



Recherche

Cas autochtones d'hépatite E : d'où vient le virus ? Impact des traitements des lisiers de porcs sur la réduction de la charge virale et estimation de la prévalence du virus dans les sept matrices alimentaires

Fabienne Loisy-Hamon^{1,2} (fabienne.loisy@ceeram.com), Géraldine Leturnier¹

1. Ceeram, La Chapelle-sur-Erdre, France

2. BioMérieux Industry, Marcy L'Étoile, France.

Résumé

Au cours des dernières années, plusieurs cas autochtones d'hépatite E et une forte séroprévalence ont été rapportés. Une source potentielle de contamination est la consommation de produits de porc ou d'aliments contaminés par une source environnementale. L'objectif de l'étude était d'évaluer la prévalence de VHE dans les échantillons alimentaires, et non seulement l'évaluation des produits de porc considérés plus à risque ainsi que l'évaluation des lisiers de porcs comme source potentielle de contamination de l'environnement.

Une vaste étude de prévalence a été menée sur 440 échantillons d'aliments collectés chez des industriels de l'agro-alimentaire à l'échelle internationale en 2011 dans le cadre de la prise en compte du risque viral dans leur plan HACCP, comprenant des mollusques bivalves, des fruits, des légumes, des herbes et des épices, de l'eau de process, des plats préparés et des saucisses de foie de porc. Le kit hepatitisE@ceeramTools™ a été utilisé pour la détection par RT-PCR en temps réel. Les échantillons ont également été testés pour norovirus GI, GII et le virus de l'hépatite A. Une étude a également été menée sur les lisiers de porc recueillis auprès de trois élevages porcins positifs pour le VHE afin d'évaluer la persistance du virus dans le lisier après différents traitements.

Les résultats obtenus pour le VHE montrent une prévalence de 0,9 % avec deux échantillons de saucisse de foie de porc positifs, un de poivre et un de poudre de laurier. Sur ces 440 échantillons, les niveaux de prévalence de norovirus GI, GII et VHA étaient de 2,95 %, 8,6 % et 0,45 % respectivement. En ce qui concerne les lisiers de porc non traité, 67 % des prélèvements étaient positifs pour le VHE. Après traitement, 27 % de lisier de porc était encore positifs pour le VHE. Parmi ces prélèvements positifs, 30 % provenaient de lisiers de porc traités par compostage, 50 % après déshydratation et seulement 5,6 % après traitement par digestion anaérobie. Les niveaux de contamination étaient faibles.

À notre connaissance, cette étude est la première menée sur la prévalence du VHE dans des échantillons alimentaires aussi divers pour essayer de comprendre l'origine de cas autochtones d'hépatite E et l'origine possible de la contamination dans les échantillons alimentaires. Nos résultats démontrent que la prévalence du VHE dans les échantillons alimentaires est du même ordre que celle observée pour le VHA. L'épandage de lisier de porc traité ne semble pas être une pratique agricole à risque pour le VHE. Tous ces résultats démontrent que les types d'aliments autres que les produits à base porc ne semblent pas être une source potentielle de contamination. Cette étude pourrait être utile pour évaluer l'origine des cas d'hépatite E humaine, et mieux prévenir les cas autochtones de VHE.

Introduction

Le virus de l'hépatite E (VHE) est responsable d'épidémies d'hépatites aiguës à transmission entérique chez l'Homme, assez similaires à l'hépatite A mais généralement plus sévères (Emerson and Purcell, 2003). Bien que dans la plupart des cas l'hépatite guérisse spontanément, des cas mortels peuvent survenir (un à deux pour cent des cas). Le risque d'hépatite fulminante chez les femmes enceintes peut atteindre 25 % même si de tels cas ont jusqu'ici été décrits uniquement dans les pays émergents (Smith, 2001). Des hépatites chroniques sont aussi de plus en plus fréquemment rapportées, et tout particulièrement chez les patients immunodéprimés (Bihl and Negro, 2009; Gerolami *et al.*, 2008; Kamar *et al.*, 2008). Récemment, de nombreux cas sporadiques d'hépatite E, non liés à des voyages en zone d'endémie, ont été rapportés dans des pays industrialisés. En France, le centre national de référence des hépatites entéro-transmissibles décrit un accroissement important du nombre de cas humains d'hépatite E entre 2002 (9 cas, création du CNR) et 2011 (249 cas), apparenté en partie à un meilleur diagnostic de ce pathogène (Nicand *et al.*, 2011; Roque-Afonso, 2011).

