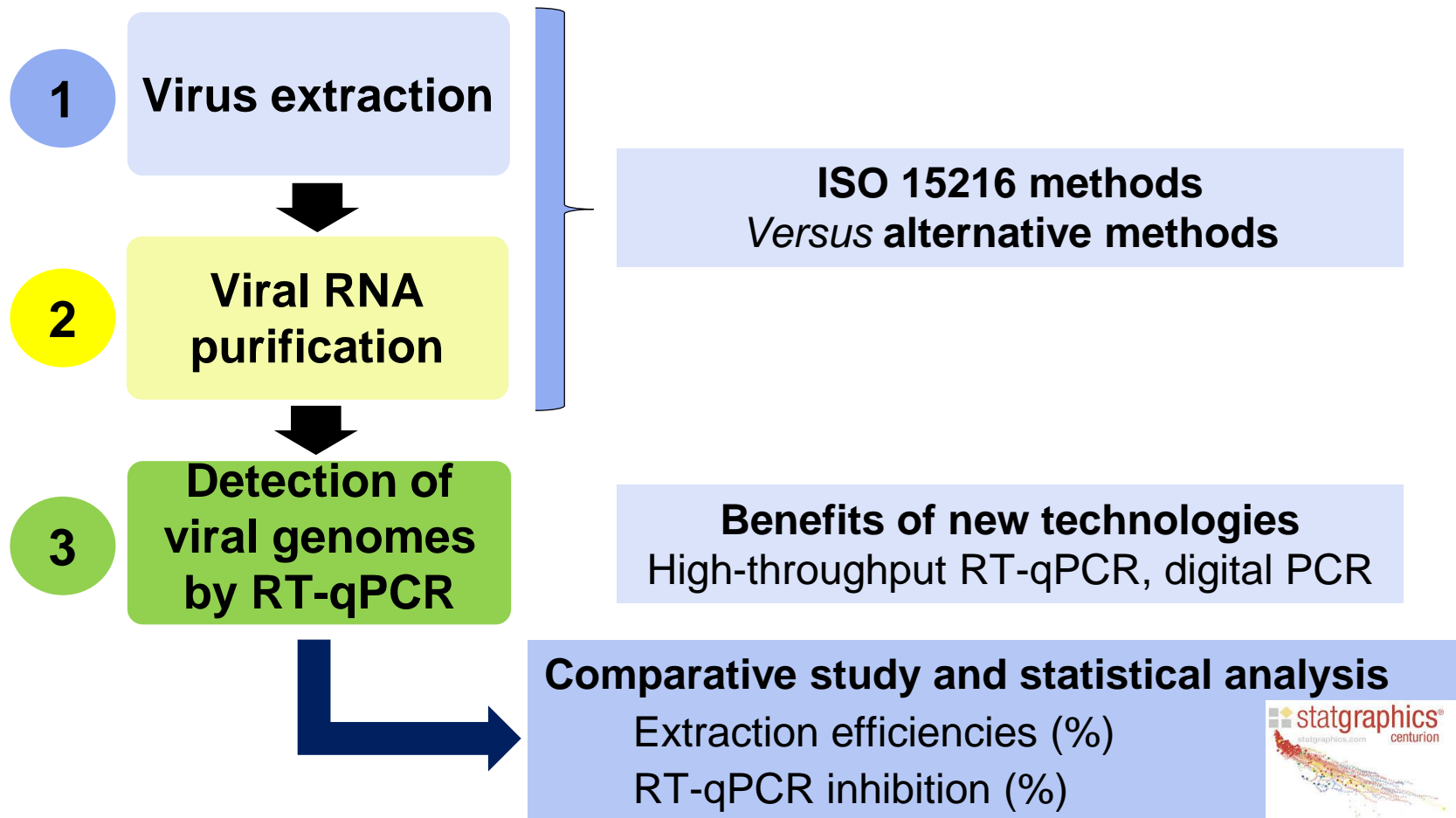
Milk products

In-house developed methods

Scheme to develop & optimize methods

Experiments carried out on artificially contaminated food

- **Pathogenic virus** (NoV GI et GII (clarified stools supernatant); HAV (adapted strain HM175/18f, cell culture supernatants); HEV (pig manure supernatants (HEV-3))
- **Control process virus:** MNV-1 et mengovirus (cell culture supernatants)



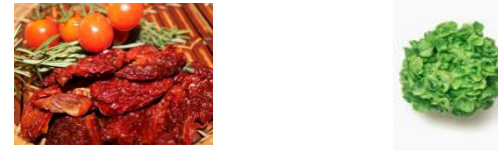
Optimization methods & food out off ISO

Detection of **hNoV** in milk and cottage cheese (2,5 g)



Direct extraction method
(*Proteinase K* (ISO shellfish))

Detection of **HAV** in semi-dried tomatoes and lettuce (25 g)



Method based on elution - concentration - purification of viral particles



UltraC
(PEG ± UltraC)

ISO 15216
(PEG ± chloroform-butanol)

Filtration
(F)

Virus extraction efficiencies (%)

	 Milk	 Yoghourt
NoV GI	70,15	76,38
NoV GII	57,14	74,75

	UltraC	ISO		ISO	F
HAV	14,82	2,01 –	HAV	0,07 –	0,67 –
	–	50,92		8,76	6,29

(UltraC: ultra centrifugation; PEG: polyethylen Glycol)

Virus recoveries depend on food type and extraction method used

Martin-Latil *et al.*, 2012; Coudray *et al.*, 2013 ;Hennechart-Collette *et al.*, 2017

Detection of viral genomes by RT-qPCR: advantages vs drawbacks

Sensitivity
Specificity
Rapidity



Sensitive
to PCR inhibitors

False negative results

When **digital PCR** was developed, some food virology labs assessed this approach :

- Quantify viral genomes recovered from food matrices without the need of standard curve (**absolute quantification**)
- Measure **its sensitivity towards PCR inhibitors**

Couples « dangers viraux – aliments » décrits dans l'ISO 15216

Préparer



Distribuer /
Partitionner

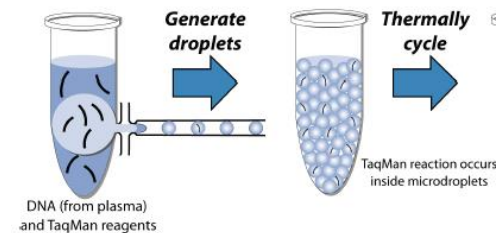


Amplifier (RT-PCR)

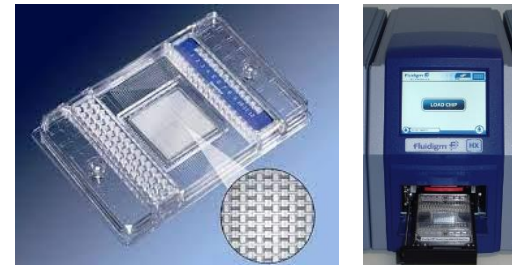


Détecter & Quantifier

❖ Droplet Digital RT-qPCR



❖ Microfluidic Digital RT-qPCR



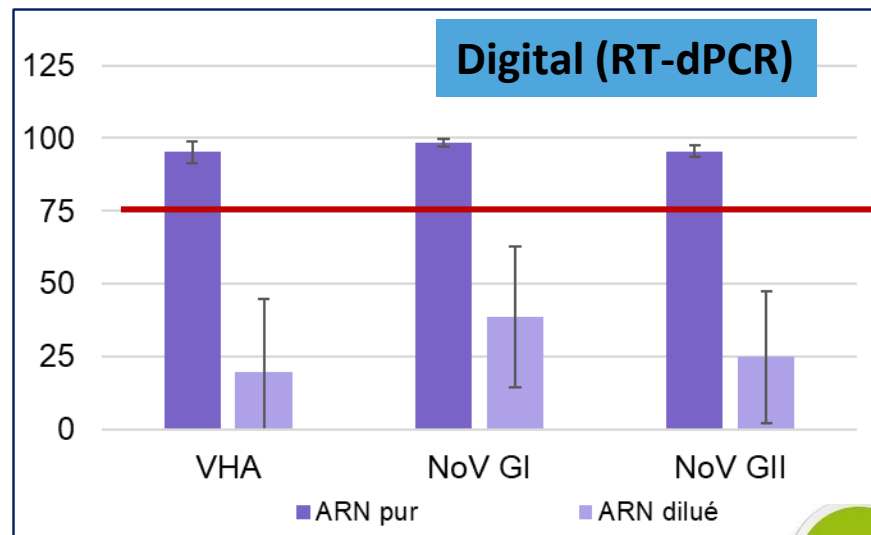
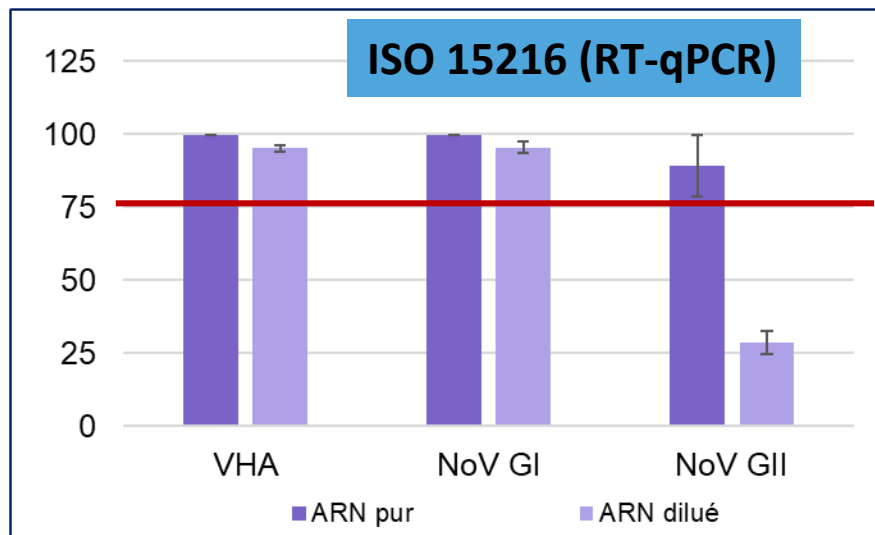
Apport de la digital RT-PCR (1)



Couples « dangers viraux – aliments » décrits dans l'ISO 15216

Système en microfluidique (BioMark, Fluidigm) (Coudray-Meunier et al., 2015)

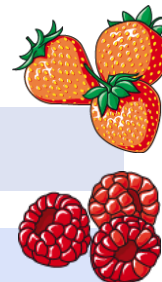
Inhibition RT-qPCR (%) calculée pour chaque cible virale (EAC)



— Inhibition < 75% (ISO 15216)

Digital RT-dPCR : Validation de tous les échantillons (ARN dilué, inhibition < 65%)





Couples « dangers viraux – aliments » décrits dans l'ISO 15216

Système en microfluidique (BioMark, Fluidigm) (*Fraisse et al., 2017*)

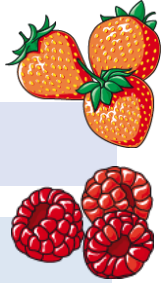
Inhibition RT-qPCR (%) calculée pour chaque cible virale (EAC)

Nb d'analyses validées (Inhibition < 75% (ISO))	RT-qPCR		RT-dPCR	
	-	+	-	+
<i>Dilution échantillons d'ARN</i>	-	+	-	+
Framboises	2/9	9/9	8/9	9/9
Fraises	0/9	9/9	6/9	9/9
Mélange de fruits rouges	2/9	9/9	9/9	9/9



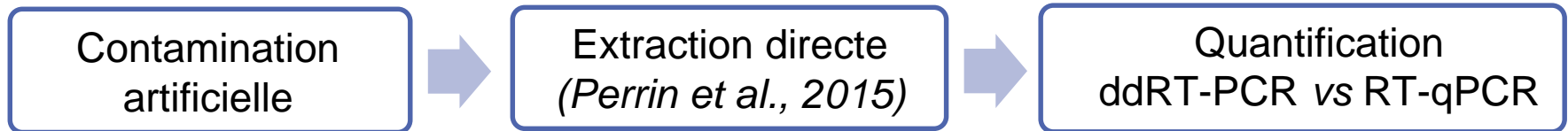
Digital RT-PCR: Validation d'un plus grand nombre d'analyses

(*Fraisse et al., 2017. Int J Food Microbiol.*)



Couples « dangers viraux – aliments » décrits dans l'ISO 15216

Etude sur les **fruits rouges** (\pm congelés): framboises, fraises et myrtilles



Dilution of RNA Inhibitor tolerance test on unfiltered RNA from berries

Sample No.	RT-qPCR (Ct)			RT-ddPCR (copy)		
	1	2	3	1	2	3
1:1	N	N	N	2560	3340	3180
1:2	N	N	34.2	1280	1980	1880
1:4	N	N	35.0	688	888	1008
	32.6	N	33.6			
1:8	33.1	N	32.8	312	444	552
	31.4	34.2	32.4			
1:16	31.7	33.5	32.1	164	206	238
	33.0	32.5	32.5			
	33.3	32.7	33.0			

RT-qPCR
Diluer les
échantillons
d'ARN

N: non détecté



RT-ddPCR
Moins sensible aux inhibiteurs PCR

(Sun B, et al. 2019. J Virol Methods.)

