



## Méthodes

### Détection du virus de l'hépatite E dans les aliments à base de foie cru de porc par une méthode de RT-PCR quantitative.

Sandra Martin-Latil, Catherine Hennechart-Collette, Sylvie Perelle

Université Paris-Est, Anses, Laboratoire de sécurité des aliments de Maisons-Alfort et Boulogne-sur-Mer, Unité Virologie des aliments et de l'eau, 14 rue Pierre et Marie Curie, Maisons-Alfort, France

Le virus de l'hépatite E (VHE) est responsable d'épidémies d'hépatites aiguës dans les pays à faible niveau d'hygiène. Plus récemment, il a été clairement défini comme responsable de cas sporadiques d'hépatites aiguës dans les pays industrialisés chez des patients n'ayant jamais séjourné en zone d'endémie. Entre 2007 et 2009, des produits alimentaires à base de foie de porc cru ont été suspectés, à plusieurs reprises, d'être à l'origine de cas d'infections autochtones d'hépatite virale E en France. Dans le cadre du plan de surveillance (DGAL/SDSSA/N2010-8330) de la contamination par le virus de l'hépatite E des produits de charcuterie à base de foie cru de porc au stade de la production mené en 2011, une méthode de détection quantitative du génome viral de l'hépatite E (VHE) dans les matrices carnées a été développée et utilisée pour analyser 70 échantillons. Cette méthode est basée sur une détection quantitative du génome viral de l'hépatite E par RT-qPCR et sur l'utilisation d'un contrôle de processus (norovirus murin, MNV-1) pour valider l'analyse. Nos résultats montrent qu'environ un tiers des figatelles et des saucisses à base de foie de porc contiennent du génome viral du VHE et que la charge virale retrouvée dans les échantillons positifs est > 103 copies génomes de VHE par gramme dans 55 % des échantillons.

**Mots-clés:** RT-qPCR, détection quantitative, virus de l'hépatite E, norovirus murin, contrôle de processus, aliments avec du foie cru de porcs.

#### Introduction

Le virus de l'Hépatite E (VHE) se transmet essentiellement par voie digestive après ingestion d'eaux ou d'aliments contaminés. Le VHE est reconnu comme l'agent principal d'hépatites aiguës dans les pays à faible niveau d'hygiène où il évolue selon un mode endémo-épidémique. Les génotypes 1 et 2 sont présents chez l'homme dans les régions d'endémie alors que le génotype 3 et moins fréquemment le 4 sont responsables de cas sporadiques d'hépatites aiguës dans les pays industrialisés. En 2009, l'Afssa a émis deux rapports (saisines 2009-SA-0101 ; 2009-SA-0146) soulignant le risque d'infection par le VHE suite à l'ingestion de figatelles (saucisses crues à base de foie de porc). Les recommandations issues de ces travaux et la mise en cause de produits à base de foie de porc dans les cas d'infections autochtones d'hépatite E ont souligné l'importance de disposer d'une technique sensible et fiable pour la détection du VHE dans les aliments.

La mise en place de méthodes de détection dans le domaine du diagnostic viral en hygiène alimentaire est fondée sur la détection des ARN viraux par des méthodes de RT-qPCR sensibles et spécifiques. Les deux principales difficultés rencontrées pour cette détection sont liées à la faible concentration des virus dans les aliments et à la présence de substances inhibitrices de la réaction de PCR dans les échantillons. En 2013, la spécification technique relative à la détection des norovirus et du virus de l'hépatite A dans les aliments a été publiée (ISO/TS\_15216-1, 2013; ISO/TS\_15216-2, 2013). Le virus de l'hépatite E, encore considéré comme émergent, n'avait pas été identifié comme prioritaire lors de l'initiation du travail de normalisation des méthodes de détection en virologie alimentaire. Cependant, les recommandations générales du Comité Européen de normalisation (CEN/TC275/WG6/TAG4) concernant le diagnostic viral en hygiène des aliments prévoient une série de contrôles (contrôle négatif d'extraction, contrôle du processus d'extraction de virus, contrôle positif et négatif de RT-PCR, contrôle d'inhibition de RT-PCR). L'ajout d'un contrôle de processus à chacun des échantillons à analyser