En 1997, Meng *et al.* ont mis en évidence des similitudes génétiques entre un nouveau virus porcin (i.e. VHE porcin) et une souche de VHE humaine (Meng *et al.*, 1997). Cette découverte a suggéré l'implication potentielle de souches de VHE porcins dans les cas humains autochtones. De nombreuses études ont ainsi été conduites dans différentes populations animales et ont montré que le VHE est susceptible d'infecter de nombreuses espèces animales, dont le porc, son réservoir principal (Cooper *et al.*, 2005; de Deus *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 1997). Un lien direct entre la consommation de produits infectés et des hépatites E humaines autochtones a été rapporté à la suite de consommation de viande de cerf crue (Tei *et al.*, 2003), de viande de sanglier crue (Tamada *et al.*, 2004) ou de saucisses de foie crues dénommées figatelli (Colson *et al.*, 2010).

Les mollusques bivalves peuvent concentrer les particules virales au cours du processus de filtration qui accompagne leur mode de nutrition. Le virus de l'hépatite E a été détecté dans des coquillages collectés dans différentes régions d'Europe ou en Asie (Crossan *et al.*, 2012; Donia *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2007). Maunula *et al.* (2013), ont décrit la présence de VHE dans les framboises.

Les porcs infectés par le VHE excrètent le virus pendant trois à quatre semaines en quantité importante. Les pratiques d'élevage porcin permettent donc l'exposition des animaux à de fortes doses de VHE (Kasorndorkbua *et al.*, 2005). Le statut du VHE dans le fumier de lisier de porc stocké dans les installations, telles que les fosses en béton et des bassins de terre, reste à étudier, ainsi que l'impact du traitement des lisiers sur l'élimination du virus de l'hépatite.



Recherche

Les objectifs de cette étude étaient les suivants :

- évaluer la prévalence de VHE, en comparaison avec les prévalences observées pour les norovirus et le virus de l'hépatite A dans des matrices alimentaires diverses prélevées chez des industriels dans le cadre d'un plan HACCP en incluant un minimum de produits à base de foie de porc ;
- déterminer si l'épandage des produits issus des traitements de lisiers de porcs présentait une pratique à risque pouvant conduire à la contamination de végétaux.

Matériels et méthodes

Virus de l'hépatite E, Mengo virus et échantillons

Les développements et validations de la méthode de détection du virus de l'hépatite E ont été réalisés avec le standard international WHO existant pour ce virus. Ce standard correspond à un plasma positif en VHE et titré en unité internationale à 250 000 UI/mL. Des selles de porcs positives en VHE fournies par l'Anses (Dr Nicolas Rose, unité Épidémiologie et bien-être du porc, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, France) ont permis de compléter ces validations.

Le Mengo virus VMC0, utilisé comme contrôle de process, provient du kit ceeramTools® Mengo Extraction Control (Ceeram, La Chapelle/Erdre, France). En accord avec l'ISO/TS 15216, un rendement de 1 % en Mengo virus valide le process. La recherche de virus alimentaire tels que Norovirus (NV), virus de l'hépatite A et E (VHA et VHE) par RT-PCR en temps réel a été réalisée sur 441 échantillons de matrices alimentaires variées (**Tableau 1**) soumises à analyse virale dans le cadre des plans HACCP d'entreprises agro-alimentaires établies en Europe permettant d'établir des données de prévalence.

Les matrices analysées lors de cette étude sont les suivantes : 230 échantillons d'herbes et épices variées, 77 fruits variés, 62 eaux de process, 36 coquillages (huîtres et moules), 20 plats préparés (ne contenant pas de porcs), 12 légumes et 4 figatelles.

Ces matrices analysées ont majoritairement une origine européenne mais également asiatique ou africaine (pour les épices par exemple). Les informations précises sur la provenance des échantillons sont cependant difficiles à obtenir et ne sont pas détaillées dans cet article.

122 échantillons de selles et lisiers de porcs et 44 échantillons de composts issus d'une étude sur le terrain ont été récoltés pour évaluer l'impact des différentes méthodes de traitement du lisier de porc (épandage, compostage, méthanisation, déshydratation). Deux réseaux de collectes ont été utilisés : un réseau privé de laboratoires vétérinaires du Morbihan et l'Anses (Dr Nicolas Rose). Les prélèvements ont été réalisés à différentes étapes de traitement du lisier dans des fermes porcines situées en Bretagne. Le procédé de traitement a été évalué par prélèvement d'échantillons aux différentes étapes en fonction du traitement appliqué : matières fécales, compost, eaux brutes et traitées, et eaux boueuses semi-liquides issues de lagunage.

Elution / concentration des particules virales dans les matrices alimentaires et extraction des ARN viraux

Pour les échantillons de coquillages, fruits/légumes et herbes/épices, la méthode développée dans la norme ISO/TS 15216 a été appliquée. Brièvement, après ajout de Mengo virus

VMC0, un traitement à la protéinase K est réalisé sur 2g de tissus digestifs de coquillages par incubation 1h à 37°C puis 15 min à 60°C. Après centrifugation à 3000 g à température ambiante pendant 5 min, le surnageant est collecté. La lyse des capsides virales est réalisée sur 500 µL de surnageant en utilisant le tampon de lyse NucliSens® (BioMérieux) par incubation à 56°C pendant 30 min. Les ARNs sont ensuite extraits et purifiés avec les réactifs NucliSens® (BioMérieux) selon les recommandations du fournisseur.

