

Maisons-Alfort, le 15 mars 2006

## AVIS

### **de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation qualitative du risque sanitaire pour l'homme lié à la présence dans l'eau destinée à la consommation humaine et dans divers effluents aqueux de virus *Influenza* hautement pathogène, dans le cas d'une épizootie ou dans le cas d'une épidémie humaine**

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 31 octobre 2005 par le Délégué interministériel à la lutte contre l'*Influenza* aviaire d'une demande d'avis portant sur :

- l'évaluation du risque sanitaire pour l'homme lié à la présence, dans l'eau destinée à la consommation humaine et dans divers effluents aqueux, de virus *Influenza* aviaries, en situations d'épizootie et d'épidémie humaine et les recommandations qui en découleraient ;
- les recommandations concernant les méthodes de prélèvements, d'analyse et de transport d'échantillons permettant de détecter les virus *Influenza* aviaries ;
- l'efficacité des produits et procédés de traitement des eaux usées et des eaux destinées à la consommation humaine.

Le groupe d'expertise collective d'urgence (GECU) « *Influenza* aviaire et eau » créé par décision de la Directrice générale de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments, en concertation avec le président du Comité d'experts spécialisé « Eaux » (CES « Eaux ») a été chargé de mener cette expertise. A cet effet, il s'est appuyé sur les connaissances bibliographiques disponibles sur les virus *Influenza* à la fin de l'année 2005.

#### **Champ de l'expertise**

Le champs de cette saisine se limite pour l'Afssa :

- sur le plan virologique, aux virus *Influenza* A aviaries hautement pathogènes comme par exemple les A H5N1 circulant actuellement dans les pays infectés et à l'hypothétique virus *Influenza* A humain qui émergerait par mutation ou réassortiment et pourrait être à l'origine d'une pandémie ;
- sur le plan de l'exposition potentielle des populations, aux usages alimentaires ou de toilette de l'eau délivrée aux points d'usage susceptibles d'entraîner, en conditions épidémiologiques particulières, une exposition par voie digestive ou par inhalation d'aérosols d'eau (douches, etc.).

Au plan méthodologique, il existe peu de publications sur ces types de virus et il a donc été fait référence à des virus présentant des comportements physiopathologiques et environnementaux identiques ou proches de ceux retenus dans le champ de l'expertise.

En complément, l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset) prendra en charge la partie de la saisine correspondant à son champ d'expertise, à savoir :

- l'exposition potentielle de la population liée aux eaux destinées à d'autres usages (baignade, activités nautiques, irrigation, etc. )
- l'exposition potentielle des travailleurs liée à tous les usages de l'eau.

## Définitions

### **Virus *Influenza* humains *stricto sensu***

Ces virus sont responsables des épidémies saisonnières de grippe observées chaque année en France notamment. Actuellement des virus A H1N1 et A H3N2 comportent un ensemble de gènes viraux adaptés aux cellules humaines et des glycoprotéines de surface adaptées aux récepteurs des cellules humaines.

### **Virus *Influenza* aviaires**

Ces virus sont avant tout caractérisés par :

- une adaptation aux oiseaux avec des degrés de réceptivité et de sensibilité variables,
- une absence de transmission inter-humaine probablement liée, d'une part à une absence d'affinité de l'hémagglutinine des virus aviaires pour les récepteurs cellulaires présents sur les cellules humaines et, d'autre part, à la présence d'un très grand nombre de gènes viraux dont le fonctionnement est adapté pour une répllication dans les cellules aviaires.

### **Virus *Influenza* A humain réassortant**

Ce virus serait adapté à l'homme en ayant acquis la capacité de se répliquer dans des cellules humaines et de provoquer des cas secondaires. Ce type de virus entraînerait un passage de la phase 3 à la phase 4 du risque pandémique selon la définition de l'OMS telle que reprise dans le Plan français anti-grippe. Un tel virus deviendrait de fait un nouveau virus à transmission inter-humaine. Les virus pandémiques qui ont émergé en 1957 et 1968 résultaient d'un phénomène de réassortiment génétique.

### **Virus *Influenza* A humain mutant**

Ce virus serait adapté à l'homme en résultant de mutations portant notamment sur des séquences protéiques impliquées dans l'attachement aux acides sialiques de l'hôte (Taubenberger et *al.* 2005). D'autres mutations encore non identifiées peuvent vraisemblablement contribuer à son adaptation à l'homme. Le virus de la pandémie de 1918 a probablement résulté d'un tel phénomène de mutations adaptatives.

### **Pouvoir pathogène des virus *Influenza* aviaires**

Des tests (*in vivo* et *in vitro*) standardisés au niveau international permettent de classer en deux catégories les virus *Influenza* isolés à partir d'oiseaux en ce qui concerne leur pouvoir pathogène pour l'oiseau. Les définitions suivantes sont celles de l'Office international des épizooties (O.I.E.):

- Les virus *Influenza* aviaires (VIA) dits hautement pathogènes (IAHP) ont un indice de pathogénicité intraveineux (IPIV) supérieur à 1,2 chez le poulet âgé de 6 semaines, ou bien entraînent une mortalité d'au moins 75 % chez les poulets âgés de 4 à 8 semaines infectés par voie intraveineuse. Les VIA de sous-types H5 ou H7 ne répondant pas à ces critères de pathogénicité *in vivo* mais, présentant de multiples acides aminés basiques sur le site de clivage de l'hémagglutinine, sont également considérés IAHP. Pour mémoire, la quasi totalité des IAHP appartient aux sous-types H5 et H7 de VIA ;
- Les virus *Influenza* aviaires dits faiblement pathogènes (IAFP) sont tous les autres VIA non identifiés comme hautement pathogènes après mise en oeuvre des deux types de test (*in vivo* et *in vitro*) lorsqu'il s'agit de virus de sous-type H5 ou H7, ou après mise en oeuvre du seul test *in vivo* lorsqu'il s'agit des autres sous-types.

Jusqu'à présent, les rares virus aviaires ayant présenté une forte pathogénicité pour l'homme sont tous des virus HP<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Des manifestations cliniques discrètes ont été observées lors d'infection par des virus IAFP.

## Éléments de contexte épidémiologique

### Epidémiologie animale

Les pays où une épizootie à virus *Influenza* aviaire hautement pathogène A H5N1 est confirmée au début de mars 2006 sont répertoriés sur le site de l'Office international des épizooties (OIE)<sup>2</sup>.

Il est souligné que depuis février 2006, plusieurs foyers à virus *Influenza* aviaire hautement pathogène ont été identifiés sur le territoire national et communautaire. A l'exception d'un seul foyer qui a atteint un élevage de dindes, l'ensemble des cas concerne l'avifaune sauvage.

### Epidémiologie humaine

#### **S'agissant des virus Influenza A humains**

Il n'a jamais été signalé de transmission à l'homme par l'eau délivrée au robinet de virus *Influenza* A humains responsables des épidémies saisonnières de grippe humaine tels que les virus A H3N2 et A H1N1, même durant les trois pandémies de 1918, 1957 et 1968, que ce soit par la boisson ou par l'inhalation d'aérosols lors de la prise de douche par exemple.