est primordial, car il permet de mesurer l'efficacité de leur traitement et d'évaluer la présence d'inhibiteurs des réactions d'amplification par PCR. La connaissance du rendement moyen obtenu pour le contrôle de processus dans une matrice donnée permet également de définir le niveau de rendement acceptable pour valider l'analyse de l'échantillon.

Dans le cadre du plan de surveillance réalisé en 2011, l'objectif de cette étude était de développer/valider une méthode d'extraction et de détection du génome viral du VHE par RT-PCR quantitative dans des matrices alimentaires contenant du foie de porc cru (figatelles et saucisses de foie) et d'analyser 70 échantillons répartis dans les quatre catégories d'aliments potentiellement à risque pour le consommateur (figatelles, saucisse de foie, foies de porcs salés et séchés, quenelles).

#### Matériels et méthodes

##### Virus de l'hépatite E, norovirus murin et échantillons du plan de surveillance

Pour développer et valider la méthode de détection du génome viral du VHE, des contaminations artificielles ont été réalisées avec la suspension virale de VHE (génotype 3f; numéro d'accès Genbank: JF718793) obtenue à partir d'un échantillon fécal de porc infecté, fourni par le laboratoire de santé animale (Anses, Maisons-Alfort). L'échantillon fécal a été suspendu dans du tampon PBS à 10 mM pH 7.4 (10 % finale (w/v)) et centrifugé à 4000 g pendant 20 min à 4°C. Le surnageant contenant les particules virales de VHE a été aliquote et conservé à -80°C. Le nombre de copies d'ARN de VHE dans la suspension virale a été déterminé par RT-qPCR en utilisant une courbe standard obtenue avec des ARN de VHE transcrits *in vitro*.

Le norovirus murin MNV-1 (CW1) a été amplifié puis titré dans les cellules RAW 264.7 (lignée de macrophages murins, ATCC TIB-71).

Dans le cadre du plan de surveillance de la contamination par le VHE (PS-VHE) des produits de charcuterie à base de foie cru de porc (DGAL/SDSSA/N2010-8330) regroupant 400 échantillons



## Méthodes

(Nicole Pavio, 2013), 70 échantillons ont été choisis de manière à conserver la répartition initiale des 400 échantillons en termes d'origine géographique et de type de produits (figatelles, saucisses de foie, foies salés séchés, pâtes à quenelles) puis analysés par RT-PCR quantitative.

### Méthode de détection quantitative du VHE dans les matrices à base de foie de porc cru

#### Elution / concentration des particules virales et extraction des ARN viraux

La matrice alimentaire (3 g) est découpée en morceaux à l'aide d'un scalpel et mise dans un sac Stomacher®. Après avoir ajouté le MNV-1 utilisé comme contrôle de processus (50000 TCID<sub>50</sub>), 30 mL d'eau distillée est ajoutée à la matrice qui est broyée au Stomacher® (2 min, 260 rpm). L'éluat est réalisé à température ambiante sous agitation pendant 10 min. L'homogénéat est clarifié par centrifugation (8000 g, 15 min, 4°C) puis les particules virales sont précipitées avec du polyéthylène glycol (PEG) (1/4 Vol) pendant 2h à 4°C et concentrées par centrifugation à 8000 g pendant 30 min. Les particules virales sont directement lysées pour extraire les ARN viraux à l'aide de l'extracteur automatique (NucliSens® easyMAG™).