À 25 g d'échantillons de fruits ou légumes et 5 g d'herbes séchées ou d'épices sont ajoutés 40 mL de tampon TGEB (tampon Tris Glycine, extrait de bœuf, pH 9,5) et le contrôle d'extraction Mengo virus VMC0. Les sacs sont mis sous agitation constante 20 minutes à température ambiante. Le surnageant obtenu est centrifugé 20 min à 10000 g à 4°C. Le pH est ajusté à 7,2 +/- 0,2. Les particules virales sont précipitées avec du polyéthylène glycol (PEG) (1/4 Vol) sous agitation pendant 1h à 4°C puis centrifugés 30 min à 4°C à 10000 g. Le culot est ensuite mis en suspension dans 500 µL de PBS1X puis clarifié par chloroforme/butanol. Après 15 min de centrifugation à 13500 g à 4°C, la phase aqueuse supérieure est conservée pour la lyse. Les acides nucléiques sont extraits comme décrit précédemment.

Pour les échantillons d'eau de process majoritairement chargés en particules, une méthode alternative, plus adaptée que la norme ISO/TS 15216, a été appliquée. Un litre est concentré par filtration tangentielle sur cassette de filtration (Sartorius) après ajout de Mengo virus VMC0. Après rinçage de la cassette avec 20 mL de tampon glycine, un concentrat de 40 mL est obtenu. Une concentration secondaire est ensuite réalisée par incubation en PEG 50 % pendant une heure à 4°C puis centrifugation à 11000 g à 4°C pendant 20 min. Le culot est ensuite mis en suspension dans 1 mL de PBS1X puis clarifié par chloroforme/butanol. Après 15 min de centrifugation à 13500 g à 4°C, la phase aqueuse supérieure est collectée et les virus lysés puis les acides nucléiques extraits comme décrit précédemment.

En ce qui concerne les figatelles (saucisse de foie de porc cru), le process développé par le laboratoire de sécurité des aliments de Maisons-Alfort, unité Virus entériques (Martin-Latil *et al.* 2015, EuroRéférence, ce numéro) a été appliqué. Brièvement, 30 mL d'eau distillée est ajoutée à 3 g de la matrice qui est broyée au Stomacher (2 min, 260 rpm). L'élution est réalisée à température ambiante sous agitation pendant 10 minutes après ajout de Mengo virus VMC0. L'homogénat 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. L'éluat est récupéré pour la lyse.

Elution / concentration des particules virales dans les selles/lisiers et composts de porcs et extraction des ARN viraux

Une suspension de selles ou de lisiers de 10 à 50 % est préparée en PBS. La suspension est ensuite clarifiée par centrifugation à 4°C pendant 30 min à 3000 g. Le surnageant est collecté puis clarifié par une seconde centrifugation à 4°C de 15 min à 10000 g. Si le surnageant obtenu n'est pas clair, la seconde étape de centrifugation est répétée. La lyse et l'extraction des ARNs sont réalisées sur 500 µL de suspension avec les réactifs NucliSens® (BioMérieux) comme décrit précédemment.



Recherche

Pour les échantillons « solides » (exemple de compost sur sciure), 5 g d'échantillon ont été prélevés et transférés dans un sac à filtre contenant 40 mL de tampon TGEB (tampon Tris Glycine, extrait de bœuf, pH 9,5). Les sacs sont mis sous agitation constante 20 min à température ambiante. À travers le filtre, le surnageant est récupéré puis centrifugé 20 min à 10 000 g à 4°C. Le pH du surnageant obtenu est ajusté à 7,2 +/- 0,2. Ensuite, 10 mL de PEG-NaCl 5X sont ajoutés à 40 mL de surnageant et mis sous agitation pendant 1h à 4°C puis centrifugés 30 min à 4°C à 11 000 g. Le culot est ensuite mis en suspension dans 1 mL de PBS1X puis clarifié par chloroforme/butanol. Après 15 min de centrifugation à 13 500 g à 4°C, la phase aqueuse supérieure est collectée et les virus lysés puis les acides nucléiques extraits.

Pour les échantillons « semi-liquides » (prélèvements dans bassin de décantation et bassin de lagunage), un protocole proche de celui réalisé pour l'extraction du VHE dans des selles ou des lisiers est appliqué. 3 mL d'échantillons sont prélevés pour suivre le protocole décrit précédemment.