Pour les virus *Influenza* A humains, l'excrétion fécale, suivie par mise en culture, n'a pas été démontrée (Higgings et al. 1974).

#### **S'agissant des virus Influenza aviaires hautement pathogènes A H5N1 ou autres IAHP**

Pour les cas humains sporadiques à A H5N1, la voie de transmission largement prédominante demeure, en l'état actuel des connaissances, la voie aérienne par exposition à du matériel contaminé d'origine aviaire et l'expression clinique de ces cas correspond essentiellement à des tableaux respiratoires.

Néanmoins, les personnes contaminées par ce virus aviaire peuvent fréquemment présenter une diarrhée (De Jong et al. 2005) dans laquelle du génome viral<sup>3</sup> a été mis en évidence chez certains patients (Puzelli et al. 2005), ce qui dénote un comportement atypique par rapport aux virus *Influenza* A humains de type A H3N2 ou A H1N1. Toutefois, le constat d'une excrétion fécale de virus infectieux par l'homme n'établit pas forcément l'existence d'une transmission oro-fécale chez l'homme du virus *Influenza* aviaire hautement pathogène A H5N1.

L'observation de cas humains sporadiques d'infection par un virus *Influenza* aviaire hautement pathogène A H5N1 depuis deux ans en zone d'épizootie en Asie du Sud-Est et en Turquie est à distinguer de l'émergence hypothétique d'un virus *Influenza* A humain réassortant ou mutant à potentiel pandémique.

#### **S'agissant des virus Influenza A humain réassortant et mutant**

A ce jour, aucun virus *Influenza* A humain réassortant ou mutant à potentiel pandémique n'a été identifié, tous pays confondus.

En l'état actuel des connaissances et de la situation épidémiologique, il n'est pas possible de prévoir les caractéristiques biologiques d'un hypothétique virus *Influenza* A humain réassortant ou mutant, notamment quant à ses modalités d'infection et d'excrétion chez l'homme.

En effet, l'adaptation d'un virus à un nouvel hôte peut entraîner des changements de son tropisme cellulaire et de son cycle d'infection et, en conséquence, il n'est pas possible d'anticiper une éventuelle excrétion fécale de ce virus par l'homme.

<sup>2</sup> [http://www.oie.int/download/AVIAN\\_INFLUENZA/f\\_AI-Asia.htm](http://www.oie.int/download/AVIAN_INFLUENZA/f_AI-Asia.htm)

<sup>3</sup> L'Organisation Mondiale de la santé rapporte à ce jour un cas unique de détection de virus infectieux à partir des selles d'un patient (Writing Committee, WHO, New England Journal of Medicine, 2005).

## Evaluation qualitative du risque sanitaire pour l'homme en situation d'épizootie et en cas de transmission humaine de virus *Influenza*

### Méthodologie

Le groupe de travail s'est appuyé, pour conduire une estimation qualitative des risques sanitaires pour l'homme, sur la méthodologie des travaux de Zepeda Sein (1998), telle qu'adaptée par le CES « Santé Animale » dans le rapport « Fièvre Q : rapport sur l'évaluation des risques pour la santé publique et des outils de gestion des risques en élevage de ruminants » (Afssa 2004). Les principales hypothèses sont détaillées en Annexe 3.

Le groupe de travail a estimé :

- la probabilité d'émission virale (contamination de la ressource en eau)
- la probabilité d'exposition de l'homme aux virus (contamination aux points d'usage)
- la probabilité de survenue de l'infection chez l'homme.

### I- Estimation de la probabilité de contamination des ressources en eau par des virus *Influenza* aviaires (probabilité d'émission virale : P1)

Considérant que la probabilité de contamination des ressources en eau destinées à la production d'eau destinée à la consommation humaine dépend notamment de la typologie des eaux captées et, qu'à cet égard, les eaux superficielles<sup>4</sup> et, parmi les eaux souterraines, les eaux karstiques<sup>5</sup> sont considérées comme étant vulnérables.

Considérant que des dispositifs tels que les citernes de récupération des eaux de toiture<sup>6</sup> et les puits privés peuvent être utilisés comme des ressources en eau ;

Considérant :

- les caractéristiques des sources d'excrétion des virus *Influenza* aviaires chez des oiseaux infectés :
  - (i) excrétion fécale variable en fonction des souches et des espèces concernées et pouvant être quantitativement très importante (Webster et al. 1978) ;
  - (ii) excrétion virale liée aux sécrétions oculo-nasales ;
- la survie du virus qui, dans des conditions identiques, varie selon les souches virales (à titre d'exemple, elle se chiffre en mois, en particulier en hiver, pour les virus *Influenza* aviaires faiblement pathogènes associés aux canards (Stallknecht et al. 1990b) ;
- la conservation du pouvoir infectieux de souches de virus *Influenza* aviaires FP qui est optimale en eau douce à basse température pour des pH compris entre 7,2 et 8,2 et décroît significativement quand la température et la salinité de l'eau augmentent. L'augmentation de la salinité déplace le pH optimal de conservation du pouvoir infectieux vers des pH plus acides et, d'après Stallknecht et al. (1990a), la conservation du pouvoir

<sup>4</sup> Ce sont les eaux qui s'écoulent ou qui s'accumulent à la surface du sol. Elles comprennent les eaux intérieures (cours d'eau, plans d'eau, canaux, réservoirs) et les eaux côtières et estuariennes.

<sup>5</sup> Ce sont les eaux qui circulent dans les massifs constitués de roches carbonatées qui sont affectées par des phénomènes de dissolution importants. L'infiltration des eaux des précipitations atmosphériques dans le massif se fait à la faveur de pertes et d'engouffrements avec un entraînement de la pollution bactérienne et virale.

<sup>6</sup> Ce sont les eaux qui ruissellent sur les toitures et qui peuvent être chargées en fientes. Les volumes recueillis dans les citernes peuvent être relativement faibles et, dans ce cas, l'effet de dilution est peu important.

infectieux est optimale dans des eaux douces fraîches dont le pH est compris entre 7,4 et 7,8.

### I.1 - En situation d'épizootie

#### ➤ S'agissant de l'avifaune sauvage

Considérant que les oiseaux sauvages infectés excrètent des particules virales directement dans l'environnement aquatique et peuvent, de ce fait, contaminer d'une part les ressources en eaux superficielles et karstiques et, d'autre part, les citernes de récupération des eaux de toiture, les puits privés et les ouvrages de traitement des eaux d'alimentation non protégés ;

Considérant toutefois que si cette occurrence ne peut être exclue, elle doit être pondérée par l'effet de dilution qui accompagnerait une telle contamination de l'environnement aquatique, sauf pour les eaux des citernes de récupération des eaux de pluie et les puits privés mal protégés.