#### RT-PCR quantitative

Le modèle moléculaire pour la détection du VHE est issu du modèle décrit par (Jothikumar *et al.*, 2006) ciblant la région ORF2/ORF3. Le modèle moléculaire pour la détection de MNV-1 ciblant l'ORF1 a été déterminé en utilisant le logiciel Beacon Designer software (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Les sondes Taqman pour la détection du VHE et du MNV-1 ont été respectivement marquées avec le ROX ou 6-FAM en 5', et BHQ2 ou BHQ1 en 3'.

Pour la détection du VHE, les séquences des amorces et sonde TaqMan utilisées sont:

HEV-5260-F: 5'-CGGTGGTTTCTGGGGTGAC-3'  
HEV-5330-R: 5'-AGGGGTTGGTTGGATGAATATAG-3'  
HEV-5280-T: 5'-ROX-GGGTTGATTCTCAGCCCTTCGC-BHQ2-3'

Pour la détection du MNV-1, les séquences des amorces et sonde TaqMan utilisées sont:

MNV-3193-F: 5'-CCGCCATGGTCTCGGAGAATG-3'  
MNV-3308-R: 5'-GCACAACGGCACTACCAATCTTG-3'  
MNV-3227-T: 5'-FAM-CGTCGTGCGCTCGGTCCTTGTCABHQ1-3'

Tous les essais de RT-PCR quantitative ont été réalisés sur l'appareil CFX96™ de Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France). Les réactions ont été réalisées en utilisant le kit "RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System" (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France). Les contrôles positifs contenant des ARN extraits de suspensions de virus et un contrôle négatif contenant tous les réactifs en dehors de l'extrait d'ARN étaient inclus dans chaque série d'expériences. Le programme de thermocyclage pour la RT-qPCR en une étape était de 60 min à 55°C pour la reverse transcription des ARN viraux; une étape de dénaturation de 15 min à 95°C, puis

40 cycles de 15 s à 95°C, 1 min à 60°C et 1 min à 65°C et pour la PCR. Chaque extrait d'ARN est testé non dilué et dilué au 1/10<sup>e</sup> en duplicate. Tous les échantillons sont caractérisés par une valeur de cycle seuil (Cycle threshold) (Ct). Les échantillons négatifs n'ont pas de valeur de Ct. Une courbe standard pour chaque cible virale a été produite en utilisant une gamme de dilutions de suspension virale. Les pentes (S) des droites de régression ont été utilisées pour calculer l'efficacité d'amplification (E) des réactions de RT-qPCR, selon la formule:  $E = 10^{-1/s} - 1$ . Les rendements d'extraction du VHE et du MNV-1 ont été calculés pour chaque échantillon à partir de la courbe standard correspondante.

#### Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel MATLAB (version 6.5.1).

Pour l'étude de validation de méthode, l'impact/l'effet de l'ajout du contrôle de processus MNV-1 a tout d'abord été évalué sur les rendements d'extraction du VHE par une analyse univariée de la variance (ANOVA). Puis, une analyse multi-variée a été réalisée pour évaluer l'effet de 5 facteurs expérimentaux sur les rendements d'extraction du VHE: dilution de l'échantillon, le type d'aliment (figatelles, saucisses de foie), la quantité de VHE et la variabilité inter-essai. En ce qui concerne les rendements d'extraction obtenus pour MNV-1, 4 variables ont été testées, à savoir la dilution de l'échantillon, le type d'aliment (figatelles, saucisses de foie) et la variabilité inter-essais.

#### Résultats

##### Validation de la méthode de détection du VHE dans les figatelles et saucisses de foie.

La méthode de détection du VHE a été validée sur des figatelles et des saucisses de foie artificiellement contaminées puisqu'elles représentent plus de 75 % des échantillons à analyser dans le cadre du PS-VHE. La limite de détection (LOD) du VHE et les rendements d'extraction moyens du VHE et du contrôle de processus (MNV-1) obtenus à partir de 4 répétitions d'expériences sont reportés sur le **Tableau 1**.