RT-PCR quantitative

Les extraits d'acides nucléiques obtenus sont testés avec le kit de RT-PCR en temps réel HepatitisE@ceeramTools™ en suivant les recommandations fournisseur sur les appareils SDS7300 ou SDS7500 (Applied biosystems). Sur les extraits d'ARN issus de matrice alimentaire ont également été recherchés les NoVGI et GII et le VHA avec les kits de RT-PCR en temps réel norovirusGI@ceeramTools™, norovirusGII@ceeramTools™ et HepatitisA@ceeramTools™ (ceeram, La Chapelle/Erdre, France). Des 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 ont été inclus dans chaque série d'expériences. Le contrôle interne d'amplification (IPC) contenu dans le kit HepatitisE@ceeramTools™ permet de valider chaque réaction. De plus, chaque extrait d'ARN est testé non dilué et dilué au 1/10^e en duplicat. Tous les échantillons sont caractérisés par une valeur de cycle seuil (cycle threshold) (Ct). Une courbe standard pour chaque cible virale a été produite en utilisant une gamme de dilutions de suspension virale. Les rendements d'extraction du Mengo virus ont été calculés pour chaque échantillon à partir de la courbe standard correspondante.

Résultats

Evaluation de la prévalence du VHE dans les aliments

Le plan d'échantillonnage réalisé pour l'étude de prévalence comprend l'ensemble des matrices à risque décrit dans l'ISO/TS 15216 et dans la directive sur l'application des principes généraux d'hygiène alimentaire à la maîtrise des virus dans les aliments. Ces échantillons ont été analysés dans le cadre d'autocontrôle pour la prise en compte du risque viral dans un plan HACCP. Le nombre d'échantillons par type de matrice alimentaire a cependant été dépendant des activités de production des entreprises agro-alimentaires liées à cette étude.

Sur les 441 échantillons analysés, sept types de matrice étaient représentés. Les analyses ont été réalisées en 2011. Pour l'ensemble de ces échantillons, un rendement minimum de 1 % du Mengo virus vMCO a été obtenu permettant de valider les résultats obtenus.

Parmi les 441 échantillons analysés, la présence de génomes du VHE a été trouvée dans deux figatelles sur quatre et dans deux herbes et épices sur 230, ce qui correspond à une prévalence d'environ 0,9 % d'aliments contaminés par le VHE. La prévalence pour l'ensemble des échantillons analysés ne comprenant pas de porcs est de 0,46 % et de 0,9 % pour les échantillons d'herbes et épices uniquement contre 50 % pour les échantillons de figatelles à base de foie de porc. Les Ct obtenus pour les échantillons de figatelles sont de 31,23 correspondant à une quantité de 4 775 copies de génomes/g et 30,18 correspondant à 9 603 copies de génomes/g. Les Ct des échantillons de poivre et de poudre de laurier sont de 36,4 et 37,2 respectivement. La charge virale de ces échantillons n'est pas quantifiable, elle est inférieure à 500 copies de génome/prise d'essai, ce qui correspond à la limite de quantification de la méthode.

Le génotypage des échantillons identifiés positifs n'a pas été effectué car la charge virale trop faible ne permet pas d'obtenir suffisamment de matériel pour un résultat exploitable.

Sur les mêmes échantillons, les taux de prévalence pour Norovirus GI, Norovirus GII et le virus hépatite A étaient de 2,95 %, 8,6 % et 0,45 % respectivement. Le nombre d'échantillons positifs et la prévalence par matrice analysée est détaillé dans le **Tableau 1**.

Pour la matrice la plus représentée dans cette étude, les herbes et épices, le taux de prévalence pour VHE, VHA et NoVGII est du même ordre (<1 %). Pour NoVGI, 8 échantillons ont été identifiés positifs sur 230 analysés, correspondant à une prévalence, plus élevée que pour les autres virus, de 3,5 %.

Tableau 1. Données de prévalence sur les matrices alimentaires analysées

Type de matrice	Nombre d'échantillons analysés	Nombre de positifs VHE	Prévalence HEV (en %)	Autres virus alimentaires Nombres d'échantillons positifs (prévalence en %)		
				NoVGI	NoVGII	VHA
Herbes et épices	230	2	0,9	8 (3,50)	1 (0,45)	1 (0,45)
Fruits	77	0	0	0 (0)	2 (2,60)	0 (0)
Eaux de process	62	0	0	0 (0)	3 (4,85)	0 (0)
Coquillages (huîtres, moules)	36	0	0	5 (13,9)	32 (88,9)	0 (0)
Plats préparés	20	0	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Légumes	12	0	0	0 (0)	0 (0)	1 (8,3)
Figatelles	4	2	50	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total	441	4	0,9	13 (2,95)	38 (8,6)	2 (0,45)



Recherche

Evaluation des traitements des lisiers de porc sur l'abattement en charge virale du VHE