Virologie alimentaire & Caractérisation moléculaire (1)

Détection

Caractérisation
moléculaire

- Confirmer l'origine alimentaire des cas de TIAC
- Identifier l'origine de la contamination des aliments



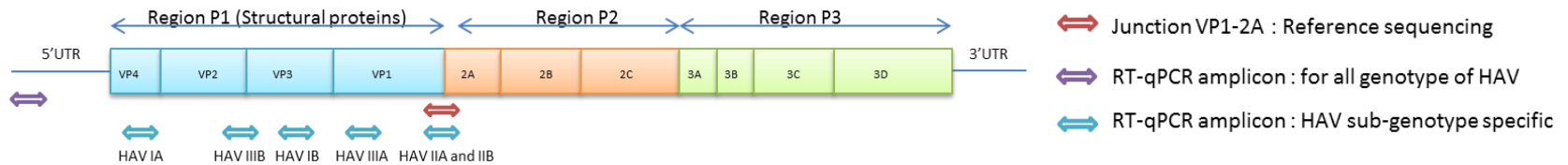
Séquençage (SANGER)

- Faible charge virale dans les aliments contaminés
- Présence d'inhibiteurs RT-PCR

Ex. 34% échantillons végétaux NoV+ (18/52) séquencé (Baert et al., 2011)

Sub-genotyping of HAV

Based on **six subtypes specific RT-qPCR assays**



Implementation of the HAV typing assay



Foodborne outbreak investigation : red fruits tartlet, frozen fruits HAV+
 → Classical sequencing approach failed

Sub-genotyping assays could confirm that food samples were contaminated with **HAV IA**, the same sub-genotype found in clinical sample

Metagenomic approach, Next Generation sequencing (NGS)

→ **Foodborne outbreak, Germany 2012: Frozen strawberries NoV+**
(NGS, ILLUMINA HiSeq)

Table 1

Most abundant sequences assigned to specific species as detected by NGS on the strawberry outbreak sample. The five most abundant species per superkingdom and their families, the respective read counts and highest identities with sequences present in the NCBI database are shown. The main characteristics of the detected species are summarized in the Details row.

Organism	Family (genome type)	Species	counts	Sequence Identity (%)	Details
Eukaryote	Rosaceae	Sanguisorba sitchensis	15346144	89.8–100	Flower
	Hydrangeaceae	Jamesia americana	2486369	97.47	Californian shrubs
	Rosaceae	Fragaria vesca	2355716	68.0–100	Wild strawberry
	Saccharomycetaceae	Saccharomyces cerevisiae	892091	70.0–90.0	Yeast
	Rhizopodaceae	Rhizopus stolonifer	595163	84.91–100	Postharvest fungal pathogen
Bacteria	Erwiniaceae	Tatumella citrea	3119912	71.43–100	Causing pink disease in pineapple
	Enterobacteriaceae	Salmonella enterica	221477	70.32–100	Enteric pathogen or non-pathogenic environmental strains
	Enterobacteriaceae	Kosakonia oryzae	107219	74.16–90.39	Associated with rice, nitrogen fixation
	Rhodanobacteraceae	Frateuria aurantia	17074	74.29–100	Environmental germ
	Rhodanobacteraceae	uncultured Frateuria sp	10321	97.79–100	Environmental germ
Archaea	Methanobacteriaceae	Methanobacterium paludis	6	75.51–84.31	Important environmental germ in peatlands
	Unknown	uncultured archaeon	6	81.97–93.33	Environmental germ
	Unknown	Nanohaloarchaea archaeon SG9	4	90.0–92.11	Environmental germ
	Methanosarcinaceae	Methanosarcina sp WWM596	3	77.45–83.33	Methane producing environment
	Methanobacteriaceae	Methanobrevibacter ruminantium	3	88.37–90.48	Methane producing environment
Viruses	Alphaflexiviridae (+ ssRNA)	Strawberry mild yellow edge virus	1208	83.5–95.15	Causes severe losses in cultivated strawberries
	Caulimoviridae (dsDNA-RT)	Strawberry vein banding virus	292	97.83–100	Might cause losses in cultivated strawberries
	Myoviridae (dsDNA)	Escherichia phage ESCO13	218	68.97–86.0	Bacteriophage infecting <i>E. coli</i>
	Podoviridae (dsDNA)	Pantoea virus Limelight	217	68.46–91.49	Lytic bacteriophage infecting <i>Pantoea</i>
	Myoviridae (dsDNA)	Enterobacteria phage ECGD1	183	68.0–97.14	Bacteriophage

More than
28 millions
reads

Table 2

Mammalian virus sequence reads detected by NGS on the strawberry outbreak sample and highest identities with sequences present in the NCBI database are shown. T

Family (genome type)	Species	Counts
<i>Adenoviridae</i> (dsDNA)	Bat mastadenovirus G	1
<i>Astroviridae</i> (+ ssRNA)	Mamastrovirus 3	1
<i>Caliciviridae</i> (+ ssRNA)	Norwalk virus	2
<i>Flaviviridae</i> (+ ssRNA)	Dengue virus	1
<i>Hepadnaviridae</i> (dsDNA-RT)	Hepatitis B virus	1
<i>Herpesviridae</i> (dsDNA)	Elephantid betaherpesvirus 1	1
<i>Papillomaviridae</i> (dsDNA)	Alphapapillomavirus 9	1
<i>Poxviridae</i> (dsDNA)	Sea otter poxvirus	1
<i>Retroviridae</i> (+ ssRNA-RT)	Human immunodeficiency virus 1	1
	Porcine type C oncovirus	1

→ Only 11 reads showed significant sequence similarities to mammalian viruses; 2 reads with similarities to NoV

Low amount NoV RNA / whole genomes → Sensitivity of NGS ?

Nouveaux couples

« Danger viral – Matrice alimentaire »

Cas autochtones d'hépatite virale E survenus en France entre **2007 et 2009** en régions PACA et Corse (9 cas isolés, 2 épisodes de cas groupés (TIAC))

Saucisses à base de foie cru de porc

Avis de l'AFSSA n°2009-SA-0101 et n°2009-SA-0146 (avril 2009):

- *Risque pour le consommateur de consommer des saucisses de foie de porc crues (figatelli)*
- *Informers le consommateur (mention sur l'étiquette « cuire à cœur »)*

Plan de surveillance en 2011-2012 (DGAL/SDSSA/N2010-8330)

2010-SA-0171 Capacités analytiques ; 2010-SA-0170 Plan d'échantillonnage

saucisses de foie



foies



Plan de surveillance en 2011-2012 (DGAL/SDSSA/N2010-8330)

UMR 1161 Virologie (Laboratoire de Santé Animale, Anses, ENVA, INRAE)

Méthode d'extraction directe du HEV

Prise d'essai: 20 g

Homogénéisation dans 25 ml de PBS : Blender

Extraction / purification des ARN: RNeasy Lipid Tissue Midi kit (Qiagen)

Matrices	Nb échantillons analysés (396)	Prévalence (95% IC)
Figatelli et fitone	140	0,3 (0,23-0,38)
Foie salé séché	30	0,03 (0-0,10)
Quenelle	55	0,25 (0,15-0,37)
Saucisses de foie	169	0,29 (0,22-0,36)

Détection du HEV dans 3 à 30% des aliments

(Pavio et al., 2014)

Unité des Virus Entériques (LSAI, Anses)

Méthode basée sur l'éluion – concentration → Ac N → RT-qPCR

■ Criblage de 70 échantillons pour recherche du HEV

Matrices	No. of positive samples	No. of negative samples	Total
Figatelli	12	21	33
Pig liver sausages	10	17	27
Dried salted liver	0	5	5
Quenelles	0	5	5

~ 1/3 testés positifs pour le génome du HEV

■ Charge virale des échantillons détectés HEV+

Ct values	HEV genome copies / 3 g	No. of Figatelli	No. of Pig liver Sausages
< 30	> 2E+05	3	1
30 - 36	1.6E+03 - 2E+05	7	2
36.1 - 40	1.2E+02 – 1.6E+03	2	7

Charge virale
> 10³ GE/3 g
60% échantillons

(Martin-Latil et al., 2014)

Quantification du HEV par digital RT-PCR (1)

Echantillons collectés dans le cadre du plan de surveillance



Figatelli: 6 HEV+; 1 HEV “non détecté”

Saucisses de foie de porc: 6 HEV+; 1 HEV “non détecté”

Méthode publiée

- Elution – Concentration
- Extraction ARN viraux



Détection par RT-qPCR (CFX96, Biorad)

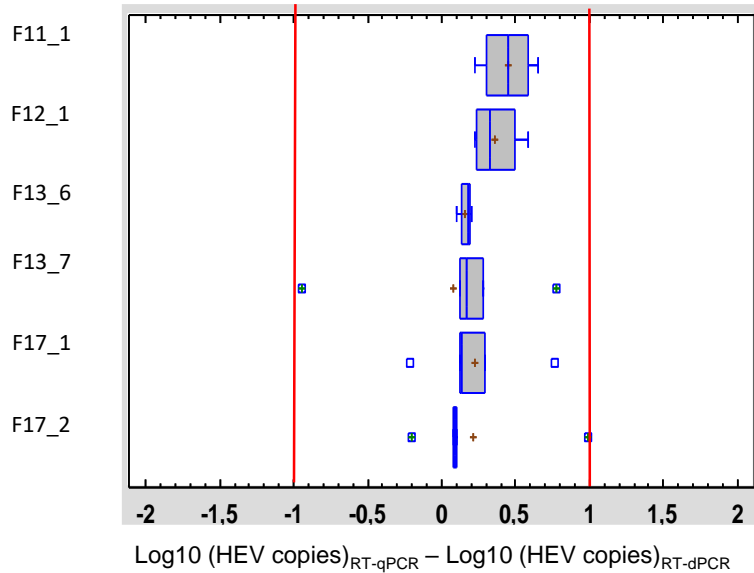
- Efficacité d'extraction MNV
- Inhibition PCR (EAC)

Détection par digital RT-dPCR (BioMark, Fluidigm)