La présence du contrôle de processus MNV-1 n'influence pas les rendements d'extraction du VHE (ANOVA univariée; p-value = 0,10). Les rendements d'extraction moyens obtenus à partir des figatelles sont de 13,1 % pour le MNV-1 et de 18,4 % pour le VHE. Dans les saucisses de foie, les rendements d'extraction moyens sont de 2,9 % pour le MNV-1 et de 3,9 % pour le VHE. Les rendements d'extraction du VHE et du MNV-1 ne sont pas améliorés après la dilution des échantillons d'ARN au 1/10<sup>e</sup> (résultats non présentés).

Les résultats ont été analysés par une étude statistique de variance multi-variée qui montre que (i) les rendements d'extraction sont plus élevés dans les figatelles que dans les saucisses, et ce, aussi bien pour le VHE que pour le virus utilisé comme contrôle de processus (MNV-1); et que (ii) l'extraction depuis ces deux types de matrice ne génère pas d'inhibition d'amplification significative par PCR des génomes des deux virus.



## Méthodes

Tableau 1: Rendements moyens d'extraction du VHE et du MNV-1

Quatre expériences ont été réalisées et chaque échantillon a été analysé par RT-qPCR en double et le nombre d'essais positifs est indiqué entre parenthèses. La LOD<sub>100</sub> correspondant à la détection du VHE dans les quatre répétitions d'expériences est surlignée en gris. nd: non détecté.

Inocula / 3 g		Rendements d'extraction dans les figatelli (%) (Ct positif / 8)		Rendements d'extraction dans les saucisses (%) (Ct positif / 8)	
VHE	MNV-1	VHE	MNV-1	VHE	MNV-1
0	0	nd	nd	nd	nd
875	0	43,9 ± 26,9 (2/8)	nd	nd	nd
1750	0	22,8 ± 11,0 (4/8)	nd	9,8 (1/8)	nd
8750	0	14,7 ± 11,3 (7/8)	nd	3,2 ± 2,1 (2/8)	nd
17500	0	9,6 ± 6,5 (7/8)	nd	4,9 ± 2,5 (6/8)	nd
87500	0	8,7 ± 2,5 (8/8)	nd	2,7 ± 2,1 (8/8)	nd
0	50 000	nd (0/8)	11,6 ± 7,0	nd	1,6 ± 0,9
875	50 000	28,6 ± 9,4 (3/8)	13,0 ± 6,6	nd	2,0 ± 1,3
1750	50 000	35,7 ± 33,4 (6/8)	13,4 ± 7,1	nd	1,2 ± 1,1
8750	50 000	7,6 ± 5,6 (5/8)	12,1 ± 4,1	3,0 ± 1,7 (2/8)	3,1 ± 1,2
17500	50 000	5,6 ± 5,7 (6/8)	15,8 ± 7,7	2,9 ± 2,1 (2/8)	3,2 ± 0,4
87500	50 000	6,6 ± 2,0 (8/8)	12,9 ± 3,8	1,1 ± 1,0 (7/8)	6,5 ± 6,5
<b>Rendements d'extraction moyens (%)</b>		<b>18,4</b>	<b>13,1</b>	<b>3,9</b>	<b>2,9</b>

### Détection quantitative du VHE dans 70 échantillons du plan de surveillance (DGAI/SDSSA/N2010-8330)

Les résultats de l'analyse des 70 échantillons à base de foie de porc cru sont présentés sur le **Tableau 2**. La présence de génomes du VHE a été trouvée dans douze figatelles sur trente-trois et dans dix saucisses de foie sur vingt-sept, ce qui correspond à une prévalence d'environ 36 % d'aliments contaminés par le VHE. Les données quantitatives de ces échantillons retrouvés positifs pour le VHE sont reportées dans le **Tableau 3**. La charge virale du VHE dans les figatelles et les saucisses de foie est comprise entre  $4 \times 10^1$  et  $2 \times 10^6$  copies génome du VHE/g. La quantité de VHE retrouvée est  $> 10^2$  copies génomes par gramme dans 95 % des échantillons positifs,  $> 10^3$  copies génomes par gramme dans 55 % des échantillons positifs et  $> 10^4$  copies génomes par gramme dans 27 % des échantillons positifs.