Parmi les 20 élevages sélectionnés initialement, trois élevages (a, b et c) se sont révélés positifs à des taux de VHE suffisamment élevés pour réaliser l'étude. Un total de 123 échantillons de lisiers bruts prélevés dans les fosses ou sous les animaux dans différentes salles a été analysé. La présence d'acides nucléiques du VHE a été identifiée dans 82 échantillons, soit 67 % d'échantillons de lisiers positifs. Les résultats obtenus sur les lisiers pour les différents élevages sont présentés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2. Échantillons de lisiers et lisiers traités analysés par élevage

	Nombre échantillons	Nombre lisiers	Nombre lisiers positifs	Nombre d'échantillons issus traitement	Nombre d'échantillons issus traitement positifs
Élevage a	58	48	26	10	3
Élevage b	70	54	43	16	11
Élevage c	38	20	13	18	1
Total	166	122	82	44	12

Parmi ces échantillons positifs, la concentration en virus est cependant variable. Pour l'élevage a, les niveaux de contamination dans les lisiers non traités observés s'échelonnent entre absence de détection et $1,46 \cdot 10^6$ copies de génomes/g avec une moyenne plus faible sur l'ensemble de l'élevage à $2,26 \cdot 10^4$ copies de génomes/g. Concernant l'élevage b, les niveaux de contamination dans les lisiers non traités observés s'échelonnent entre absence de détection à $3,97 \cdot 10^5$ copies de génomes/g avec une moyenne de $2,53 \cdot 10^4$ copies de génomes/g pour l'ensemble de l'élevage. Pour l'élevage c, les niveaux de contamination dans les lisiers non traités varient entre une absence de contamination et $7,74 \cdot 10^3$ copies de génomes/g avec une moyenne de $1,5 \cdot 10^3$ copies de génomes/g pour les échantillons positifs, pour l'ensemble de l'élevage.

Chacun des élevages possédant un système de traitement propre, trois types de traitements ont été évalués. L'élevage a sélectionné utilise un traitement des lisiers par compostage sur sciure.

L'élevage b utilise une station de traitement de déshydratation des lisiers conduisant à trois types de produits pouvant être exploités : compost fermenté, surnageant de bassin de décantation, eau de lagunage.

L'élevage c utilise également une station de traitement de digestion anaérobie du lisier conduisant à trois types de produits pouvant être exploités : lisier brut, lisier traité et eau de lagunage. Les résultats obtenus dans les différents élevages figurent dans le **Tableau 3**.

Sur les 166 échantillons analysés, 122 sont des échantillons de lisiers et 44 sont des échantillons issus de traitement des lisiers. Sur ces 122 échantillons, 82 (67 %) ont été identifiés comme positifs en VHE avec des niveaux de contamination allant de 118 copies de génome/g à $1,46 \cdot 10^6$ copies de génomes/g.

Pour les échantillons issus des traitements, la présence du VHE a été identifiée dans 12 échantillons soit 27 % des échantillons issus de traitement à des niveaux de concentration allant de 85 copies de génome/g à $3,34 \cdot 10^4$ copies de génomes/g.

Dans l'élevage a traitant les lisiers par compostage sur sciure, sur les dix composts analysés, trois ont été trouvés positifs en VHE avec des niveaux de contamination faible de 17 à 740 copies de génomes/g

Dans l'élevage b utilisant une station de traitement des lisiers, sur les six échantillons de compost testés, trois ont été trouvés négatifs. Pour les trois autres, des contaminations de 100 à 6680 copies de génomes/g ont été détectées. Quatre échantillons de bassins de décantation ont été testés : tous présentaient une contamination positive en VHE allant de 80 000 à 600 000 copies de génomes/mL. Pour l'échantillon de bassin de lagunage testé, 1 030 copies de génome/mL ont été détectées.

Dans l'élevage c, pour les six échantillons de lisier brut prélevés dans la station, un seul a été identifié comme positif à 416 copies de génome/g. Pour les douze autres échantillons prélevés dans la station correspondant au lisier traité ou bassin de lagunage, aucun échantillon n'a été identifié positif.

En moyenne, la quantité de VHE détectée dans les échantillons de lisiers traités est plus faible que dans les échantillons de lisiers non traités.

De manière plus détaillée, les niveaux d'abattement en VHE sont décrits dans le **Tableau 3**.

Tableau 3. Bilan de l'impact des traitements

	Lisier brut charge virale		Traitement			Abattement logarithmique de la charge virale (charge initiale - charge après traitement)
			Type de traitement	Charge virale après traitement		
	Copies/g	Log10		Copies/g ou mL	Log10	
Élevage a	$2,26 \cdot 10^4$	4,35	compostage	294	2,47	1,88
Élevage b			compost fermenté	4 117	3,61	0,79
Élevage b	$2,53 \cdot 10^4$	4,4	surnageant de décantation	$2 \cdot 10^4$	4,3	0,1
			bassin de lagunage	1 030	3,01	1,39
Élevage c	$1,5 \cdot 10^3$	3,17	lisier brut après traitement anaérobie	416	2,62	0,56
			lisier traité	0	0	3,17
			bassin de lagunage	0	0	3,17



Recherche

Dans l'élevage a traitant les lisiers par compostage sur sciure, un abattement logarithmique de la charge virale de 1,88 est observé.