#### ➤ S'agissant de l'avifaune domestique

Considérant que :

- la durée d'incubation très courte (de l'ordre de quelques jours) et l'expression clinique rapidement manifeste chez les volailles domestiques,
- l'augmentation de la morbidité et/ou de la mortalité ou la réduction des performances zootechniques chez des espèces aviaires moins sensibles (canards),
- les dispositions réglementaires de police sanitaire actuellement en vigueur en cas de foyers d'*Influenza* aviaires qui pourraient apparaître en exploitations, voire en abattoirs,

sont de nature à permettre, sous réserve d'une vigilance optimale des acteurs de terrain et d'une bonne application de la réglementation, la maîtrise des points critiques en matière d'émission virale ;

Considérant d'une part qu'en sortie d'élevage les effluents liquides de nettoyage et de désinfection d'un foyer d'*Influenza* aviaire déclaré sont chargés en désinfectants et, d'autre part, que les eaux usées, éventuellement non traitées, provenant des élevages avant identification comme tel du foyer d'*Influenza* aviaire qui pourraient rejoindre les eaux souterraines après infiltration dans le sol ou les eaux de surface après ruissellement, feraient l'objet d'une dilution dans ces ressources,

L'Afssa estime :

➔ qu'en situation d'épizootie, la **probabilité de contamination des ressources (P1) en eau par des virus *Influenza* aviaires** serait qualifiée :

- de nulle pour les **eaux souterraines** bien protégées ;
- de nulle à négligeable pour les **eaux superficielles** et pour les **eaux karstiques** à partir des **élevages** ;
- de négligeable à élevée pour les **eaux superficielles** et pour les **eaux karstiques** à partir de **l'avifaune sauvage**, selon le degré de fréquentation de la zone par cette avifaune et la proximité de foyers d'*Influenza* aviaires avérés.

➔ qu'en ce qui concerne **les ressources captées et utilisées à titre privé, la probabilité de leur contamination** serait :

- élevée pour les eaux de toiture récupérées dans des citernes dans les zones fréquentées par l'avifaune sauvage et/ou à proximité de foyers d'*Influenza* aviaire avérés,
- de nulle à faible, pour les puits privés selon le degré de fréquentation de la zone par l'avifaune sauvage, la proximité de foyers d'*Influenza* aviaires avérés et les mesures de protection de l'ouverture des puits.

## I.2 - En situation d'infection humaine par des virus *Influenza* aviaires

Considérant que selon (i) les caractéristiques biologiques du virus *Influenza* impliqué, notamment en ce qui concerne la possibilité de son excrétion fécale, (ii) les caractéristiques épidémiologiques attendues de cette infection, il convient de distinguer deux hypothèses :

- *Hypothèse d'une infection humaine par un virus IAHP tel que le A H5N1 actuel*
  - Le nombre de cas humains attendus serait très faible<sup>7</sup> ;
  - L'éventualité d'une excrétion fécale de virus infectieux ne peut être écartée puisque les données actuelles sur le A H5N1 indiquent un faible niveau d'excrétion dans les selles (De Jong et al. 2005)
- *Hypothèse d'une infection humaine par un virus *Influenza* humain réassortant ou mutant à potentiel pandémique*
  - Le nombre de cas humains attendus pourrait être très élevé ;
  - Il n'est pas possible de prévoir si l'excrétion de ce virus par l'homme pourrait être fécale, ni si cette voie d'excrétion serait épidémiologiquement significative en termes de charge virale excrétée ;

Considérant ainsi, dans la situation hypothétique d'une infection humaine par un virus *Influenza*, qu'il n'est pas possible d'exclure la production d'eaux usées potentiellement contaminées en cas d'excrétion fécale bien que cette situation n'ait jamais été constatée lors des différentes pandémies de 1918, 1957 et 1968, pas plus que lors des épidémies hivernales annuelles ;

Considérant toutefois que, selon la réglementation, les eaux usées font l'objet d'un traitement par une installation autonome ou par une station d'épuration (STEP) collective ;

Considérant qu'une STEP traite principalement les pollutions carbonées, azotées et parfois phosphorées, véhiculées par les eaux usées ;

Considérant que, sauf exception (désinfection, lagunage, etc.), les systèmes de traitement des eaux usées ont une efficacité inégale et aléatoire au regard de la maîtrise des dangers microbiens (dont font partie les virus) et qu'en sortie de STEP, les effluents se répartissent en deux phases : l'une liquide (eaux usées traitées), l'autre solide (boues, refus de dégrillage, sables et graisses), la charge microbienne ayant tendance à se concentrer dans les boues ;

Considérant qu'en sortie de STEP les eaux, même désinfectées, peuvent rester contaminées et surtout qu'en période de fortes pluies, une partie des eaux usées peut être rejetée directement dans le milieu naturel par des déversoirs d'orage situés sur le réseau de collecte en amont de la station d'épuration et même parfois par un court-circuit hydraulique des stations d'épuration ;

Considérant que les eaux usées traitées sont, le plus souvent, rejetées dans le milieu naturel, que leurs points de rejet sont souvent choisis de façon à éviter un effet dommageable sur les usages de l'eau en aval et qu'en cas d'utilisation pour la production d'eau de consommation humaine elles font l'objet d'un traitement par une filière de haut niveau technologique ;

Considérant cependant que ces eaux peuvent également être utilisées pour l'irrigation ;

Considérant que les effluents solides sont éliminés :

- soit de façon sécurisée<sup>8</sup>,

<sup>7</sup> compte tenu de la très faible réceptivité de l'homme au virus A H5N1

<sup>8</sup> Incinération, centre de stockage des déchets ultimes, hygiénisation (chaulage, séchage thermique ou compostage) pour les déchets solides.

- soit par épandage et que, dans ce cas, ils pourraient éventuellement se diluer dans les ressources superficielles après ruissellement, ou dans les ressources souterraines après percolation à travers le sol ;

Considérant que ces différentes hypothèses de transfert de virus *Influenza* vers des ressources en eau impliquent toujours une dilution de la charge virale,

L'Afssa estime :

→ qu'il n'est pas possible, en l'état actuel des connaissances, de fixer avec un degré de certitude suffisant, une **probabilité de contamination virale des ressources en eau (P1) en cas d'infection humaine par des virus *Influenza* aviaires**.

→ que si une indication concernant cette probabilité devait cependant être donnée, l'Afssa pourrait qualifier cette probabilité :

- de nulle à négligeable en cas d'infection humaine par un virus IAHP tel que le A H5N1,
- de nulle en cas d'infection humaine par un virus réassortant ou mutant si l'excrétion de cet hypothétique virus n'inclut pas la voie fécale,

**Toutefois, si une excrétion fécale était suspectée ou démontrée, il conviendrait de reconsidérer cette évaluation en fonction des propriétés biologiques du virus qui serait alors en circulation au sein de la population humaine, notamment au regard des capacités d'excrétion de virus infectieux.**

## II – Estimation de la probabilité de présence de virus *Influenza* aviaires dans les eaux de consommation humaine au niveau des points d'usage ( probabilité d'exposition de l'homme au virus : P2)

Cette probabilité dépend notamment de l'efficacité des procédés de traitement mis en œuvre.