Le contrôle de processus (MNV-1) a été utilisé pour contrôler toutes les étapes de l'analyse depuis l'extraction du virus de la matrice alimentaire jusqu'à sa détection quantitative par RT-qPCR. Les fourchettes de rendements d'extraction du MNV-1 obtenus pour les 70 échantillons à base de foie de porc cru sont présentées sur le **Tableau 2**.

Le rendement d'extraction du contrôle de process (MNV-1) obtenu à partir de la majorité des figatelles et des saucisses de foie analysées est  $> 1$  %. En revanche, les rendements d'extraction obtenus pour le MNV-1 à partir des deux autres catégories d'aliments (foies salés séchés et quenelles) sont tous  $< 1$  %. Pour 5 échantillons sur 10, le rendement d'extraction du MNV-1 obtenu est même inférieur à 0,1 %.

Tableau 2: Résultats des analyses des 70 échantillons du PS-VHE répartis par type d'aliments

Le nombre d'analyses positives pour le VHE et les rendements d'extraction obtenus pour le contrôle de processus MNV-1 sont indiqués.

Types de produits	Nombre total d'analyses	Nombre d'analyses VHE négatives	Nombre d'analyses VHE positives	Rendements d'extraction du MNV-1 (%)			
				< 0,1%	0,1-1%	1-10%	>10%
Figatelli	33	21	12	0	6	20	5
Saucisse de foie (sèche ou fraîche)	27	17	10	1	4	22	2
Foie salé séché	5	5	0	2	3	0	0
Quenelle et pâte à quenelle	5	5	0	3	2	0	0
Total	70	48	22	6	15	42	7



## Méthodes

Tableau 3: Quantités (copies de génomes) du VHE détectées dans les échantillons positifs du PS-VHE

Valeurs de Ct	Copies de génome VHE / 3 g	Nombre de Figatelli	Nombre de saucisses de foie
< 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

### Discussion

Dans le cadre du plan de surveillance de la contamination par le virus de l'hépatite E des produits de charcuterie à base de foie cru de porc, au stade de la production, cette étude avait pour objectif de développer et valider une méthode de détection quantitative du génome viral de l'hépatite E (VHE) dans les matrices alimentaires à risque afin d'analyser quantitativement 70 échantillons.

Les expériences préliminaires réalisées lors du développement de la méthode de détection du VHE ont souligné l'importance d'inclure une étape d'éluion/concentration des particules virales par le PEG avant l'extraction des ARN viraux (résultats non présentés). En effet, l'étape de concentration de virus est généralement indispensable dans la mesure où le taux de contamination des aliments par des virus entériques est faible. Ainsi, la concentration des virus entériques (entérovirus, virus de l'hépatite A, norovirus, adénovirus et astrovirus) à partir de produits alimentaires très diversifiés comme les salades de pâtes, viande, crème fouettée et coquillages se fait le plus souvent par la précipitation des virus au polyéthylène glycol (PEG) (Stals *et al.*, 2012). C'est également cette approche qui a été sélectionnée par le groupe de travail européen CEN/TC275/WG6/TAG4 pour détecter les norovirus et virus de l'hépatite A (VHA) dans les végétaux et les fruits rouges (ISO/TS\_15216-1, 2013; ISO/TS\_15216-2, 2013).

Les expériences de validation de la méthode de détection du VHE réalisées à partir de figatelles et saucisses de foie artificiellement contaminées ont montré que les rendements moyens d'extraction du VHE à partir de figatelles (18,4 %) sont statistiquement plus élevés que ceux obtenus à partir de saucisses de foie (3,9 %). L'ordre de grandeur de ces rendements est en adéquation avec ceux décrits pour la détection du virus de l'hépatite A et des norovirus à partir de végétaux et fruits (Blaise-Boisseau *et al.*, 2010; Martin-Latil *et al.*, 2012a).