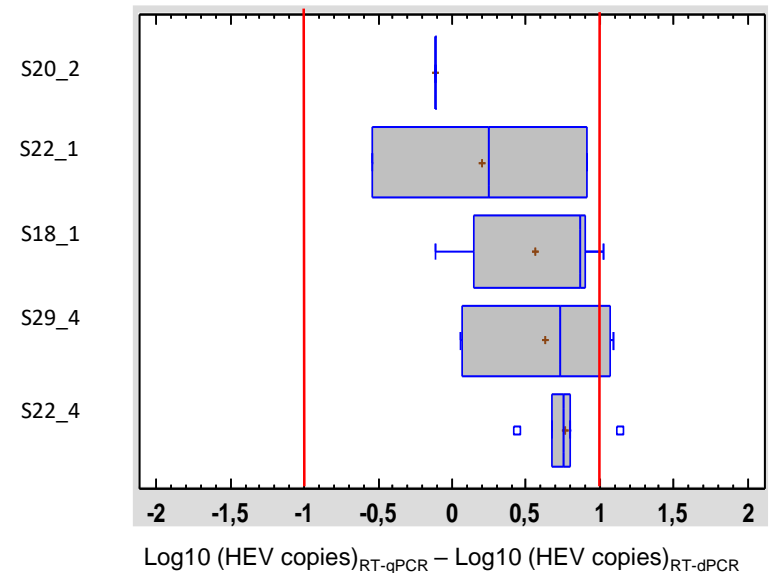
Comparaison Quantification du HEV

Comparaison RT-qPCR versus RT-dPCR

Figatelli



Saucisses de foie



- Détection du HEV dans 6 figatelli et 5 saucisses de foie
- Différence de quantification du HEV n'excède pas 1 log₁₀



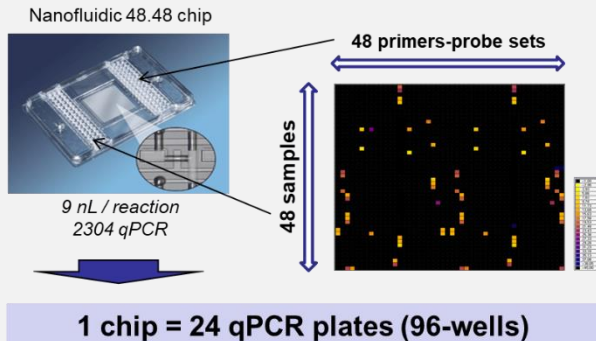
**Avantage de la Digital RT-dPCR: Ø gamme standard
Harmonisation des données quantitatives**

(Martin-Latil et al., 2016)

Grande diversité des virus transmissibles par les aliments

■ Apport RT-qPCR haut-débit (Coudray-Meunier et al., 2016)

Puce micro-fluidique, technologie de PCR Array (BioMark HD™ (Fluidigm))



- Détection de **21 virus d'intérêt alimentaire**
- 2 virus « contrôles de processus »



Criblage (Augmenter nb de cibles virales (96.96 chip))

Sensibilité: PCR array < qPCR = dPCR

Détection des génomes viraux



**Risque
infectieux**

Etudes de prévalence : NoV et VHA dans les aliments

Tableau 1. Prévalence virale dans les coquillages et les végétaux pour des échantillonnages représentatifs entre 2007 et 2012 en Europe

Caractéristiques de l'échantillonnage					Virus entériques	Nombre d'échantillons		Prévalence (%)	Références
Aliment	Espèce / variété	Lieu de prélèvement	Origine	Date		Analysés	Positifs		
Coquillages	Huîtres	Marché, supermarché	France	2010-2011	Norovirus GI et GII	387	35	9,0	Schaeffer et al., 2013
Coquillages	Moules	Zone de production, produits importés	Espagne, Grèce, Finlande	2010	Norovirus GI et GII, VHA	153	26	17,0	Diez-Valcarce et al., 2012
Coquillages	Huîtres, moules, palourdes	Zone de production	Italie	2008-2012	Norovirus GI et GII	336	173	51,5	Suffredini et al., 2014
Coquillages	Moules, palourdes, coques	Zone de production	Espagne	2011-2012	Norovirus GI et GII, VHA	168	93	55,4	Polo et al., 2015
Coquillages	Huîtres, moules, couteaux, palourdes, amandes de mer	Zone de production, restauration, détaillant	Italie	2007-2010	Norovirus GI et GII	163	94	57,7	Pepe et al., 2012
Coquillages	Huîtres	Zone de production	Grande-Bretagne	2007-2010	Norovirus GI et GII	873	625	71,6	Lowther et al., 2012
Coquillages	Moules, palourdes, praires	Marché, supermarché	Espagne	2009-2010	VHA	329	28	8,5	Moreno Roldan et al., 2013
Salades	Laitues (matières premières et produits de 4 ^e gamme)	Producteurs industriels	Espagne	2010-2012	Norovirus GI et GII	120	6	5,0	Perez-Rodriguez et al., 2014
Salades	Laitues, chicorées, mâche (matières premières)	Producteurs industriels	Espagne, Italie, Belgique, France, Tunisie	2011	Norovirus GI et GII	210	26	12,4	Loutreul et al., 2014
Salades	Laitues, roquette, radicchio	Supermarché	Canada	2009-2010	Norovirus GI et GII	641	181	28,2	Baert et al., 2011
Fruits rouges	Framboises, fraises	Industries alimentaires	Non précisé	2009-2010	Norovirus GI et GII	150	10	6,7	Baert et al., 2011
Fruits rouges	Framboises, fraises, mûres (produits congelés)	Producteurs industriels	Serbie, Chili, Bulgarie, Pologne, France, Espagne, Maroc, Turquie	2009-2010	Norovirus GI et GII	200	32	16,0	Loutreul et al., 2014

Coquillages:
8,5% - 71,6%

Végétaux:
5% - 28,2%


Revue publiée en 2019: Prévalence des norovirus

- Mollusques bivalves
- Fruits et végétaux



Review

Final Consumer Options to Control and Prevent Foodborne Norovirus Infections

Susana Guix ^{1,2,*} , Rosa M. Pintó ^{1,2} and Albert Bosch ^{1,2}

doi: [10.3390/v11040333](https://doi.org/10.3390/v11040333).

Prévalence du HEV

dans les matrices alimentaires d'origine animale

❖ Foie de porc (*abattoirs, épicerie*)

Pays	Nb échantillons HEV+ / Nb total	Prévalence (%)	Référence
France	29 / 1034	2,8	<i>Feurer et al, 2018</i>
Canada	25 / 283	8,8	<i>Wilhelm et al., 2014</i>
Angleterre	1 / 40	3	<i>Berto et al., 2012</i>
Italie	2 / 33	6	<i>Di Bartolo et al., 2012</i>
Allemagne	8 / 200	4	<i>Wenzel et al., 2011</i>
USA	14 / 127	11	<i>Feagins et al., 2007</i>
Pays-Bas	4 / 62	6,5	<i>Bouwknegt et al., 2007</i>
Japon	7 / 363	2	<i>Yasaki et al., 2003</i>

Entre 2 à 11%

Prévalence du HEV

dans les matrices alimentaires d'origine animale

❖ Saucisses (viande de porc, foie de porc), pâtés (foie de porc)

Pays	Nb échantillons HEV+ / Nb total	Prévalence (%)	Référence
Suisse	10 / 90 (<i>S foie et mortadella</i>)	11,1	<i>Moor et al., 2018</i>
	12 / 102 (<i>mortadella</i>)	11,8	<i>Giannini et al, 2018</i>
Canada	36 / 76 (<i>pâté</i>)	36	<i>Mykytczuk et al., 2017</i>
Brésil	18 / 50 (<i>S et pâté</i>)	36	<i>Heldt et al. 2016</i>
Allemagne	25 / 120	21	<i>Szabo et al., 2015</i>
Italie	10 / 45 (<i>S crues et séchées</i>)	22	<i>Di Bartolo et al., 2015</i>
Espagne	6 / 93	6	<i>Di Bartolo et al., 2012</i>

Entre 6 à 36%

❖ Saucisses (viande de gibier)

Prévalence de 6% (4 / 63 saucisses de viande de sangliers sauvages) (*Montone et al., 2019*)

Autres types d'aliments contaminés par le HEV (1)



Contamination fécale de l'eau

❖ Eaux

Eaux usées urbaines, Espagne, **28,1 à 43,5%** (*Rodriguez-Manzano et al., 2016*)

Eaux usées et eau de rivière, Italie, **5%** (*Iaconelli et al., 2015*)

Eau de mer, Sud Italie, **12,8%** (*La Rosa et al., 2018*)

En France (Centre), entre 2104 et 2015 (*Bisseux et al., 2018*)

Station d'épuration (Clermont-Ferrand), eaux usées urbaines

Influent : 10 / 27 (**37%**)
Effluent: 0 / 26

Contamination fécale des aliments

❖ Fruits de mer

Espagne: **24,4%** (41 / 168) (*Rivadulla et al., 2019*)

Ecosse: **2,9%** (9 / 310) (*O'Hara et al. 2018*)

France: 0 / 290

MAIS étude de **Bioaccumulation** (*Grodski et al., 2014*)



❖ Fruits et Végétaux

Transmission pas encore démontrée

MAIS présence HEV dans eaux d'irrigation, fruits à baies, salades

- Salades composées: **0,6%** (6 / 911) (*Terio et al., 2017*)
- Fraises: **1,6%** (1 / 60) (*Brassard et al., 2009*)
- Framboises: **2,6%** (1 / 38) (*Maunula et al., 2013*)



Cluster of Human Tick-born Encephalitis Virus (TBEV) cases in Ain, France



April to June 2020

French department of Ain
44 human suspect TBEV cases

Investigators :

National Center for arboviruses (NRC) (Isabelle Leparc-Goffart), Regional health agency (ARS)

33 positive human samples confirmed → (ELISA + VNT test)

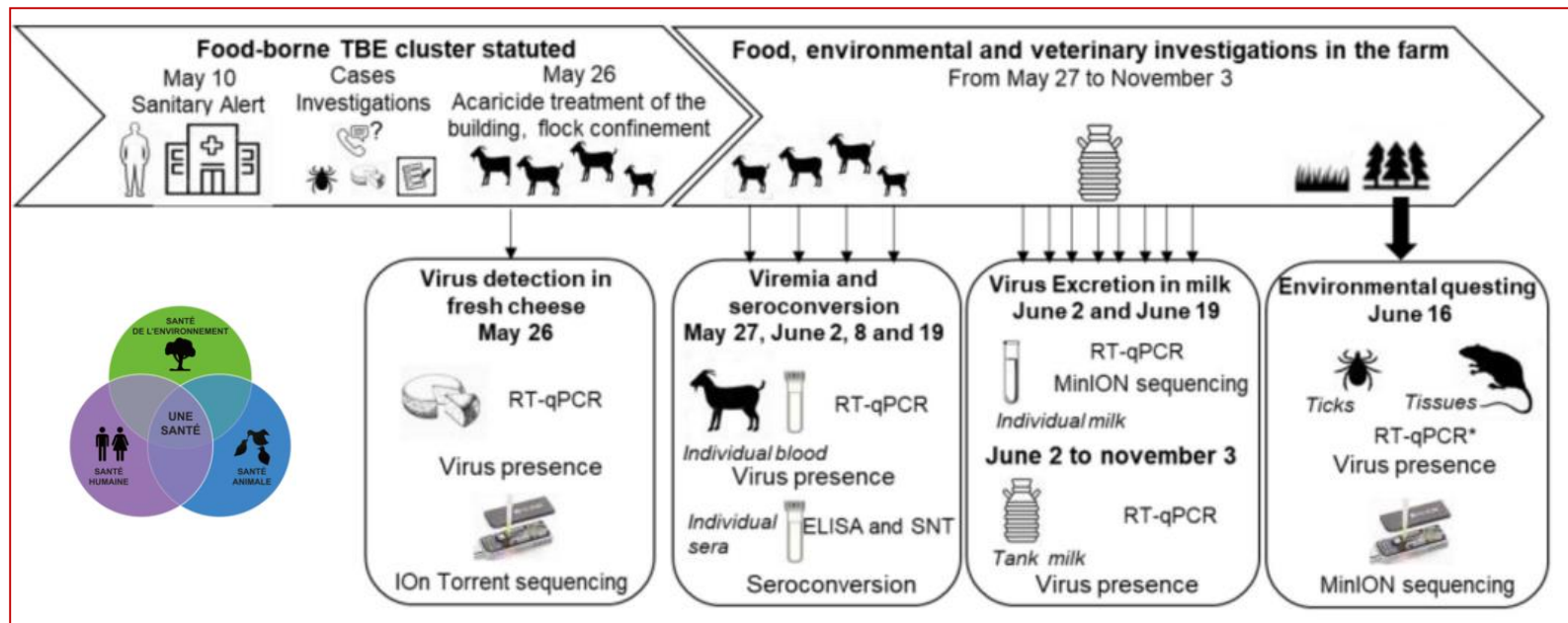
41 cases reporting consumption of unpasteurized goat cheese from the same goat farm → RT-qPCR