Dans l'élevage b utilisant une station de traitement, l'abattement moyen sur l'ensemble des échantillons traités est de 0,76. L'abattement est de 0,79 dans le compost fermenté, 0,1 dans le surnageant de décantation et de 1,39 dans le bassin de lagunage.

Dans l'élevage c, un abattement moyen de 3,29 a été calculé. L'abattement est de 0,56 dans le lisier brut et de 3,17 dans le lisier traité comme dans le bassin de lagunage.

Discussion

La première partie de l'étude avait pour objectif d'évaluer la prévalence du VHE dans différentes matrices alimentaires et non seulement les produits identifiés à risque à base de porc. Cette vaste étude sur 441 échantillons a mis en évidence une prévalence de 0,9 % de VHE dans l'ensemble des matrices alimentaires. Ce taux de prévalence est inférieur à celui observé pour les norovirus dans ces mêmes échantillons. Cependant, il est du même ordre que celui trouvé pour le virus de l'hépatite A. Dans les travaux réalisés par Maunula *et al.* (2013), une prévalence de 0,98 % du VHE est décrite dans les framboises. Ces données sur la framboise sont en corrélation avec le taux de prévalence global identifié dans cette étude.

La prévalence de VHE dans la matrice la plus représentée de cette étude, 230 échantillons d'herbes et épices est identique au taux de prévalence retrouvé dans l'ensemble des échantillons. Par ailleurs, le taux de prévalence de VHA et NoVGII de 0,45 % est comparable aux données retrouvées pour VHE contre 3,5 % pour NoVG1. Ces herbes et épices sont principalement produites dans des zones tropicales d'Afrique, d'Amérique du Sud et d'Asie, le plus souvent de manière traditionnelle. Ces produits sont exposés à de nombreuses sources de contamination, notamment microbiologique: irrigation avec de l'eau de qualité sanitaire insuffisante, contact avec la terre et avec des amendements biologiques non traités, manipulation par des agriculteurs/cueilleurs potentiellement vecteurs de contamination. Le caractère zoonotique du VHE peut également laisser supposer une contamination animale contrairement au VHA et aux Norovirus qui ne possèdent pas de réservoirs animaux. L'analyse des données bibliographiques relatives à la qualité microbienne de ces matières premières montre que les échantillons présentent une contamination extrêmement diversifiée avec la présence de bactéries d'origine entériques, de levures et de moisissures en quantités importantes notamment dans les produits non traités (McKee *et al.*, 1995; Garcia *et al.*, 2001; Omafuvbe *et al.*, 2004; Hara-Kudo *et al.*, 2006; Choo *et al.*, 2007). Les données obtenues dans notre étude confirment le caractère potentiellement à risque de ces matrices par la présence de virus entériques. Ces données doivent cependant être relativisées, la charge virale de ces échantillons est très faible et doit être mise en corrélation avec la dose infectieuse humaine.

Concernant les autres matrices, Serracca *et al.* (2012) n'ont pas démontré la présence de VHE dans les plats préparés

(110 échantillons). Ces résultats confirment ceux de notre étude sur ce même type de matrice alimentaire. Aucun échantillon de mollusques testés n'a été trouvé positif en VHE. A contrario, sur 153 échantillons de mollusques testés, Diez-Valcarce *et al.* (2012) ont démontré un taux de positivité en VHE de 3 %. Ces données soulignent que les mollusques bivalves peuvent constituer des matrices plus à risque pour le VHE comme pour les norovirus GI et GII et le virus hépatite A en raison de leur caractère filtreur pouvant concentrer les virus présents dans un environnement contaminé. Dans notre étude, deux des échantillons de produits à base de foie de porc cru (figatelle) sur quatre présentaient une contamination en virus de l'hépatite E. Ces données sont en accord celles de Martin-Latil *et al.* (EuroRéférence, 2015, ce numéro) pour lesquelles un produit à base de foie de porc sur trois présentait une contamination en VHE. Les données de cette étude ont permis de mettre en évidence un taux de prévalence de VHE équivalent au VHA ainsi qu'une variabilité de la présence du virus en fonction des matrices analysées.