### II.1 - Estimation de la capacité des procédés de traitement des eaux à maîtriser le danger viral

Considérant qu'il n'existe pas, à ce jour, de données spécifiques publiées concernant l'impact des différents procédés de traitement, tant chimiques que physiques, sur les virus *Influenza* mais que toutefois, au regard des caractéristiques de ces virus, l'abattement obtenu par les filières serait probablement au moins égal à celui obtenu pour d'autres virus susceptibles d'être présents dans les eaux<sup>9</sup> ;

Considérant que les filières de traitement sont réparties en fonction des types d'eau et selon le référentiel de la base SISE-Eaux, en quatre catégories :

- A1 : traitement physique simple (filtration) et désinfection ;
- A2 : traitement physique normal, traitement chimique poussé, affinage et désinfection ;
- A3 : traitements physique et chimique poussés, affinage et désinfection ;
- N : absence de désinfection.

Considérant que, sous réserve du respect des règles de l'art (bon dimensionnement des filières et suivi attentif de leur fonctionnement), la probabilité que des virus ne soient pas correctement inactivés pourrait être qualifiée de :

- faible dans le cas d'une filière A1 ;
- négligeable à faible dans le cas d'une filière A2 ;
- nulle à négligeable dans le cas d'une filière A3.

<sup>9</sup> Les virus *Influenza* sont des virus à ARN enveloppés appartenant à la famille des orthomyxoviridae ; ils sont plus sensibles que les virus non enveloppés (poliovirus, virus de l'hépatite A...), à des oxydants chimiques tels que le chlore.

Considérant que la multiplication des traitements agissant comme barrières au sein d'une filière de traitement donnée augmente l'efficacité du traitement final et que les filières de types N et A1 ne sont pas autorisées pour le traitement des eaux superficielles et des eaux karstiques.

Considérant que la désinfection est une étape qui doit être réalisée et achevée dans l'usine de traitement et que le résiduel de désinfectant en réseau ne doit pas être destiné à pallier une insuffisance d'efficacité de la filière ;

Considérant que le résiduel de chlore en distribution est insuffisant pour désinfecter l'eau du réseau en cas de contamination microbienne directe de celui-ci (par défaillance de l'usine de traitement ou par intrusion d'eau contaminée dans le réseau) ;

Considérant que l'effet du résiduel de chlore est encore atténué lorsque la contamination s'accompagne de matières organiques dissoutes ;

Considérant que, selon les recommandations du groupe de travail « Virus transmissibles à l'homme par voie orale », l'usage combiné d'un indicateur bactérien et d'un indicateur phagique<sup>10</sup> serait de nature à permettre d'apprécier l'efficacité d'une filière de traitement et de désinfection ;

Considérant que les dispositifs tels que les citernes de récupération des eaux de toiture et les puits privés utilisés comme ressources en eau ne font pas l'objet de traitements dont l'efficacité puisse être garantie,

L'Afssa estime que compte tenu des probabilités de non inactivation des virus estimées pour chaque type de filière fonctionnant de façon optimale et des exigences réglementaires concernant l'adéquation de la filière aux types d'eau à traiter rappelées ci-dessus

→ la **probabilité (P2) que des virus *Influenza* aviaires puissent franchir le système de production et de distribution d'eau d'alimentation et atteindre les points d'usage** serait qualifiée de :

- faible pour des eaux souterraines bien protégées en raison d'une possible vulnérabilité liée à la conception des ouvrages de captage, nulle en cas d'application d'un traitement de désinfection ;
- nulle à faible pour les filières de types A2 et A3, appliquées à des eaux superficielles ou à des eaux karstiques ;
- élevée, en l'absence de traitement, pour les eaux issues de citernes de récupération d'eaux de pluie et des puits privés mal protégés.

## II.2 - Estimation de la probabilité de présence de virus *Influenza* dans l'eau de consommation humaine au niveau des points d'usage

La probabilité de présence de virus *Influenza* aviaires dans l'eau d'alimentation aux points d'usage peut être estimée par combinaison des probabilités associées aux événements « contamination de la ressource » et « non inactivation par la filière de traitement », comme suit :

<sup>10</sup> Tels que les bactériophages fécaux (ARN F-spécifiques, coliphages somatiques...).

## II.2.1 - En situation d'épizootie

Types d'eau et source de contamination	Probabilité de contamination des ressources par des virus <i>Influenza</i>	Probabilité de non inactivation par le traitement	Probabilité de trouver des virus au point de d'usage* (P2)
<b>Eaux souterraines</b> bien protégées	Nulle	Nulle à faible selon qu'il y a ou non traitement	<b>Nulle</b>
<b>Eaux superficielles et eaux karstiques</b> Contamination à partir d'élevages	Nulle à négligeable	Nulle à faible selon le type de traitement	<b>Nulle à négligeable</b>
<b>Eaux superficielles et eaux karstiques</b> contamination à partir de l' <b>avifaune sauvage</b>	Négligeable à élevée	Nulle à faible selon le type de traitement	<b>Nulle à modérée</b>
<b>Ressources privées</b> (eaux de toiture, puits)	Nulle à modérée	Elevée en l'absence de traitement	<b>Nulle à modérée</b>

\* Il est noter que ces probabilités sont estimées pour des filières de traitement adaptées à la qualité de l'eau brute à traiter et fonctionnant de façon optimale. Toute défaillance du traitement ponctuelle (par perte de maîtrise), ou permanente (par inadaptation de la filière à la ressource), est de nature à augmenter la probabilité de présence au point d'usage de virus éventuellement présents dans la ressource.

II.2.2 - En situation d'infection humaine par des virus *Influenza* aviaires ou des virus humains mutants ou réassortants

L'Afssa estime, compte tenu des probabilités de contamination des ressources en eau proposées au paragraphe I.2, que :

→ la **probabilité de présence de virus *Influenza* dans l'eau d'alimentation aux points d'usage** pourrait être qualifiée :

- de nulle à négligeable, en cas d'infection humaine par **un virus IAHP** tel que le A H5 N1, à condition qu'un traitement approprié et maîtrisé ait été réalisé en amont et que la fiabilité des ouvrages de distribution soit d'un très bon niveau.
- de nulle, pour un virus **mutant ou réassortant non excrété par voie fécale**.

**Toutefois, si une excrétion fécale était suspectée ou démontrée, il conviendrait de reconsidérer cette évaluation en fonction des propriétés biologiques du virus qui serait alors en circulation au sein de la population humaine, notamment au regard de ses capacités d'excrétion sous forme infectieuse.**

## III - Estimation de la probabilité d'infection de l'homme par exposition à de l'eau de consommation (P3)

Il s'agit de la probabilité de survenue de l'infection suite à l'exposition par voie orale ou aérienne à de l'eau contaminée par des virus *Influenza*.

Considérant que les modes d'exposition à l'eau délivrée aux points d'usage comprennent :

- la boisson et la préparation des aliments en ce qui concerne la voie orale ;

- les usages de toilette (douche, bain) en ce qui concerne la voie aérienne par le biais de formation possible d'aérosols.