TBEV detected in cheese (RNC)

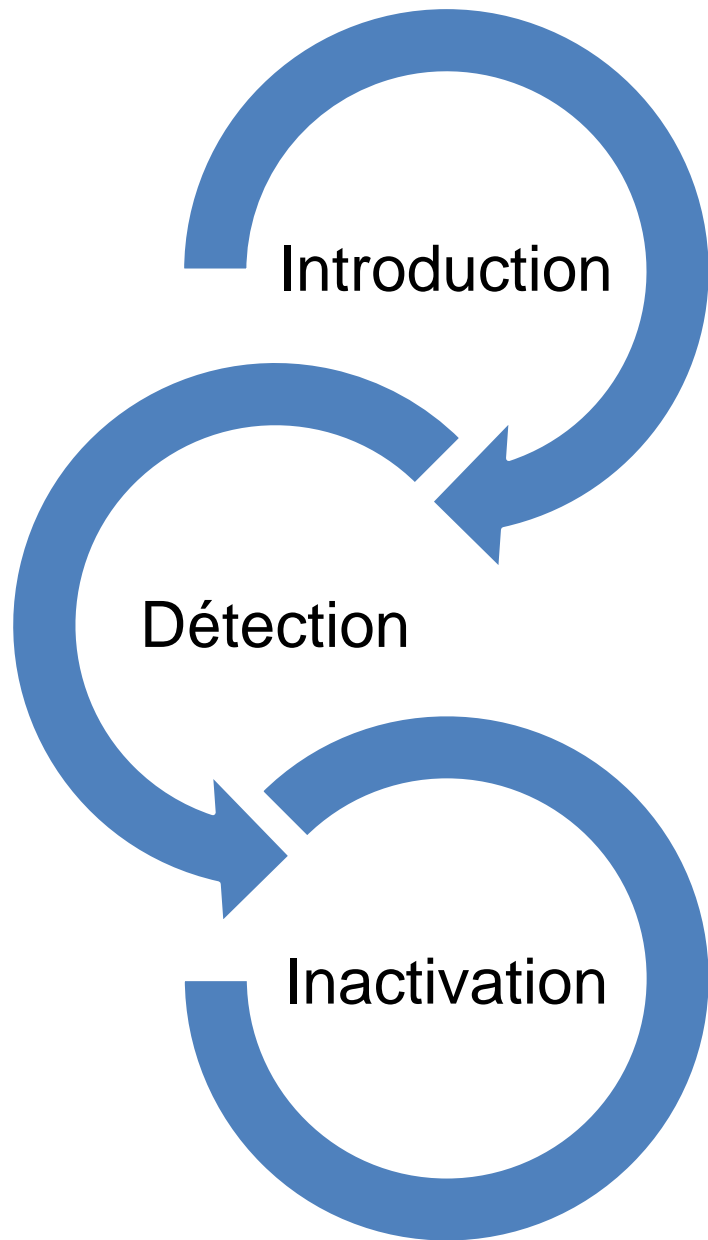
→ Food at origin of this outbreak was confirmed

A one-health approach in Anses' labs

- Detection of virus in cheese and milk products
- Serological testing of all animals in suspected and surrounding farms
- Analysis of the landscape and localization of wooded area
- Capture of questing ticks and small mammals for virus detection Virus isolation and genome sequencing.



Laboratory for Rabies and Wildlife (Nancy), for Food Safety (LSAI) and for Animal Health (LSAn) (Maisons-Alfort)



- Données épidémiologiques
- Couples « Virus – Matrice »
- Problématique de la virologie alimentaire

- Principaux virus d'intérêt
- Méthodes de détection : VHA et norovirus (ISO 15216)
- Applications & évaluation du risque
- Evolution des méthodes
- Risques émergents : virus de l'hépatite E

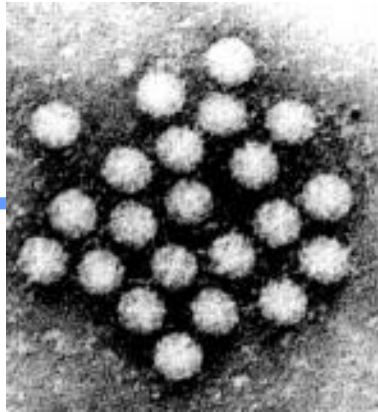
- Etude d'inactivation: outils à disposition
- Méthodes alternatives pour la détection des virus infectieux
- Inactivation virale : efficacité fonction du virus et de la matrice

Un moyen de contrôle

**EAU
ALIMENTS**



Contamination



**par virus
entériques**

**RISQUE INFECTIEUX
ELEVE**



PAS DE PROCEDE

PROCEDE



**EXISTENCE D'UN
RISQUE INFECTIEUX
DEPENDANT DE
L'EFFICACITE DU
TRAITEMENT
TECHNOLOGIQUE
APPLIQUE**

CONSUMERS



TIAC

**+ Traitements
hygiéniques**

LE ROLE CRUCIAL DU PROCEDE / TRAITEMENT



Activité virucide = capacité d'un produit à réduire le nombre de particules virales infectieuses dans des essais appropriés et dans des conditions définies

Evaluer l'efficacité d'un traitement virucide

Disposer d'une méthode de quantification des virus infectieux



Virus cultivables

Virus non cultivables



Pour évaluer les performances des procédés d'inactivation

- ⇒ Disposer d'une méthodes de titrage des virus infectieux (Plages des lyse; Tissue Culture Infectious Dose (TCID50))
- ⇒ **Utilisation de virus « modèles » des virus entériques pathogènes** (« *surrogates* ») (*Bactériophages, souches animales de norovirus*)
- ⇒ **Souches de laboratoire** (*souches adaptées (VHA, VHE)*)

Efficacité des traitements varie selon les virus et la matrice



**Difficulté d'avoir un traitement efficace envers tous les VE
quelles que soient les matrices**

Détection des particules virales infectieuses

Culture cellulaire : « Gold standard method »

MAIS la plupart des virus entériques sont peu ou pas cultivables



Méthodes alternatives pour détecter l'infectiosité du VHA et NoV

Détection de l'intégrité des génomes:

Amplification du génome viral entier par RT-qPCR (*Li, 2002; Wolf, 2009*)

Mesure des dommages oxydatifs sur la capsid virale (*Sano, 2010*)

Détection de l'intégrité de la capsid virale: méthodes combinées à la RT-qPCR

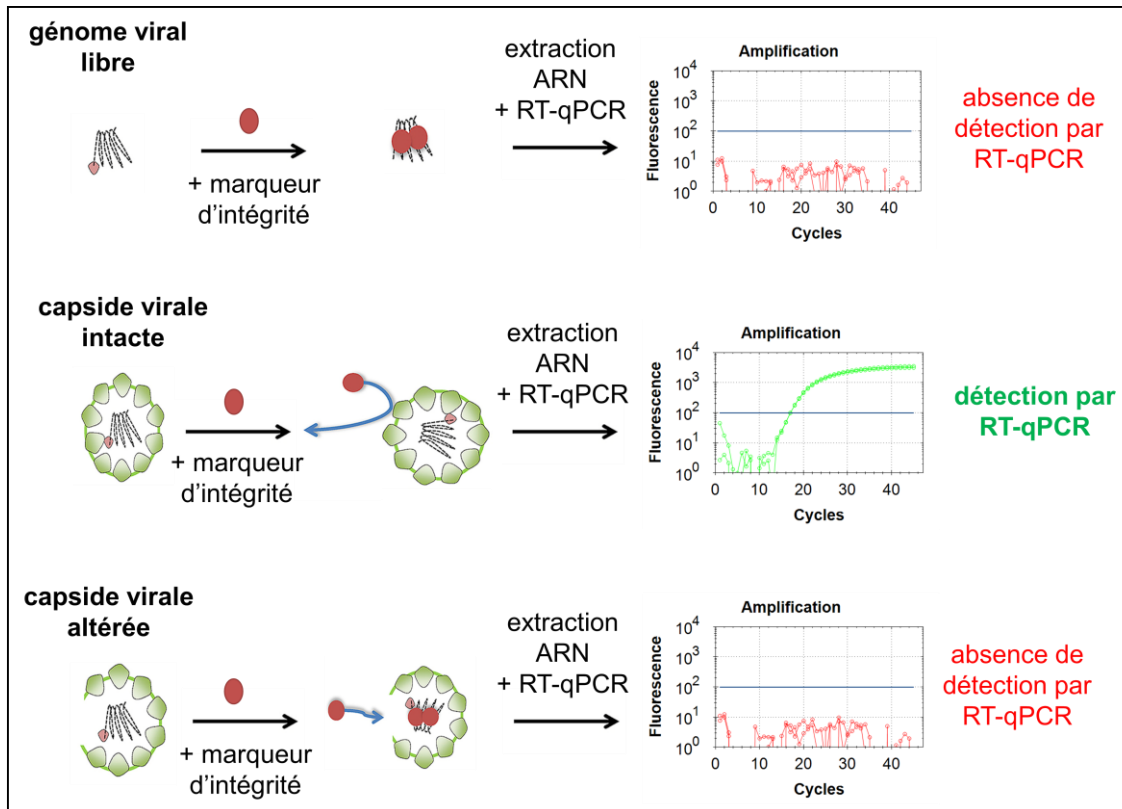
Pré-traitements enzymatiques des échantillons et/ou utilisation d'agents intercalants (EMA, PMA) (*Randazzo, 2016; Prevost, 2013; Moreno, 2015; Coudray-Meunier, 2013*)

Essais de capture (billes magnétiques, mucine) (*Li, 2011; Afolayan, 2016*)

Capsid Integrity-RT-qPCR

Principe

- Treatment of samples with molecules (monoazides, platinumium)
- Integrity markers binds to available RNA (\pm photoactivation)
- Prevent / avoid RNA amplification



Only RNA genomes from intact viral capsid are amplified by RT-qPCR

Capsid Integrity-RT-qPCR & HAV

Methods developed by several labs for detecting enteric viruses

- First, development to detect HAV and rotavirus as cell culture model were available for comparison studies
- Binding efficacy of monoazides (propidium monoazide, PMATM and ethidium monoazide, EMATM) to link viral RNA of HAV and rotavirus

Table 1 Binding of dyes to purified viral RNA

[Dye] μM	HAV		RV (Wa)		RV (SA11)	
	PMA	EMA	PMA	EMA	PMA	EMA
0	-0.33 ± 0.10	-0.33 ± 0.10	-0.49 ± 0.51	-0.49 ± 0.51	-0.07 ± 0.26	-0.07 ± 0.26
10	-2.65 ± 0.51	-0.96 ± 0.27	-1.27 ± 0.12	-0.59 ± 0.24	-1.41 ± 0.51	-0.79 ± 0.50
20	-2.27 ± 0.46	-1.08 ± 0.48	-1.33 ± 0.13	-0.07 ± 0.50	-1.48 ± 0.55	-0.64 ± 0.66
50	-3.16 ± 0.77	-1.16 ± 0.21	-1.75 ± 0.11	-0.62 ± 0.38	-2.96 ± 1.38	-1.22 ± 0.67
100	-2.47 ± 0.37	-1.56 ± 0.33	-2.20 ± 0.50	-1.01 ± 0.11	-3.58 ± 0.65	-2.06 ± 1.63
200	-2.91 ± 0.63	-1.53 ± 0.17	-2.52 ± 1.13	-0.99 ± 0.41	-3.02 ± 1.10	-0.63 ± 0.55

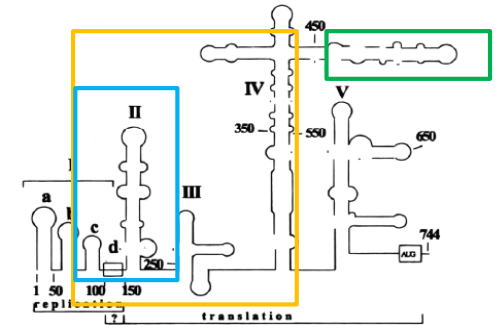
Quantification by RT-qPCR assays A of 10⁸ copies of the genome of viral RNA after monoazide treatment without photoactivation (A), after monoazide treatment without photoactivation followed by QIA-quick purification (B), after monoazide treatment with photoactivation followed by QIA-quick purification (C). Mean values ± SD (n=3).