Pour valider les diagnostics viraux en hygiène des aliments, il est indispensable d'utiliser un virus témoin de processus (contrôle de processus) comme cela a été décrit dans de nombreux travaux et revues (Baert *et al.*, 2011; Coudray *et al.*, 2013; Martin-Latil *et al.*, 2012b; Stals *et al.*, 2012). Le contrôle de processus est ajouté en quantité définie à l'échantillon analysé

avant l'extraction virale et il est proposé dans les spécifications techniques (ISO/TS\_15216-1, 2013; ISO/TS\_15216-2, 2013) de valider le diagnostic viral e hygiène alimentaire suite à l'obtention d'un rendement du contrôle de processus  $\geq 1\%$ . Le virus sélectionné en tant que témoin de processus doit être un virus cultivable, sans enveloppe, à ARNsb (simple brin) de polarité positive, de taille similaire aux virus cibles afin de fournir un modèle morphologique et physico-chimique correct. Il doit également montrer une persistance dans l'environnement semblable aux virus cibles et sa présence dans les aliments à l'état naturel ne doit normalement pas être attendue. Pour cette étude, le norovirus murin (MNV-1) a été sélectionné comme virus témoin de processus comme dans de nombreuses études précédentes (Coudray *et al.*, 2013; Martin-Latil *et al.*, 2012a, b; Stals *et al.*, 2009). Des rendements d'extraction du contrôle de processus (MNV-1) supérieurs à 1 % ont été obtenus dans 80 % des figatelles et dans 83 % des saucisses de foie analysées. Pour les quenelles (5 échantillons) et les foies salés séchés (5 échantillons), les rendements d'extraction du contrôle de processus (MNV-1) obtenus sont plus faibles (< 1 %). Ces résultats confirment la nécessité d'utiliser un virus témoin de processus pour valider la méthode de détection du VHE dans chaque type d'aliment et suggèrent que l'amélioration de la détection du VHE dans les quenelles et foie salés séchés doit être poursuivie dans des futurs travaux.

La forte prévalence (un tiers des produits testés sont positifs pour le VHE), associée à des niveaux élevés de contamination (55 % des échantillons positifs ont un niveau de contamination supérieur à  $10^3$  copies génomes par gramme), supportent la possibilité d'une transmission du VHE à l'homme *via* ces aliments. Bien que la méthode de détection validée repose sur la détection des génomes viraux et ne permet donc pas de se prononcer sur la présence de particules infectieuses du VHE dans les échantillons analysés, l'infectiosité du VHE issus de figatelles a été montrée à l'aide d'un modèle cellulaire (Berto *et al.*, 2013).

En conclusion, le développement de méthodes en routine permettant la mise en évidence du caractère infectieux du VHE est nécessaire pour une meilleure appréciation du risque viral. Néanmoins, il semble utile de mener une surveillance des réservoirs animaux du VHE, de mettre en place des recommandations pour éviter l'entrée du VHE dans les aliments, et de rappeler les bonnes pratiques de cuisson pour limiter le risque de contamination humaine. Il est nécessaire de valider des méthodes de diagnostic du VHE selon les types de denrées alimentaires afin de déterminer la prévalence du VHE dans l'ensemble des matrices à risque de façon fiable. Pour finir, des études complémentaires pour déterminer la probabilité d'infection en fonction de la quantité de copies génomes du VHE présent dans un échantillon seraient nécessaires pour mieux apprécier le risque viral.