### III.1 - S'agissant des virus *Influenza* en général

Considérant que la voie de transmission essentielle des virus *Influenza* chez l'homme est actuellement considérée comme aérienne, y compris pour la souche de virus *Influenza* aviaire hautement pathogène A H5N1 responsable d'épizooties et de rares cas humains en Asie du Sud-Est et en Turquie ;

Considérant que la déglutition peut conduire à la formation d'aérosols au niveau du carrefour oro-pharyngé riche en organes lymphoïdes et qu'une exposition par cette voie, assimilable à la voie aérienne, ne peut être formellement exclue ;

Considérant que la quantité minimale de tel ou tel virus *Influenza* nécessaire pour parvenir à l'infection de son hôte (dose minimale infectieuse) n'est pas connue, et que cette quantité dépend de plusieurs facteurs tels que la nature de la souche virale, la voie d'infection, la réceptivité de l'hôte, les conditions environnementales au moment de l'infection, etc. ;

Considérant que, selon les données de la littérature citée à la page 6 de l'annexe 1, l'acidité du milieu gastrique pourrait contribuer à réduire le risque de franchissement de la barrière gastrique par des virus *Influenza*, mais que cet effet du pH est variable selon les souches de virus *Influenza*.

### III.2 - S'agissant des virus *Influenza* aviaires hautement pathogènes et notamment A H5N1

Considérant que le faible nombre de cas humains recensés dans les conditions de forte pression infectieuse constatées notamment en Asie du Sud-Est (forte densité de population, conditions d'élevage et de suivi sanitaire insuffisantes, promiscuité homme-volailles domestiques, etc.) milite en faveur d'une très faible réceptivité de l'homme au virus *Influenza* aviaire hautement pathogène A H5N1 ;

Considérant que la contamination par voie digestive stricte reste non formellement démontrée chez les mammifères (félins et hommes), que pour les rares cas humains documentés où une infection par le virus *Influenza* aviaire hautement pathogène A H5N1 pourrait faire suite à l'ingestion de viande de volailles ou de sang cru de canards contaminés (Tran *et al.* 2004), l'infection par le biais des organes lymphoïdes du carrefour oro-pharyngé à partir d'aérosols formés par le bol alimentaire qui mimeraient une exposition aérienne ne peut être formellement exclue, mais que :

- d'une part, l'inoculum viral apporté par des viandes ou par des tissus crus d'animaux reconnus infectés est probablement très supérieur à la charge virale que pourrait contenir une eau acceptable pour le consommateur concernant les paramètres couleur, odeur et saveur ;
- d'autre part, ces personnes ont vécu, pendant les jours précédant l'infection, dans un environnement résultant de l'épizootie évoluant dans ces pays et qu'il ne peut être exclu qu'elles aient été exposées par voie aérienne à des aérosols produits par des oiseaux infectés (poussières souillées par des déjections notamment) ou qu'elles aient été infectées directement par voie conjonctivale lors des opérations de plumaison ou indirectement par des mains souillées suite aux opérations d'éviscération, etc.

### III.3 - S'agissant des virus *Influenza* A humains qui émergeraient par réassortiment ou mutations

Considérant, comme indiqué précédemment, qu'il n'est pas possible d'anticiper, en l'état actuel des connaissances et de la situation épidémiologique, les caractéristiques biologiques d'un éventuel virus *Influenza* A humain réassortant ou mutant, qui viendrait à émerger, notamment quant à ses modalités d'infection et d'excrétion chez l'homme ;

Considérant que la transmission inter-humaine se fait essentiellement par voie aérienne ;

Considérant que la quantité minimale de tel ou tel virus *Influenza* nécessaire pour parvenir à l'infection de son hôte (dose minimale infectante) n'est pas connue, tout au moins pour ce qui concerne les virus *Influenza* aviaires ;

L'Afssa estime, compte tenu de ces éléments, et notamment des caractéristiques du virus *Influenza* aviaire actuellement circulant que :

- la **probabilité d'infection de l'homme par exposition par voie orale à de l'eau d'alimentation** contaminée par des virus *Influenza* aviaires HP, tels que le virus de la souche A H5N1, pourrait être qualifiée de négligeable ;
- la qualification de la **probabilité d'infection de l'homme par exposition à de l'eau d'alimentation**, en ce qui concerne un **virus humain qui émergerait par réassortiment ou mutations**, serait conditionnée notamment par les propriétés biologiques de ce virus et par son aptitude à être excrété par voie fécale. Cette probabilité ne peut être raisonnablement déterminée à ce stade .

### Conclusions et recommandations de l'Afssa

L'Afssa, s'appuyant sur le groupe d'expertise collective d'urgence « *Influenza* aviaire et eau » et après consultation du CES « Eaux » et d'un expert du CES « Santé animale » et d'experts du groupe de travail « virus transmissibles à l'homme par voie orale » adopte le présent avis concernant l'évaluation du risque sanitaire pour l'homme résultant de l'exposition à des virus *Influenza* via l'eau d'alimentation :

#### Concernant les virus *Influenza* aviaires HP tels que A H5N1

En situation d'épizootie ou d'infection humaine par des virus *Influenza* aviaire HP tel que A H5N1, le risque sanitaire pour l'homme d'être infecté par un virus *Influenza* aviaire par exposition à l'eau d'alimentation (ingestion ou aérosols induits) est estimé en France, sous les hypothèses retenues et compte tenu des caractéristiques des souches actuellement circulantes, comme nul à négligeable<sup>10</sup>, essentiellement du fait de la faible probabilité de contamination de l'homme par des virus aviaires HP tels que le A H5N1 par exposition à de l'eau d'alimentation contaminée.

→ Dans ces conditions, et en plus des mesures de prévention déjà existantes, il doit être recommandé de renforcer la vigilance vis-à-vis des ouvertures dans les réservoirs de stockage d'eau, d'interdire l'usage des poteaux d'incendie hors incendie et d'appliquer des mesures de désinfection dans les usines qui n'en sont pas équipées.

→ D'autre part et par mesure de précaution, il doit être recommandé, dans les zones dans lesquelles des foyers infectieux sont identifiés, de ne plus utiliser l'eau provenant de citernes de récupération des eaux de pluie ou de puits privés, en particulier en hiver, en raison de l'absence de traitements dont l'efficacité pourrait être garantie ou, au minimum, de porter cette eau à ébullition avant utilisation.

Il convient par ailleurs de noter que la probabilité de présence potentielle de virus *Influenza* aviaire dans l'eau d'alimentation au point d'usage dépend fortement de l'adéquation de la filière avec la ressource utilisée et de la qualité de l'exploitation de la filière. Toute défaillance ponctuelle ou permanente de la filière est de nature à augmenter cette probabilité, le degré de fréquentation de la zone par cette avifaune et la proximité de foyers d'*Influenza* aviaires étant par ailleurs égales.

→ Ainsi, en cas de défaillance de la filière de traitement de l'eau et en cas de contamination notoire de l'eau au point d'usage, la recommandation de porter l'eau d'alimentation à ébullition avant consommation suffirait à garantir un haut niveau de protection du consommateur.

### Concernant un virus *Influenza* humain mutant ou réassortant

Le risque sanitaire pour l'homme de s'infecter par exposition à l'eau de consommation humaine (ingestion ou aérosols induits) dépendrait en grande partie des propriétés biologiques du virus qui serait alors en circulation au sein de la population humaine, notamment en ce qui concerne son aptitude à être ou non excrété par voie fécale. Il peut être toutefois indiqué qu'en l'absence d'excrétion fécale de virus, le risque d'infection humaine par le biais de l'eau d'alimentation serait qualifié de nul.