- HAV, ssRNA
- Rotavirus dsRNA

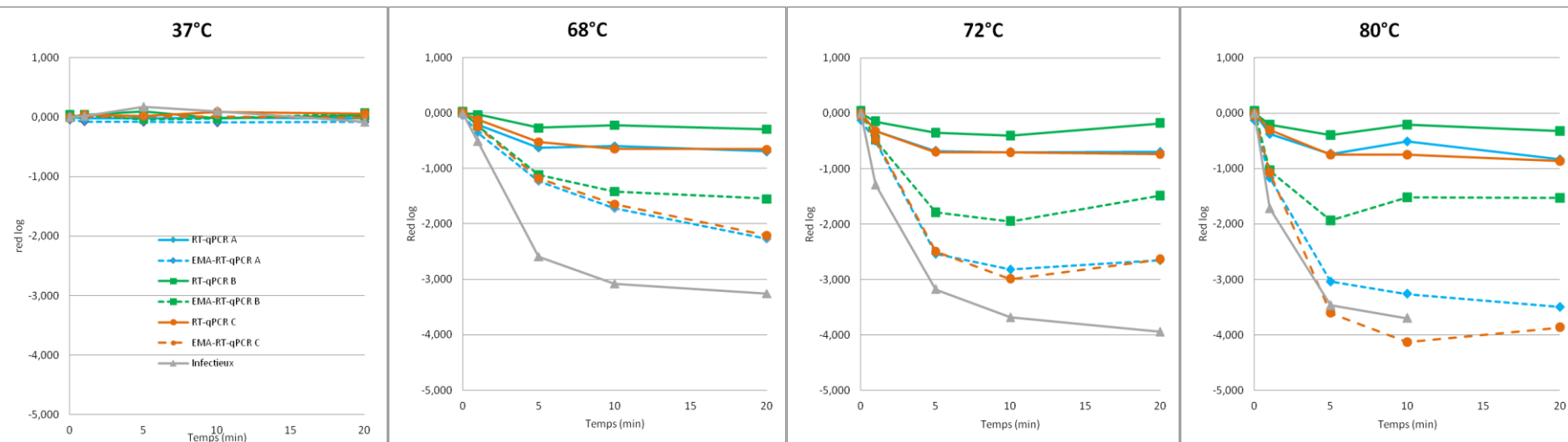
- Efficacy of PMA and EMA treatments depends on the type of dye, the concentration of the dye and the viral RNA type
- PMA was found to be the most effective dye for the 3 viral targets

Capsid Integrity-RT-qPCR & HAV

- Efficiency of the monoazide treatment may be increased by using a surfactant
- HAV: EMA (20 μ M) + IGEPAL CA-630 (0,5%)
- Implementation for **heat inactivation studies**
- Three RT-qPCR assays to detect RNA HAV



Secondary structure of the HAV 5'NTR (Non Translated Region) (Kusov et al., 1997)



Size & location primers/probe: A : 174 pb (5'NTR, pb68 à 241) B : 77 pb (5'NTR, pb459 à 535) C : 353 pb (5'NTR, pb68 à 399)

- Influence of the RT-qPCR assays in terms of **length of amplicons**
- **Correlation with infectious data only for high temperatures**

- Implementation of the PMA-triton-RT-qPCR assay for **detecting HAV in different types of food**

Table 5

Quantification of thermally inactivated HAV suspensions inoculated in vegetable concentrates by PMA–0.5% Triton pretreatment and RT-qPCR.

	PMA–0.5% Triton	Levels of HAV					
		6×10^4 TCID ₅₀		6×10^3 TCID ₅₀		6×10^2 TCID ₅₀	
		Quantification (log PCRU) ^a	Reduction ^b	Quantification (log PCRU) ^a	Reduction ^b	Quantification (log PCRU) ^a	Reduction ^b
Lettuce	–	4.04 ± 0.01		3.07 ± 0.12		1.32 ± 0.06	
	+	2.40 ± 0.10	1.64	1.27 ± 0.08	2.00	0.77 ± 0.12	0.55
Spinach	–	2.87 ± 0.06		1.51 ± 0.02		1.19 ± 0.03	
	+	1.72 ± 0.08	1.15	0.80 ± 0.13	0.71	0.33 ± 0.23	0.86
Parsley	–	3.24 ± 0.05		2.31 ± 0.21		1.55 ± 0.20	
	+	2.18 ± 0.20	1.06	0.87 ± 0.27	1.44	ND	>1.55

ND: non-detected.

^a Each condition was replicated three times, and HAV titers were obtained by RT-qPCR using a standard curve made by means of HAV PCRU.

^b Reduction in titers between thermally inactivated viruses before and after pretreatment.

- Pre-treatment (PMA-triton) partially efficient in reducing the RT-qPCR signal between 0.5 and 2 logs
- **RT-qPCR signal completely eliminated** in PMA–0.5%Triton treated concentrates corresponding to **parsley inoculated at 6×10^2 TCID₅₀**

Capsid Integrity-RT-qPCR assays for detecting hNoV

Use of viral surrogates (MNV): Integrity-RT-qPCR vs Infectious titrations

Implementation for **detecting NoV after inactivation processes**

▪ Heat inactivation

Optimal Integrity-RT-qPCR assay developed: Pre-treatment with 2.5 mM PtCl₄ in PBS for 10 min at 5 °C)

→ Efficient to discriminate between native and heat-inactivated MNV at 72 °C and 80 °C

→ Significant reduction of the genomic titer of heat-treated human NoV

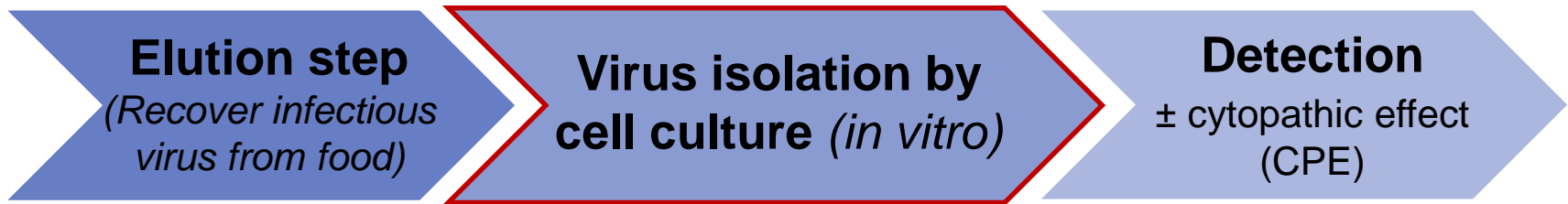
▪ Chloride and UV treatments

→ PMA RT-qPCR prevents amplification of chlorine (0,5 mg/ml) inactivated MNV, but not hNoV

→ PMA RT-PCR is **not effective for UV inactivated viruses** (187 mJ/cm²) suggesting that viral capsid damage may be necessary for PMA to enter and bind to the viral genome.

Detection of infectious virus in food

Cell culture-based methods : « Gold standard method »



Cell models available

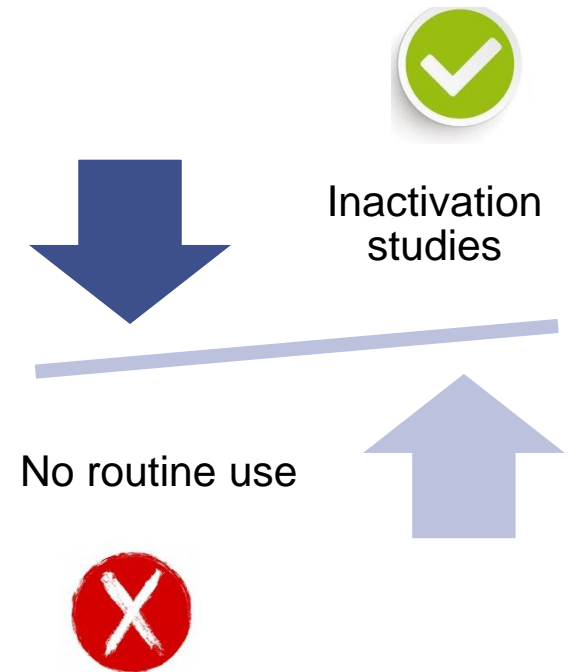
- **NoV** (human intestinal enteroviruses)
(*Ettayebi et al., 2016 & 2021*)

- **HAV & HEV**

Several cell lines (susceptible and permissive)

Wild-types: slow replication rate without CPE

Adapted strains: useful to assess the virucidal efficiencies of inactivation treatments



Méthode alternative pour quantifier les virus infectieux

Détection du caractère infectieux par impédancemétrie

Mesurer l'impédance électrique au sein d'une population de cellules

Analyser les événements cellulaires en temps réel, en continu et sans marquage (adhésion, prolifération, viabilité, morphologie ...)

Systemes xCELLigence (ACEA)

île de France

DIM Malinf

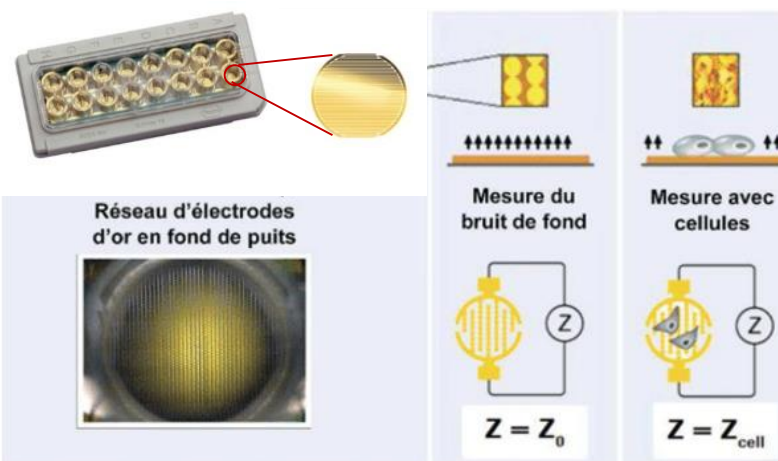


RTCA DP (Dual Purpose) :
3 plaques 16 puits



RTCA MP (Multi Plate) :
6 plaques 96 puits

ASTRÉA
Agrosociences • Écologie des Territoires • Alimentation



$$\text{Cell Index value (CI)} = \frac{(Z_0 - Z_{cell})}{15 (\Omega)}$$

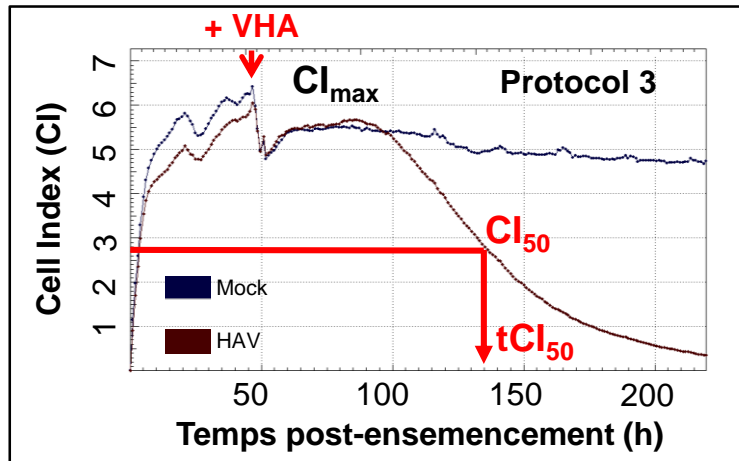
Résultats: Impédance et VHA

Ensemencement des cellules en E-plate

J2

Infection des cellules
VHA (10^5 PFU / ml)

Suivi en temps réel du CI



- CI_{50} = diminution de 50% du CI_{max}
- tCI_{50} = Temps pour atteindre la CI_{50}

Temps post-infection
(h p.i.)