L'évaluation des lisiers de porcs comme source potentielle de contamination de l'environnement et des aliments a fait l'objet de la deuxième partie cette étude. Trois élevages de porcs ont été identifiés comme positifs avec l'avantage de posséder trois systèmes de traitement du lisier distincts. Les niveaux moyens d'ARN de virus de l'hépatite E retrouvés dans les différents élevages sont relativement constants (10^4 copies de génome par gramme de lisier) sauf pour l'élevage c où une charge virale inférieure a été détectée (10^3 copies de génome par gramme de lisier). Les charges retrouvées dans les produits finaux issus des traitements sont relativement faibles voire très faibles pour l'élevage c, où la charge virale était initialement plus faible. Ces données sont en corrélation avec les études publiées (Kasorndorkbua *et al.*, 2005; McCreary *et al.*, 2008; Garcia *et al.*, 2013).

Le traitement par compostage utilisé pour l'élevage a semblé relativement efficace puisqu'une très faible concentration d'ARN viral est retrouvée dans le produit final. Garcia *et al.* (2013) ont démontré qu'après compostage, le produit final ne présentait pas de contamination en VHE et suggère une utilisation sans risque en tant que fertilisant agricole. Le traitement utilisé pour l'élevage c semble efficace puisqu'une très faible contamination a été retrouvée dans un seul produit final. Pour l'élevage b, les niveaux de contamination retrouvés dans les différents produits de traitement semblent plus à risque. Les résultats retrouvés dans le surnageant du bassin de décantation et dans le bassin de lagunage sont en accord avec l'étude de Kasorndorkbua *et al.* (2005). Dans leur étude, les auteurs ont montré que le VHE retrouvé dans les fosses et les lagunes était infectieux après inoculation à des cochons. L'utilisation du surnageant de bassin de décantation pour un usage agricole de type production de fruits et légumes pourrait éventuellement conduire à une contamination des végétaux. Cette dernière pourrait donc constituer un risque potentiel pour l'homme en cas de consommation. La question de la dose infectieuse humaine reste cependant posée.



Recherche

En conclusion, nos résultats démontrent que la prévalence du VHE dans les échantillons alimentaires est du même ordre que le VHA pour des matrices telles qu'herbes et épices. L'origine des contaminations avec le VHE n'a pas pu être mise en évidence, les activités humaines (directe ou indirecte avec de l'eau contaminée) ou animales (épardage, vie sauvage) pouvant être à l'origine de ces contaminations. Le suivi réalisé sur les lisiers de porcs et les produits résultant de son traitement démontre cependant que l'épardage de lisier de porc traité ne semble pas être une pratique agricole à risque pour le VHE.

Remerciements

La partie de l'étude concernant l'impact du traitement des lisiers porcins sur l'élimination du virus de l'hépatite E a été financée par l'Agence nationale de la recherche (projet HEVECODYN ANR-2010-CESA-010).