→ En tout état de cause, l'Afssa souligne l'importance :

- de reconsidérer cette évaluation du risque en fonction des propriétés biologiques du virus qui serait alors en circulation au sein de la population humaine. Ainsi, il serait indispensable d'évaluer le potentiel d'excrétion fécale des virus *Influenza* humains mutants ou recombinants qui viendraient à émerger ainsi que leur sensibilité aux principaux agents désinfectants utilisés dans les traitements de potabilisation et d'assainissement des eaux, afin de ré-évaluer le risque d'infection de l'homme par ce nouveau virus *via* l'eau d'alimentation avec des données actualisées ;
- d'assurer, au niveau international, une veille scientifique active portant sur les caractéristiques des virus associés aux cas d'infections humaines, ce qui permettrait d'apprécier la progression éventuelle de l'adaptation à l'homme des souches virales en circulation .

### Recommandations complémentaires

Dans l'objectif d'assurer un niveau optimal de protection du consommateur en matière d'eau distribuée, et quelle que soit la nature de la contamination microbienne des ressources en eaux destinées à la production d'eau d'alimentation, il est utile :

- de rappeler :
  - que la vigilance des acteurs de terrain doit être optimale, notamment en ce qui concerne les conditions de captage des eaux de surface et la maîtrise du fonctionnement des systèmes de production et de distribution d'eau (identification des points de défaillances éventuels ou récurrents, prescription des mesures correctives appropriées pour y remédier),
  - aux personnes publiques ou privées responsables de la distribution de l'eau (PPPRDE) les paramètres de traitement à appliquer pour obtenir une bonne efficacité virucide.
- de recommander :
  - un recensement des systèmes de production et de distribution d'eau d'alimentation utilisant des ressources superficielles ou des eaux d'origine karstique jugés vulnérables, afin d'inciter la PPPRDE à améliorer sa maîtrise du système de production et de distribution d'eau associé ;
  - la mise au point de méthodes d'analyse des virus *Influenza* dans les eaux, comme préconisé en annexe 1. Une fois ce préalable réalisé, des prélèvements pour l'analyse de ces virus pourraient être réalisés dans les eaux des ressources superficielles ou des eaux d'origine karstique jugés vulnérables situées à l'intérieur des foyers d'*Influenza* aviaires.

Par ailleurs, est annexé à cette position un état des connaissances concernant :

- les méthodes de prélèvement, de transport et d'analyse d'échantillons destinés à la recherche de virus *Influenza* dans les eaux (annexe 1) ;
- une réflexion sur l'implication des laboratoires compétents en matière de virus *Influenza* et de vecteur hydrique (annexe 1) ;
- l'efficacité des produits et procédés de traitement de l'eau destinés à la consommation humaine (annexe 2).
- La grille d'évaluation qualitative du risque utilisée dans cet avis (annexe 3).

La Directrice générale de l'Agence française  
de sécurité sanitaire des aliments

**Pascale BRIAND**

**Références Bibliographiques**

- Afssa 2004.** Fièvre Q : rapport sur l'évaluation des risques pour la santé publique et des outils de gestion des risques en élevage de ruminants. 88 p.
- De Jong M.D., Cam B.V., Qui P.T., Hien V.M., Tranh T.T., Hue N.B., Beld M., Phuong L.T., Khanh T.H., Chau N.V.V., Hien T.T., Ha D.Q. & Farrar J. 2005.** Fatal avian influenza A (H5N1) in a child presenting with diarrhoea followed by coma. *The New England Journal of Medicine* 352, 686-691.
- Puzelli S., Di Trani L., Fabiani C., Campitelli L., De Marco M.A., Capua I., Aguilera J.F., Zambon M. & Donatelli I. 2005.** Serological analysis of serum samples from humans exposed to avian H7 influenza viruses in Italy between 1999 and 2003. *Journal of Infectious Diseases* 192 (8), 1318-1322.
- Stallknecht D.E., Kearney M.T., Shane S.M. & Zwank P.J. 1990a.** Effects of pH, temperature, and salinity on persistence of avian influenza viruses in water. *Avian Diseases* 34 (2), 412-418.
- Stallknecht D.E., Shane S.M., Kearney M.T. & Zwank P.J. 1990b.** Persistence of avian influenza viruses in water. *Avian Diseases* 34 (2), 406-411.
- Taubenberger J.K., Reid A.H., Lourens R.M., Wang R., Jin G. & Fanning T.G. 2005.** Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* 437 (7060), 889-893.
- Tran T.H., Nguyen T., Nguyen T.D., Loung T.H., Pham P.M. & Nguyen V.C. 2004.** Avian influenza A(H5N1) in 10 patients in Vietnam. *The New England Journal of Medicine* 350, 1179-1188.
- Webster R.G., Yakhno M., Hinshaw V.S., Bean W.J. & Murti K.G. 1978.** Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* 84 (2), 268-278.
- Zepeda Sein C. 1998.** Méthodes d'évaluation des risques zoonosaires lors des échanges internationaux. Séminaire sur la sécurité zoonosaire des échanges dans les Caraïbes du 9 au 11 décembre 1997. Port of Spain Trinidad and Tobago.

## Annexe 1

### Présentation de la méthode pour une évaluation de risques

#### Principe général de la méthode

Parmi les différentes démarches possibles pour conduire une évaluation de risques, le groupe de travail du Comité d'experts spécialisé Santé animale (CES SA) a choisi d'utiliser la méthode préconisée par l'Office international des épizooties (OIE). Elle comprend les cinq étapes suivantes :

- l'identification du danger ;
- l'appréciation de l'émission (probabilité d'émission à partir de la source) ;
- l'appréciation de l'exposition (probabilité d'exposition au danger) ;
- l'appréciation des conséquences (fréquence et gravité) ;
- l'estimation du risque (qui consiste à combiner les probabilités de fréquence d'émission et d'exposition avec les conséquences).

Une estimation du risque peut être conduite soit de manière qualitative, soit de manière quantitative. Selon la disponibilité plus ou moins grande des données, on choisit l'une ou l'autre de ces méthodes.

La méthode pour conduire une estimation qualitative du risque repose sur les mêmes bases théoriques que celles de l'évaluation quantitative du risque. Chacun des événements, parfois complexes constituant l'émission, l'exposition et les conséquences, peut lui-même être décomposé en plusieurs paramètres simples qui participent à son occurrence. La probabilité d'un événement donné peut alors s'évaluer en combinant les probabilités de ces différents paramètres de la manière indiquée dans la figure 1.

#### Appréciation de la probabilité de chaque événement

La démarche générale d'appréciation qualitative du risque a été complétée par une aide à la rationalisation de l'estimation adaptée à partir des travaux de Zepeda-Sein [1998]. Cet auteur propose que chacun des paramètres soit analysé à l'aide de toutes les informations disponibles et qu'une estimation de la probabilité de survenue de chacun d'entre eux soit réalisée séparément pour aboutir à un niveau donné de probabilité (cinq qualificatifs pour ces probabilités : nulle, négligeable, faible, modérée ou élevée) ou dans une fourchette donnée (par exemple : négligeable à faible) :

- **Nulle** : la survenue de l'événement n'est pas possible ;
- **Négligeable** : la survenue de l'événement ne serait possible que dans des circonstances exceptionnelles ;
- **Faible** : la survenue de l'événement est peu élevée, mais possible dans certaines circonstances ;
- **Modérée** : la survenue de l'événement est nettement possible ;
- **Elevée** : la probabilité de survenue de l'événement est grande.