Protocole 3

TCI_{max}

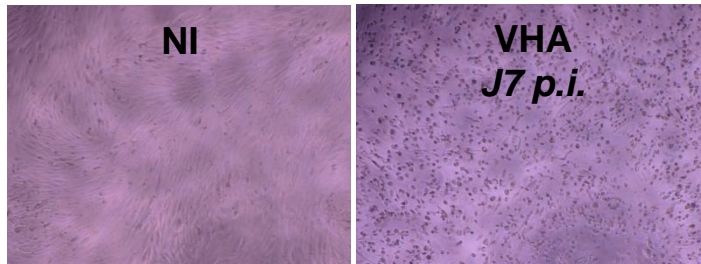
42.67 ± 5.79

TCI_{50}

91.78 ± 6.28

< J4 p.i.

Observation d'un effet cytopathogène (ECP) à J7 p.i.



- Diminution du CI corrélée à la mort des cellules infectées (*CCK-8 (Dojindo)*)
- MAIS plus précoce que l'ECP

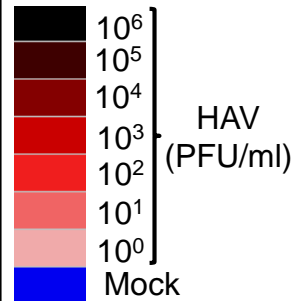
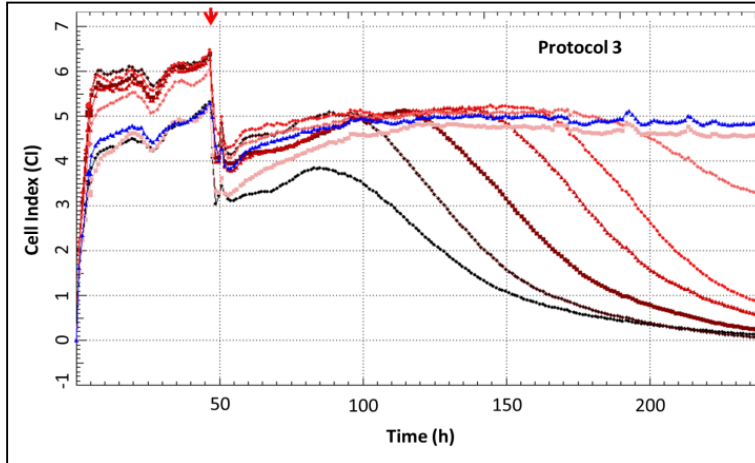
Résultats: Impédance et VHA

Ensemencement des cellules en E-plate

J2

Infection des cellules
Dilutions sériées (1/10^{ème}) du VHA de 10⁶ à 10 PFU/ml

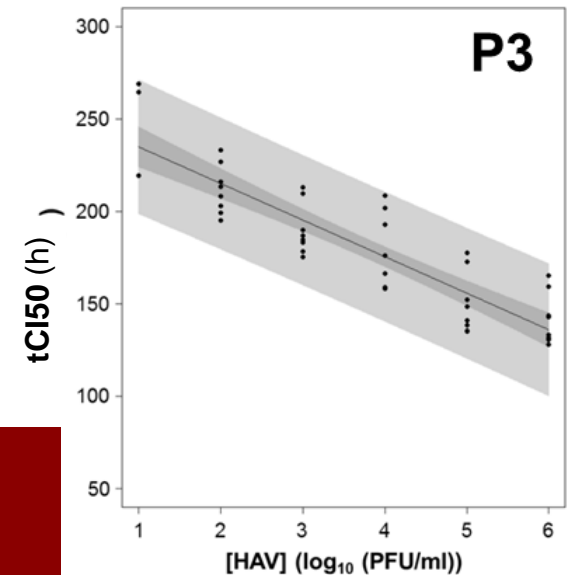
Suivi en temps réel du CI



Sensibilité de la méthode
LOD : 10² PFU/ml (n=4)

Corrélation entre la concentration de la suspension virale et le tCI50

→ Etablissement d'une **gamme standard**



Titration du VHA par
plage de lyse
Résultats en 14 jours

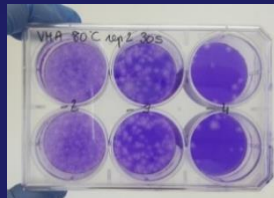


Titration par
impédancemétrie
Résultats en 4 à 7

Inactivation thermique VHA: comparaison des méthodes

- Traitement thermique d'une suspension de VHA : 37, 50, 56, 65, 72 et 80° C
- Quantification du VHA par 4 méthodes

Méthode des plages de lyse (PFU)



Virus infectieux

Impédancemétrie



Virus infectieux

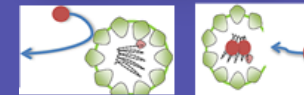
Inactivation thermique du VHA

RT-qPCR



TOUS les génomes viraux

EMA-RT-qPCR

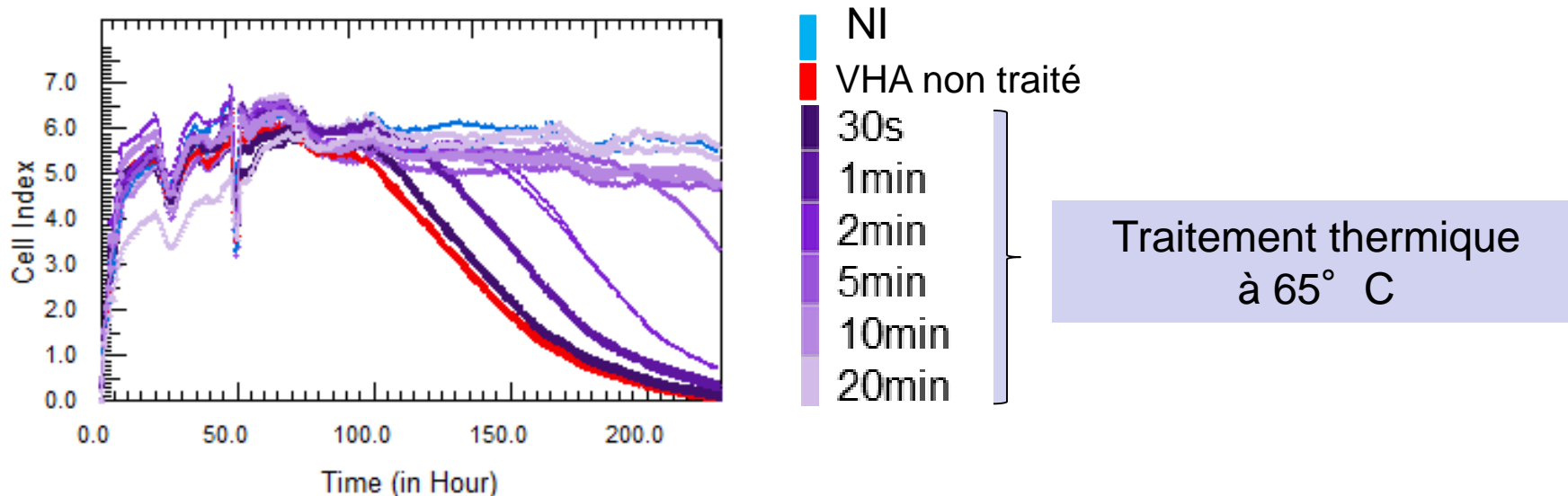


Génomes viraux provenant de capsides virales NON altérées

Inactivation thermique VHA: Résultats (1)

Quantification du VHA par impédancemétrie

Ex. Suivi en temps réel de l'impédance cellulaire après infection des cellules FRhK-4 par le VHA traité ou non à 65° C



tCl_{50} (h) $\xrightarrow{\text{Gamme standard}}$ VHA (\log_{10} PFU/éch) $\xrightarrow{\text{Réduction décimale VHA}}$ $= N_t / N_0$

$N_t = \log_{10}$ (VHA-incubé à 65°C)

$N_0 = \log_{10}$ (VHA-non traité)

Inactivation thermique VHA: Résultats (2)

GInaFiT

Geeraerd and Van Impe Inactivation model Fitting Tool

Developed by Dr. Annemie Geeraerd as support of a range of microbial inactivation models published in Bigelow and Esty (1920), Cerf (1977), Geeraerd et al. (2000), Mafart et al. (2002), Albert and Mafart (2005), Geeraerd et al. (2005)

Modélisation des données avec **GInaFiT** (add-in pour Microsoft® Excel) pour comparer les modèles d'inactivation => choix du modèle **“log-linear + tail”** (Geeraerd et al.)

- **D-value** ou temps de réduction décimal

Temps nécessaire pour inactiver 90% du virus (soit 1 log₁₀ de réduction) à une température donnée

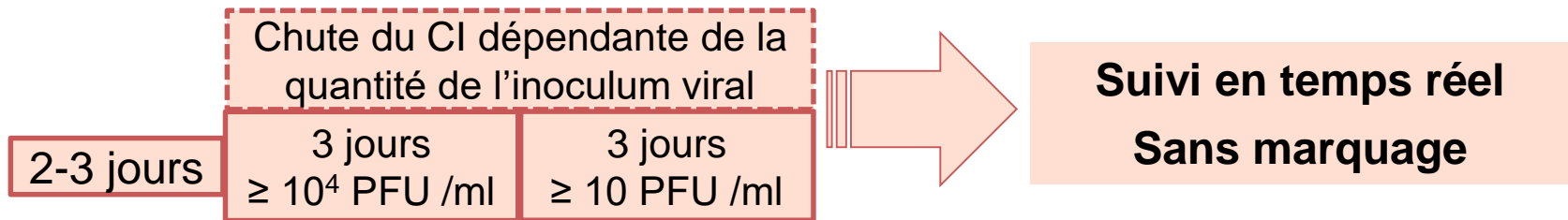
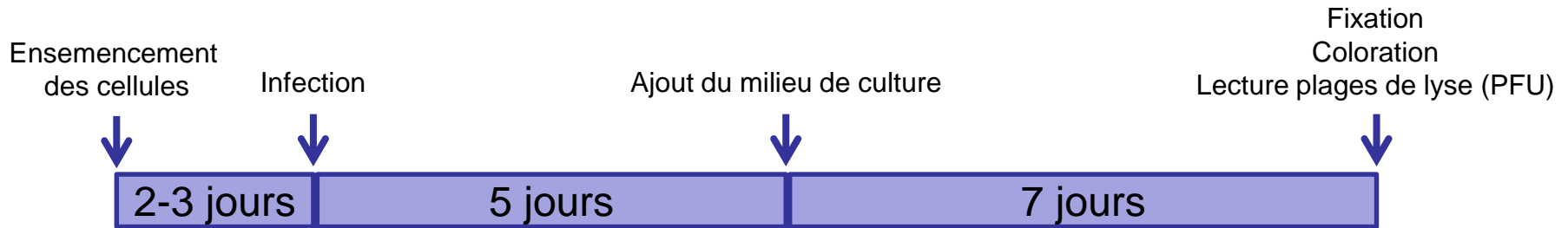
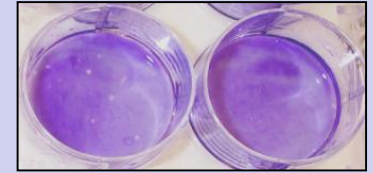
D-value		PFU	Impédancemétrie	EMA-RT-qPCR	RT-qPCR
Température d'incubation	37° C	37.50 h	35.59 h	272.82 h	267.74 h
	50° C	2.84 h	3.34 h	8.22 h	11.51 h
	56° C	43.31 min	43.04 min	68.39 min	143.91 min
	65° C	0.91 min	0.98 min	2.49 min	19.51 min
	72° C	0.70 min	0.93 min	0.99 min	12.98 min

Titration de la souche adaptée du VHA

Méthode utilisée au laboratoire :

Titration en plages de lyse

Lecture en point final, coloration => 12 jours p.i.