Références bibliographiques

- Bihl, F., F. Negro. 2009. Chronic Hepatitis E in the Immunosuppressed: A New Source of Trouble? *J Hepatol*, 50: 435-37.
- Choo, E., S.S., Jang, K., Kim, K.G., Lee, S., Heu, S., Ryu. 2007. Prevalence and genetic diversity of *Bacillus cereus* in dried red pepper in Korea. *J Food Prot*, 70: 917-922.
- Colson, P., P. Borentain, B. Queyriaux, M. Kaba, V. Moal, P. Gallian, L. Heyries, D. Raoult, R. Gerolami. 2010. Pig Liver Sausage as a Source of Hepatitis E Virus Transmission to Humans. *J Infect Dis*, 202: 825-34.
- Cooper, K., F. F. Huang, L. Batista, C. D. Rayo, J. C. Bezanilla, T. E. Toth, et X. J. Meng. 2005. Identification of Genotype 3 Hepatitis E Virus (HEV) in Serum and Fecal Samples from Pigs in Thailand and Mexico. Where Genotype 1 and 2 HEV Strains Are Prevalent in the Respective Human Populations. *J Clin Microbiol*, 43,: 1684-88.
- Crossan, C., P. J. Baker, J. Craft, Y. Takeuchi, H. R. Dalton, L. Scobie. 2012. Hepatitis E Virus Genotype 3 in Shellfish, United Kingdom. *Emerg Infect Dis*, 18: 2085-87.
- De Deus, N., M. Casas, B. Peralta, M. Nofrarias, S. Pina, M. Martín, J. Segalés. 2008. Hepatitis E Virus Infection Dynamics and Organic Distribution in Naturally Infected Pigs in a Farrow-to-Finish Farm. *Vet Microbiol*, 132: 19-28.
- Diez-Valcarce, M., P. Kokkinos, K. Söderberg, M. Bouwknecht, K. Willems, A.6M. de Roda-Husman, C.-H. von Bonsdorff, et al. 2012. Occurrence of Human Enteric Viruses in Commercial Mussels at Retail Level in Three European Countries ». *Food Environm Virol*, 4: 73-80.
- Donia, D., M. C. Dell'Amico, A. R. Petrinca, I. a Martinucci, M. Mazzei, F. Tolari, M. Divizia. 2012. Presence of Hepatitis E RNA in Mussels Used as Bio-Monitors of Viral Marine Pollution. *J Virol Met*, 186: 198-202.
- Emerson, S.U., R. H. Purcell. 2003. Hepatitis E Virus. *Revi Med Virol*, 13: 145-54.
- García, M., S. Fernández-Barredo, M. T. Pérez-Gracia. 2014; Detection of Hepatitis E Virus (HEV) through the Different Stages of Pig Manure Composting Plants. *Microb Biotechn*, 7 : 26-31.
- García S., F., Iracheta, N., Heredia. 2001. Microbiological Survey of retail herbs and spices from Mexican markets. *J Food Protect*, 64: 99-103.
- Gérolami, R., V. Moal, C. Picard, P. Colson. 2009. Hepatitis E Virus as an Emerging Cause of Chronic Liver Disease in Organ Transplant Recipients. *J Hepatol*, 50: 622-24.
- Hara-Kudo, Y., L.K., Ohtsuka, Y., Onoue, Y., Otomo, I., Furukawa, A., Yamaji, Y., Segawa, K., Takatori. 2006. *Salmonella* prevalence and total microbial and spore populations in spices imported to Japan. *J Food Prot*, 69: 2519-2523.
- 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 1: Method for quantitative detection. 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
- Kamar, N., J. Selves, J.-M. Mansuy, L. Ouezzani, J.-M. Péron, J. Guitard, O. Cointault, et al. 2008. Hepatitis E Virus and Chronic Hepatitis in Organ-Transplant Recipients. *N Engl J Med*, 358: 811-17.
- Kasorndorkbua, C., T. Opriessnig, F. F. Huang, D. K. Guenette, P. J. Thomas, X.-J. Meng, P. G. Halbur. 2005. Infectious Swine Hepatitis E Virus Is Present in Pig Manure Storage Facilities on United States Farms, but Evidence of Water Contamination Is Lacking. *Appl Environm, Microbiol*, 71: 7831-37.
- Martin-Latil, S., C. Hennechart-Colette, S. Perelle. 2014. Method for HEV detection in raw pig liver products and its implementation for naturally contaminated food. *Euroreference*, this issue.
- Maunula, L., A. Kaupke, P. Vasickova, K. Söderberg, I. Kozyra, S. Lazić, W. H.M. van der Poel, et al. 2013. Tracing enteric viruses in the European berry fruit supply chain. *Intern J Food Microbiol*, 167: 177-85.
- McCreary, C., F. Martelli, S. Grierson, F. Ostanello, A. Nevel, M. Banks. 2008. Excretion of Hepatitis E Virus by pigs of different ages and its presence in slurry stores in the United Kingdom. *Vet Rec*, 163: 261-65.
- McKee L.H. 1995. Microbial contamination of spices and herbs: A review. *Food Sc. Tech*. 28: 1-11
- Meng, X. J., R. H. Purcell, P. G. Halbur, J. R. Lehman, D. M. Webb, T. S. Tsareva, J. S. Haynes, B. J. Thacker, S. U. Emerson. 1997. A novel virus in swine is closely related to the human Hepatitis E Virus. *PNAS*, 94: 9860-65.
- Nicand, E., Enouf, V., Caron, M., 2005. Hépatite E, bilan d'activité du Centre national de référence des hépatites entéro-transmissibles, France, 2002-2004. *BEH*, 33, 167-168.
- Omafuvbe, B.O., D.O., Kolawole. 2004. Quality Assurance of Stored Pepper (*Piper guineense*) Using Controlled Processing Methods. *Pakistan J Nutr*, 3: 244-249.
- Roque-Afonso, A.M., 2011. Rapport d'activité du CNR des virus des hépatites à transmission entérique A et E. 36 pp.
- Serracca, L., I. Rossini, R. Battistini, M. Goria, S. Sant, G. De Montis, C. Ercolini. 2012; Potential Risk of Norovirus Infection due to the Consumption of "Ready to Eat" Food. *Food Environm Virol*, 4: 89-92.
- Smith, J. L. 2001. A Review of Hepatitis E Virus. *J Food Protect*, 64: 572-86.
- Tamada, Y., K. Yano, H. Yatsuhashi, O. Inoue, F. Mawatari, H. Ishibashi. 2004; Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *J Hepatol*, 40: 869-70.
- Tei, S., N. Kitajima, K. Takahashi, S. Mishiro. 2003. Zoonotic Transmission of Hepatitis E Virus from Deer to Human Beings. *Lancet*, 362, 9381: 371-73.
- Tian-Cheng, L., T. Miyamura, N. Takeda. 2007. Detection of Hepatitis E Virus RNA from the Bivalve Yamato-Shijimi (*Corbicula Japonica*) in Japan. *Am J Trop Med Hyg*, 76: 170-72.