#### Appréciation du risque

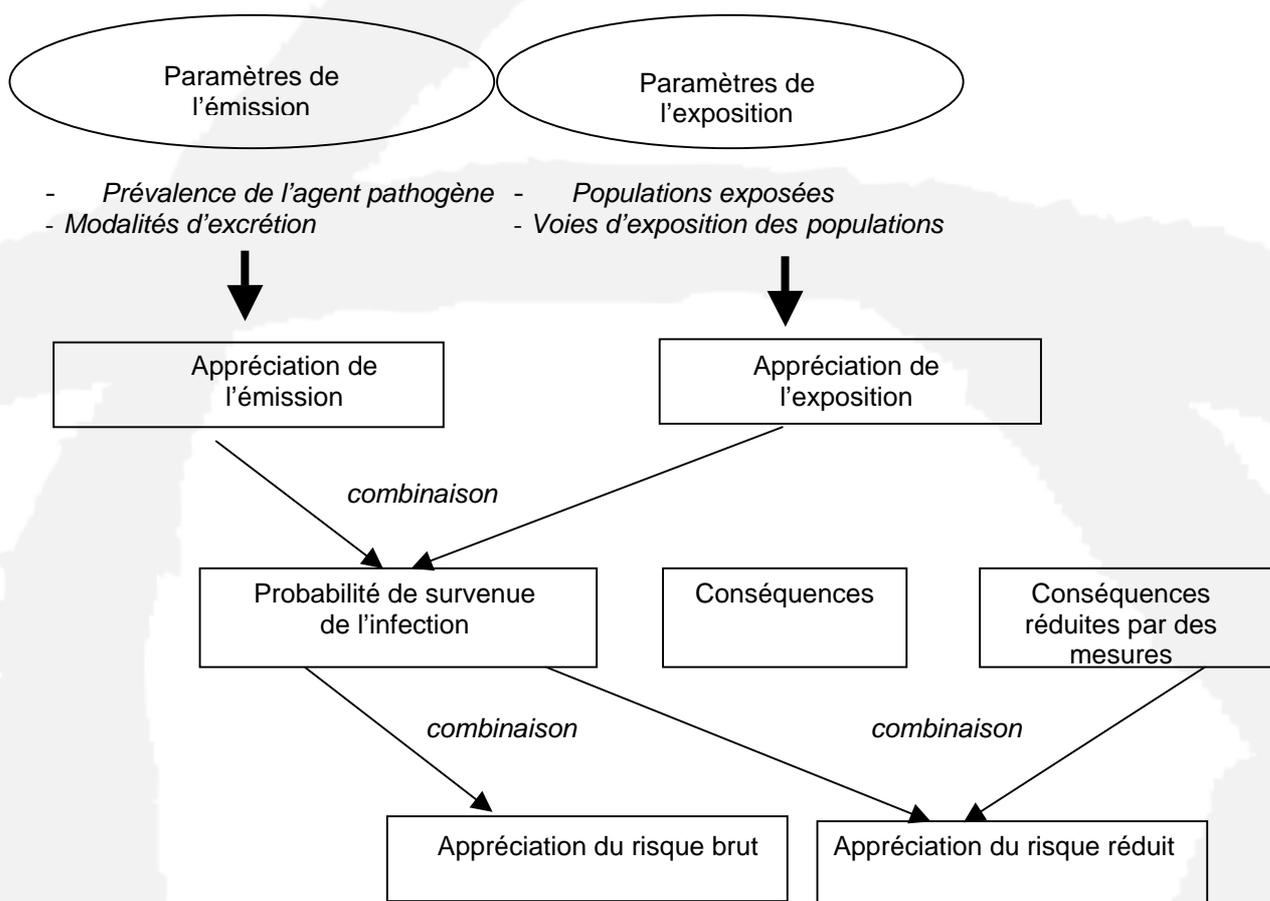
La combinaison de probabilités de deux niveaux donnés proposée par Zepeda-Sein a été adaptée par le groupe de travail « Rage des chiroptères » du CES SA afin de tenir compte de l'imprécision de certaines données et refléter également la part de subjectivité inévitable de l'estimation des différentes probabilités retenues par le groupe. Néanmoins, le groupe « Rage des chiroptères » n'avait pas tenu compte du fait que la combinaison de deux probabilités conduit à une probabilité plus faible que celle de chacune des probabilités de départ ainsi que l'exemple quantitatif suivant l'illustre (par exemple  $10^{-4} \times 10^{-4} = 10^{-8}$ ).

Pour tenir compte de ce point, le croisement des qualificatifs est le suivant :

- deux probabilités de même qualificatif conduisent au qualificatif inférieur (faible x faible = négligeable) ;

- deux probabilités voisines conduisent à la fourchette inférieure de la probabilité la plus basse (faible x modérée = négligeable à faible) ;
- deux probabilités non voisines (mais non opposées) conduisent à la probabilité la plus faible (faible x élevée = faible) ;
- deux probabilités opposées conduisent à la fourchette supérieure de la probabilité la plus faible (négligeable x élevé = négligeable à faible).

La combinaison de probabilités peut également se faire en incluant une, voire deux fourchette(s). Le tableau I rend compte des croisements possibles.



**Figure 1 : Présentation du schéma général d'analyse (selon la méthode OIE)**

La combinaison des différentes probabilités correspondant à chaque événement aboutit à la probabilité de survenue du danger. Ce dernier est donc qualifié avec les mêmes appréciations que celles utilisées précédemment (nul, négligeable, faible, modéré ou élevé), ou avec les fourchettes correspondantes. Le tableau I illustre ces principes.

Tableau I : Résultats de la combinaison des différentes appréciations qualitatives utilisées dans l'analyse qualitative du risque (Nulle = Nu, N = Négligeable, F = Faible, M = Modérée et E = Elevée)

	Nu	Nu à N	N	N à F	F	F à M	M	M à E	E
Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu
Nu à N	Nu	Nu à N	N	N	N				
N	Nu	Nu à N	Nu à N	Nu à N	Nu à N	N	N	N	N à F
N à F	Nu	Nu à N	Nu à N	Nu à N	N	N	N	N à F	
F	Nu	Nu à N	Nu à N	N	N	N	N à F		
F à M	Nu	Nu à N	N	N	N	N à F			
M	Nu	N	N	N	N à F				
M à E	Nu	N	N	N à F					M
E	Nu	N	N à F					M	M

Ce tableau tient compte du fait que, dans une analyse qualitative, le résultat de la multiplication de deux probabilités est une probabilité inférieure à chacune d'entre elles.