Systeme xCELLigence permet la détection quantitative des particules virales infectieuses de la souche adaptée du VHA en **diminuant le temps de manipulation et d'obtention des résultats**

Inactivation thermique des VE

The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review

I. Bertrand¹, J.F. Schijven², G. Sánchez³, P. Wyn-Jones⁴, J. Ottoson⁵, T. Morin^{6*}, M. Muscillo⁷, M. Verani⁸, A. Nasser⁹, A.M. de Roda Husman¹⁰, M. Myrme¹¹, J. Sellwood¹², N. Cook¹³ and C. Gantzer¹

Données biblio (n=563) / virus

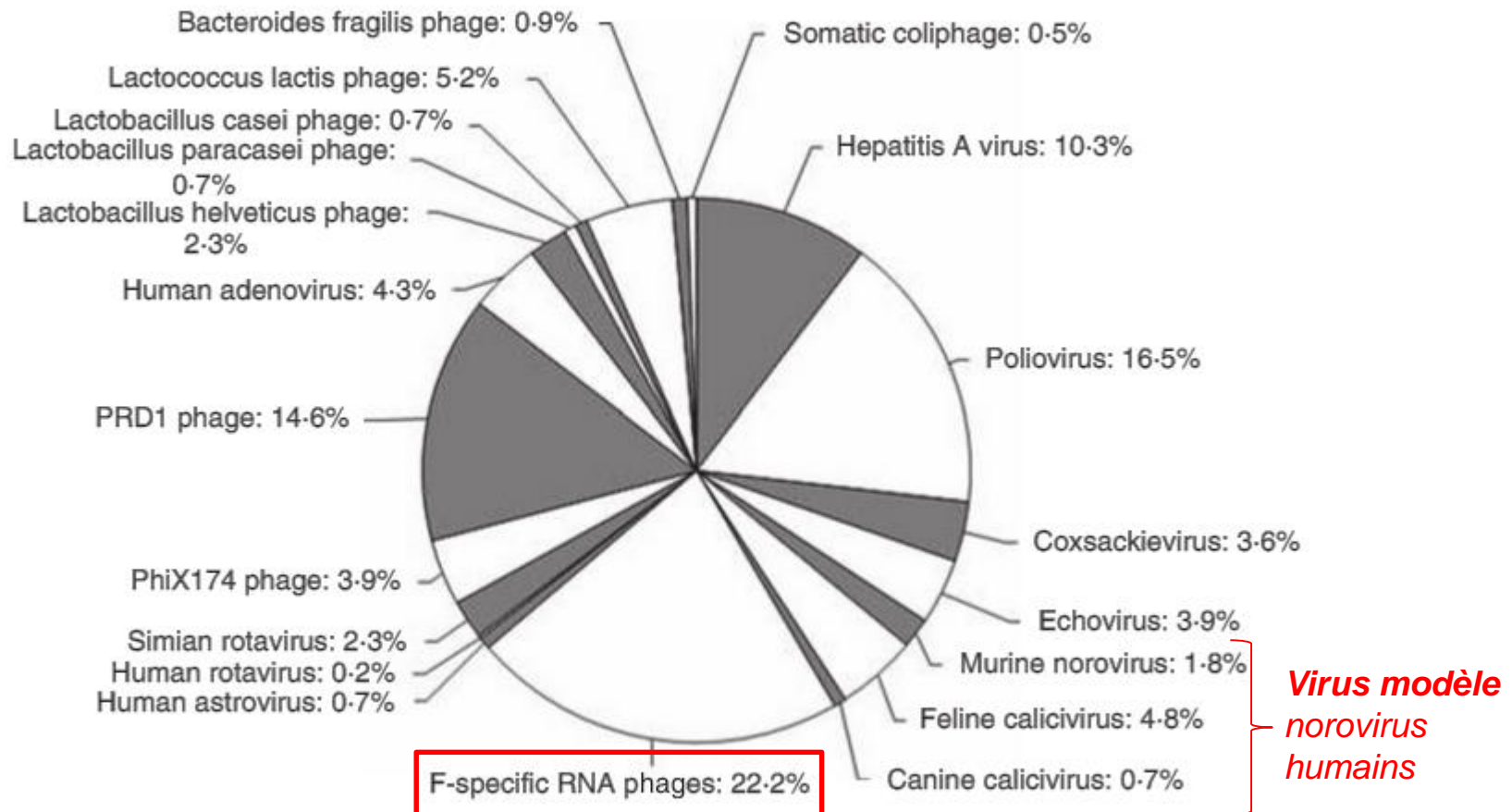


Figure 3 Distribution of the data on viral inactivation (n = 563) in function of virus species.

Inactivation thermique des VE

Données biblio (n=563) / matrices

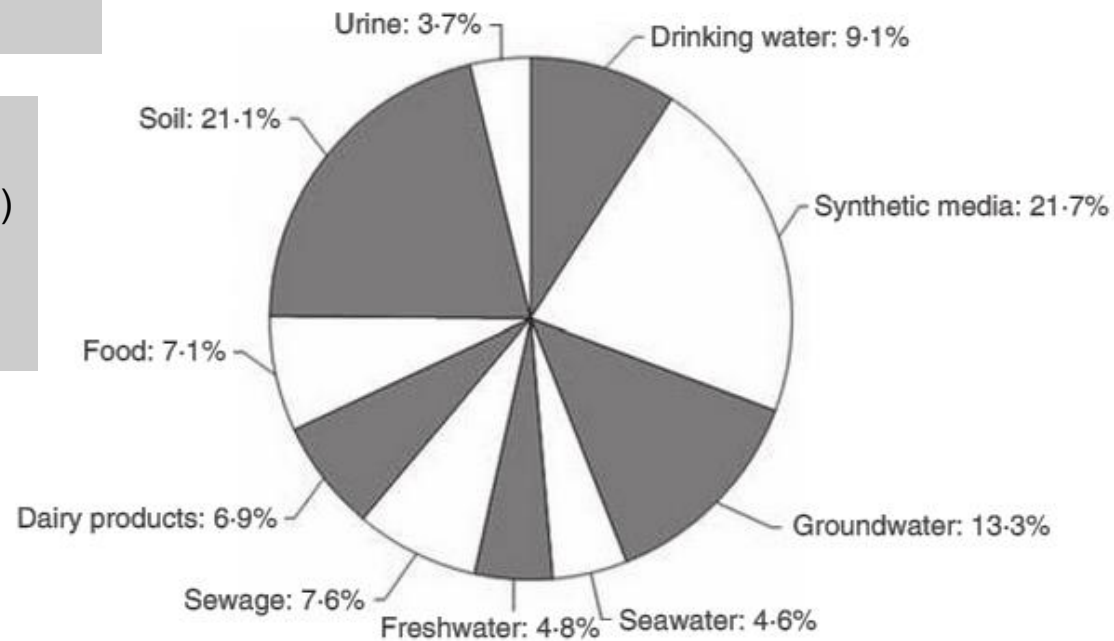
Matrices simples

- ✓ Milieux synthétiques (PBS, milieu de culture...)
- ✓ Eau de boisson (eau de réseau dé-chlorée, eau filtrée, stérilisée, distillée..)
- ✓ Eau souterraine +/- filtrée

Matrices complexes

- ✓ Eaux naturelles (rivières, mer, lac...)
- ✓ Eaux usées, sol
- ✓ Aliments
- ✓ Lait

Figure 4 Distribution of the data on viral inactivation (n = 563) in function of the type of matrix.



The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review

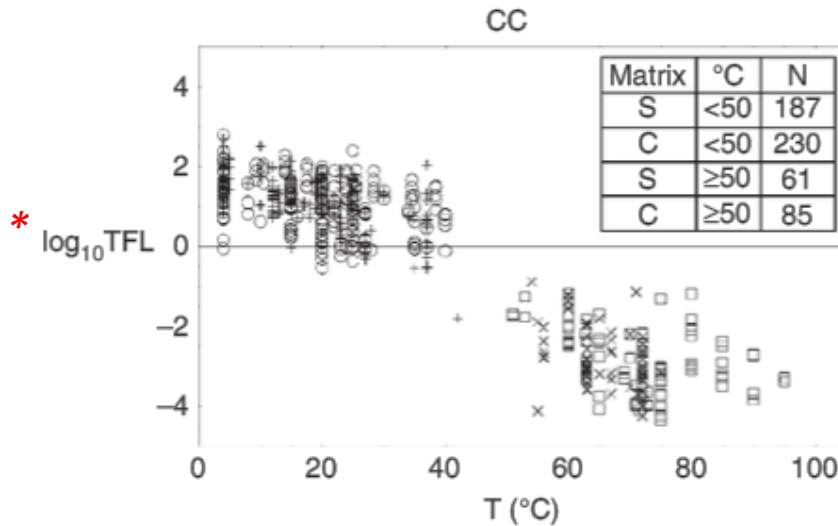
I. Bertrand¹, J.F. Schijven², G. Sánchez³, P. Wyn-Jones⁴, J. Ottoson⁵, T. Morin^{6*}, M. Muscillo⁷, M. Verani⁸, A. Nasser⁹, A.M. de Roda Husman¹⁰, M. Myrme¹¹, J. Sellwood¹², N. Cook¹³ and C. Gantzer¹

Inactivation thermique des VE

The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review

I. Bertrand¹, J.F. Schijven², G. Sánchez³, P. Wyn-Jones⁴, J. Ottoson⁵, T. Morin^{6*}, M. Muscillo⁷, M. Verani⁸, A. Nasser⁹, A.M. de Roda Husman¹⁰, M. Myrme¹¹, J. Sellwood¹², N. Cook¹³ and C. Gantzer¹

Données biblio (n=563)



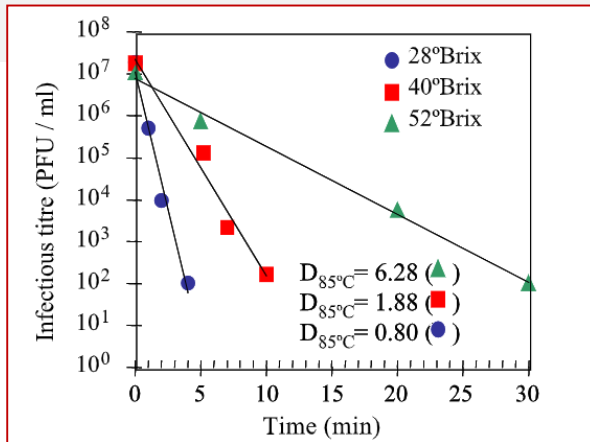
* *TFL* = Time to reduce first \log_{10} (day)
Toutes matrices/tous virus