## Méthodes

### Remerciements

Cette étude a été partiellement financée par la Direction générale de l'Alimentation. Les auteurs remercient Julien Santolini (†) qui a organisé le plan de surveillance nationale du VHE et Corinne Danan pour ses conseils avisés et sa revue critique du manuscrit. Nous remercions le Nicole Pavio pour nous avoir fourni l'échantillon de fèces de porc contaminé par le VHE. La souche de norovirus murin MNV-1 (CW1) a été fournie par H. Virgin de l'Université de Washington (USA) au laboratoire de Fougères de l'Anses (France).

### References

Baert, L., Mattison, K., Loisy-Hamon, F., Harlow, J., Martyres, A., Lebeau, B., Stals, A., Van Coillie, E., Herman, L., Uyttendaele, M., 2011. Review: norovirus prevalence in Belgian, Canadian and French fresh produce: a threat to human health? *Int J Food Microbiol* 151, 261-269.

Berto, A., Grierson, S., Hakze-van der Honing, R., Martelli, F., Johne, R., Reetz, J., Ulrich, R.G., Pavio, N., Van der Poel, W.H., Banks, M., 2013. Hepatitis E virus in pork liver sausage, France. *Emerg Infect Dis* 19, 264-266.

Blaise-Boisseau, S., Hennechart-Collette, C., Guillier, L., Perelle, S., 2010. Duplex real-time qRT-PCR for the detection of hepatitis A virus in water and raspberries using the MS2 bacteriophage as a process control. *J Virol Methods* 166, 48-53.

Coudray, C., Merle, G., Martin-Latil, S., Guillier, L., Perelle, S., 2013. Comparison of two extraction methods for the detection of hepatitis A virus in lettuces using the murine norovirus as a process control. *J Virol Methods*.

ISO/TS\_15216-1, 2013. Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR -- Part 1: Method for quantification International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland

ISO/TS\_15216-2, 2013. Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR -- Part 2: Method for qualitative detection. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Robertson, B.H., Meng, X.J., Hill, V.R., 2006. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods* 131, 65-71.

Martin-Latil, S., Hennechart-Collette, C., Guillier, L., Perelle, S., 2012a. Comparison of two extraction methods for the detection of hepatitis A virus in semi-dried tomatoes and murine norovirus as a process control by duplex RT-qPCR. *Food Microbiol* 31, 246-253.

Martin-Latil, S., Hennechart-Collette, C., Guillier, L., Perelle, S., 2012b. Duplex RT-qPCR for the detection of hepatitis E virus in water, using a process control. *Int J Food Microbiol* 157, 167-173.

Nicole Pavio, A.T., Thiziri Merba, Bouteiller Laurine, Soline Tabouis Chaumien, Corinne Danan 2013. Prévalence et facteurs de risque du virus de l'hépatite E dans les aliments à base de foie cru de porc. BE Santé animale – alimentation.

Stals, A., Baert, L., Botteldoorn, N., Werbrouck, H., Herman, L., Uyttendaele, M., Van Coillie, E., 2009. Multiplex real-time RT-PCR for simultaneous detection of GI/GII noroviruses and murine norovirus 1. *J Virol Methods* 161, 247-253.

Stals, A., Baert, L., Van Coillie, E., Uyttendaele, M., 2012. Extraction of food-borne viruses from food samples: a review. *Int J Food Microbiol* 153, 1-9.

#### Réalisation graphique et éditoriale

**Directeur de la publication:** Marc Mortureux

**Rédacteur en chef:** Paul Martin

**Comité de rédaction:** Maria Laura Boschiroli (Anses, France), Sabine Delannoy (Anses, France), Bertrand Lombard (Anses, France), Stefano Morabito (ISS, Italie), Françoise Petter (OEPP), Elisabeth Repérant (Anses, France), Hélène Gayon (SCL, France), Thierry Van Den Berg (Coda Cerva, Belgique), Eric Verdon (Anses, France), Jan Zmudzki (NVRI, Pologne)

**Création/réalisation:** Julien Vigneron, Céline Leterq, Fabrice Coutureau, Parimage

**ISSN** 2110-5294