Traitement thermique => Activité virucide efficace

- ✓ Plus grande stabilité des génomes viraux / particules infectieuses
- ✓ Efficacité dépendante du type de virus
- ✓ Inactivation virale plus rapide lorsque les températures sont $\geq 50^{\circ} C$
- ✓ **MAIS** l'efficacité de l'inactivation virale dépend aussi de la matrice

Heat inactivation of HAV / sucrose concentration in synthetic medium

(Deboosere et al., 2004)



Decrease in infectious HAV
→ Faster with low [sucrose]

Inactivation of surrogate MNV: high pressure, ozone

400 MPa, 4°C, 2 min (en PBS)	5,6 réduction décimale	Myrtilles	<i>Li et al., 2013</i>
400 MPa, °21C, 2 min (en PBS)	4 réduction décimale	Huitres	
	2 réduction décimale	Huitres	
Ozone (O ₃) : 6%, 10 min (<i>gaseous</i>)	4,1 réduction décimale	Laitue	<i>Predmore et al., 2015</i>
Ozone (O ₃) : 6%, 40 min (<i>gaseous</i>)	3,3 réduction décimale	Fraises	<i>Predmore et al., 2015</i>

→ High-pressure more efficient at low temperature

→ Ozone more effective on vegetables / strawberries: Need to increase treatment duration to provide same efficiency

Efficacité virucide des procédures de désinfection



Traitements technologiques de désinfection

⇒ Chlore (15 ppm) *versus* biocide commercial (*Mélange d'acide formique + peroxyde d'hydrogène + acide peracétique*) (100 ppm)

⇒ Matrice: salades inoculées artificiellement avec VHA ou un virus « modèle » (FCV ou MNV-1)

Principaux résultats (*Fraisse et al., 2011*)

✓ Lavage des salades => réduction $\sim 1 \log_{10}$

✓ Pas d'effet supplémentaire des ultra-sons

✓ Lavage de 2 min des salades en présence du biocide: Réductions logarithmiques (\log_{10}) des titres infectieux de VHA, FCV et MNV-1 obtenues après lavage / traitements de désinfection de laitues:

Chlore: VHA ($1.9 \log_{10}$), MNV ($1.4 \log_{10}$) et FCV ($2.9 \log_{10}$)

➡ Résistance du VHA \sim MNV

Mélange biocides: VHA ($0.7 \log_{10}$), MNV ($2.4 \log_{10}$) et FCV ($3.2 \log_{10}$)

➡ Résistance du VHA \gg MNV-1 $>$ FCV

Virus de l'hépatite A

Virus de l'hépatite A
 Famille des Picornaviridae
 Genre Hépatovirus
 Virus

Hazard sheet for HAV

Tableau 3b. Traitements permettant d'obtenir 4 réductions décimales du titre infectieux du VHA dans les aliments

Hautes Pressions		
Purée de fraises : 375 MPa, 5 min		
Oignons verts : 375 MPa, 5 min		
UV		
Oignons verts : 40 à 240 J/m ²		
Traitements par la chaleur		
Matrice	Barèmes (à cœur du produit)	
Lait (3,5 % matières grasses (MG))	71 °C/9 min ou 80 °C/25 s	
Crème (18 % MG)	71°C/13 min or 80°C/28 s.	
Coques	85-90 °C/1 min	
Moules	90 °C/2 min	
Purée de fraise (28 % de sucre)	90 °C/2 min	
Purée de fraise (52 % de sucre)	80 °C/36 min ou 90 °C/12 min	
Traitements chimiques		
Désinfectant	Matrice	Nombre de réductions décimales du titre
Chlore libre 10 mg/L, 10 min, pH7	Fraises/Tomates cerise/ Laitue	2.2/> 2.3/> 2.3
Chlore libre 20 mg/L, 10 min, pH7	Fraises/Tomates cerise	2.3/> 2.4
Chlore libre 200 mg/L, 5 min, pH7	Fraises	2.6



Norovirus

Famille des *Caliciviridae*

Genre Norovirus

Virus

Caractéristiques et sources des norovirus

Principales caractéristiques microbiologiques

Hazard sheet for NoV

Tableau 3 : Impact des traitements en milieu industriel (sur substitut MNV)*.

Traitement	Virus	Conditions	Impact	Matrice
Température	MNV	65°C, 30 sec 75°C, 15 sec 100°C, 2 min	1,9 réductions décimales 2,8 réductions décimales 4 réductions décimales	Purée de framboises (9,2° Brix) Purée de framboises (9,2° Brix) Huître
Désinfectants	MNV	Hypochlorite de sodium NaClO 15 ppm, 2 min 200 ppm, 5 min 100 ppm, 2 min 50 ppm, 1 min 50 ppm, 1 min 100 ppm, 1 min	1,4 réductions décimales 2,3 réductions décimales 1,7 réductions décimales < 1 réduction décimale 2 réductions décimales 4,2 réductions décimales	Laitue Laitue Fraise Fraise, laitue Myrtille Myrtille
		Acide peracétique C₂H₄O₃ 85 ppm, 1 min 80 ppm, 2 min 100 ppm, 10 minutes 250 ppm, 5 min	2-3 réductions décimales 1,8 réductions décimales 2,3 réductions décimales 2,2 réductions décimales	Myrtille, fraise et laitue Fraise Laitue Laitue (50g/ 500ml)
		Hydroxyde d'hydrogène H₂O₂ 260 ppm, 60 min	4 réductions décimales 2-3 réductions décimales	Pomme, myrtille Concombre, fraise
		Ozone (O₃) (liquide) 6,25 ppm, 10 min 6,25 ppm, 10 min 3 ppm, 1 min	3,1 réductions décimales 3,8 réductions décimales 3,3 réductions décimales	Laitue Oignon vert Framboise
Ozonation	MNV	Ozone (O₃) (gaz) 6%, 10 min 6%, 40 min	4,1 réductions décimales 3,3 réductions décimales	Laitue Fraise
		Hautes pressions hydrostatiques	275 MPa, 0°C, 5min 400 MPa, 4°C, 2 min (en PBS) 400 MPa, °21C, 2 min (en PBS) 400 MPa, 4°C, 2 min 400 MPa, 20°C, 3 min	2,8 réductions décimales 4 réductions décimales 2 réductions décimales > 4,7 réductions décimales 4,3 réductions décimales
UVC (254 nm)	MNV	200 à 1300 mJ/cm ² , 20 à 120 sec 240 - 300 mJ/cm ²	2-3 réductions décimales 1,27-1,5 réductions décimales 0,6-0,8 réductions décimales < 1 réduction décimale	Myrtille (fraîche et congelée) Fraise et framboise (frais) Fraise et framboise (congelés) Laitue, oignon vert, blanc de poulet
Lumière pulsée (20 – 110 nm)	MNV	22,5 J/cm ² 11,45 J/cm ²	0,9 réduction décimale 3,8 réductions décimales 1,3 - 1,9 réductions décimales	Fraise Myrtille Fraise, framboise, myrtille
Ionisation	MNV	4 kGy 7 – 11 kGy 11 kGy	2 réductions décimales 3-4 réductions décimales 3,6 réductions décimales	Fraise, framboise Fraise, framboise Laitue, épinard

* Les données sélectionnées ne concernent que le substitut MNV et expriment des réductions du titre infectieux.

** Les modèles d'entéroïdes développés à partir de cellules des cryptes isolées de biopsies d'intestin grêle présentent les caractéristiques physiologiques de l'intestin humain.

Impact des procédés

Procédé	Paramètres technologiques	Elimination virale
STERILISATION	T > 110° C	BONNE
PASTEURISATION	60 à 100° C (qqs dizaines de sec à qqs dizaines de min)	VARIABLE selon barèmes et produits
CONGELATION	-15° / -20° C plusieurs mois	FAIBLE ou NULLE
LYOPHILISATION	/	VARIABLE selon virus
CHIMIQUES	Chlore libre / peracides	VARIABLE selon virus
TECHNOLOGIES ALTERNATIVES (Novel Food)	Haute Pression hydrostatiques Lumière Pulsée Ionisation	VARIABLE selon virus
TECHNOLOGIES INNOVANTES	Ozonation Technologies membranaires	VARIABLE selon virus / aliment

Globalement, plus forte résistance du VHA par comparaison aux modèles des Norovirus

Résistance des VE

aux agents chimiques et physiques : synthèse

Virus	Résistance aux agents chimiques	Résistance aux agents physiques
VHA	pH acides ; solvants des lipides (chloroforme, éther à 20%) ; chlore aux concentrations présentes dans les eaux de piscine ou de boisson (0,1 à 0,2 ppm)	Résistance au froid (4°C) et à la congélation ($\leq 20^{\circ}\text{C}$) Stable 1h à 60°C Partiellement inactivé après 10 à 12 h à 60°C
VHE	/	Résistant au froid (4°C) et à la congélation ($\leq 20^{\circ}\text{C}$)
Norovirus Sapovirus	/	Résistant au froid (4°C) et à la congélation ($\leq 20^{\circ}\text{C}$) Stable 30 min à 60°C Résistant aux variations de pH (3 h à pH 3 à t° ambiante)
Rotavirus	Monochloramine, Ammoniums quaternaires (gluconate de chlorhexidine, cetrimide...) Savon liquide	Résistant au froid (4°C) et à la congélation ($\leq 20^{\circ}\text{C}$) Stable 30 min à 60°C
Astrovirus	Chloroforme Détergents Solvants des lipides	Résistant au froid (4°C) et à la congélation ($\leq 20^{\circ}\text{C}$) Stable 5 min à 60°C Stable à pH 3
Adenovirus	/	Résistant au froid (4°C) et à la congélation ($\leq 20^{\circ}\text{C}$)
Réovirus	Ethanol à 70%	Résistant au froid (4°C) et à la congélation ($\leq 20^{\circ}\text{C}$) Stable à température ambiante et à 55°C Stable à des pH entre 2 et 9
Entérovirus	Ethanol à 70%, lysol à 5%, composés d'ammoniums quaternaires à 1% (expositions courtes)	Résistant au froid (4°C) et à la congélation ($\leq 20^{\circ}\text{C}$) Résistant 30 min à 60°C Résistant 3 h à pH 3 à t° ambiante

Résistance des VE

aux agents chimiques et physiques : synthèse

Virus	Résistance aux agents chimiques	Résistance aux agents physiques
VHA	pH acides ; solvants des lipides (chloroforme, éther à 20%) ; chlore aux concentrations présentes dans les eaux de piscine ou de boisson (0,1 à 0,2 ppm)	Résistance au froid (4° C) et à la congélation ($\leq 20^{\circ}$ C) Stable 1h à 60° C Partiellement inactivé après 10 à 12 h à 60° C
VHE	/	Résistant au froid (4° C) et à la congélation ($\leq 20^{\circ}$ C)
Norovirus Sapovirus	/	Résistant au froid (4° C) et à la congélation ($\leq 20^{\circ}$ C) Stable 30 min à 60° C
Rotavirus	<p>Forte résistance à de nombreux agents chimiques</p>	<p>Absence d'effet du froid</p> <p>Grande résistance à la chaleur et aux pH extrêmes</p> <p>Stable a pH 3</p>
Astrovirus		
Adenovirus	/	Résistant au froid (4° C) et à la congélation ($\leq 20^{\circ}$ C)
Réovirus	Ethanol à 70%	Résistant au froid (4° C) et à la congélation ($\leq 20^{\circ}$ C) Stable à température ambiante et à 55° C Stable à des pH entre 2 et 9
Entérovirus	Ethanol à 70%, lysol à 5%, composés d'ammoniums quaternaires à 1% (expositions courtes)	Résistant au froid (4° C) et à la congélation ($\leq 20^{\circ}$ C) Résistant 30 min à 60° C Résistant 3 h à pH 3 à t° ambiante