## Annexe 2

### Recommandations qui peuvent être proposées pour les méthodes de prélèvement, d'analyses et de transport d'échantillons permettant de détecter les virus *Influenza* aviaires

---

La recherche de virus *Influenza* aviaires peut être envisagée avec diverses finalités :

- identification / inventaire de souches,
- évaluation quantitative de la charge infectieuse,
- suivi de désinfection,
- etc.

Parmi les diverses modalités possibles de prélèvement / analyse / transport, certaines sont préférables en fonction du but poursuivi, de la matrice, du temps alloué, etc.

#### Méthodes de prélèvement et de détection

La détection de virus *Influenza* aviaires dans des échantillons d'eau destinée à la consommation humaine doit nécessairement prendre en compte la faible densité virale susceptible d'y être retrouvée.

De ce fait, il sera difficile de détecter directement ces micro-organismes dans ce type d'échantillons et, dans ces conditions, l'analyse virologique comportera la plupart du temps deux étapes distinctes :

- une première étape de concentration des particules virales en vue d'obtenir sous un très faible volume les virus présents dans l'échantillon à analyser.
- une deuxième étape consacrée à la détection proprement dite et à l'identification des virus.

#### - Techniques de concentration

En préambule, il est important de souligner qu'à ce jour très peu d'études scientifiques concernant la détection de virus *Influenza* aviaires (y compris souche A H5N1) dans ce type d'échantillons ont été publiées et, qu'en ce qui concerne les eaux usées, aucune procédure adaptée n'a pu être recensée.

Dans l'ensemble, les techniques de concentration employées par la plupart des auteurs dérivent de celles utilisées pour la concentration de particules virales entériques dans les milieux hydriques. En effet pour ces derniers virus classiquement retrouvés dans l'environnement, on dispose de plus de trente ans d'expérience, notamment en ce qui concerne leur concentration, leur détection ainsi que l'efficacité et les rendements des différentes techniques utilisées. À l'inverse pour les virus *Influenza* aviaires, ces données restent éparpillées et très fragmentaires et un travail d'évaluation expérimentale reste à effectuer notamment en ce qui concerne la concentration des virus *Influenza* aviaires dans les matrices « eaux destinées à la consommation humaine » et « eaux usées ».

#### ***1.1 Concentration des virus *Influenza* aviaires dans les eaux destinées à la consommation humaine***

***État des lieux :***

Pour les eaux destinées à la consommation humaine, seuls Roepke et *al.* (1989) ont évalué un protocole de concentration à partir d'eau du robinet artificiellement contaminée par une souche *Influenza* H4N2. La technique développée consiste à réaliser deux étapes de concentration successives :

- la première, basée sur le principe de l'adsorption-élution, utilise un système de filtration de type Virosorb 1-MDS de charge globale positive et permet de concentrer les virus à partir de volumes d'eau importants (100 litres).
- la seconde consiste en une concentration de l'éluat obtenu (entre 0,77L et 1,1L selon les essais) par adsorption des virus sur des érythrocytes de poulets puis sédimentation des complexes formés par centrifugation. Globalement, les auteurs obtiennent en utilisant cette technique des rendements compris entre 0,3 et 6,4% pour des facteurs de concentration virale compris entre 100 et 3200.

Ce protocole fut également employé et adapté par Sivanandan et *al.* (1991), dans le cadre d'une étude visant à évaluer la présence de virus *Influenza* aviaires dans des échantillons non traités d'eau de lac. L'analyse de volumes d'eau de 500 litres leur a permis de mettre en évidence la présence de H13N2 dans ce type d'échantillon. Pour cela, ils ont fait passer les 500 L d'eau au travers de filtres chargés positivement, puis élué les virus en passant 1 L de glycine 0.1M (pH 11.0). Une seconde concentration a été obtenue en ajoutant 2 mL d'érythrocytes de poulet : après 90 minutes d'adsorption à 4°C, les érythrocytes étaient centrifugés et le culot repris dans 2 mL d'infusion de veau + antibiotiques ce qui a conduit à l'obtention d'un facteur final de concentration théorique de X 250000, mais le rendement n'a pas été évalué.

Sur des échantillons de même nature (eaux de lacs) et d'un volume de seulement 50 mL, Ito et *al.* (1995) ont également pu détecter des virus *Influenza* H4N6 et H3N8 mais ils ont simplifié considérablement ce protocole en ne réalisant qu'une seule étape de concentration basée sur l'adsorption des virus sur érythrocytes de poulets.

Markwell et Shortridge (1982) ont, pour leur part, utilisé une technique différente de concentration sur des eaux d'étangs. Celle-ci, basée sur la précipitation des particules virales à l'aide de PEG 6000 sur des échantillons de 400 mL, leur a permis de détecter des virus *Influenza* de types H3N2, H3N3 et H9N2.

#### **CONCLUSION sur le choix d'une technique de concentration des virus pour les eaux destinées à la consommation humaine**

Dans les eaux destinées à la consommation humaine, l'analyse virologique va se heurter principalement à la très faible concentration probable des particules virales qui pourraient s'y trouver. De façon à compenser cette faible concentration, il serait indispensable de concentrer un grand volume d'eau. Il est possible *a priori* de s'inspirer de la norme AFNOR XP T90-451 concernant la recherche des *Entérovirus* dans les eaux d'alimentation (en sortie de filière de traitement) qui recommande d'analyser un volume minimal de 100 litres. Compte tenu de cette dernière donnée, seule la technique d'adsorption-élution proposée par Roepke et *al.* (1989) ou par Sivanandan et *al.* (1991), s'avère être compatible avec cette prescription. On devrait donc préconiser l'utilisation de ce protocole.

La première étape de concentration se ferait dans ce cas sur site, en veillant à ce que les opérateurs respectent les précautions réglementaires.

L'éluat obtenu (1 litre) serait dans un second temps acheminé jusqu'aux laboratoires compétents pour la réalisation de la deuxième étape de concentration et d'analyse. Il est important de signaler que, eu égard au niveau de risque biologique pour l'opérateur, l'opération de concentration sur site devra s'effectuer dans le respect des mesures d'hygiène prévues à cet effet (lunettes, gants, etc.).

**État des lieux :**

Aucune procédure n'a été publiée à ce jour pour concentrer des virus *Influenza* dans les eaux usées.

Cependant, pour cette matrice complexe, deux cas de figure peuvent être envisagés:

- **Soit la matrice peut-être considérée comme suffisamment chargée en virus** (par exemple fosse de collecte des effluents d'un élevage ou eau d'un lac utilisé comme ressource et suspect d'être très infecté, en prélevant l'eau la plus chargée en matières fécales) et, dans ce cas, la détection des virus *Influenza* dans l'échantillon à analyser pourra se faire directement sans passer par une étape préalable de concentration. C'est cette procédure qui a été appliquée par Halvorson et *al.* en 1982 pour la recherche de virus dans des échantillons d'eaux d'étangs prélevés à proximité de cages contenant des canards (1983). À partir de prises d'essai collectées en tubes de 10 mL, les auteurs ont trouvé plusieurs souches virales dont H3N2, H3N8, H4N8 et H11N9.
- **Soit la matrice est peu chargée en virus**  
Dans ce cas, il serait indispensable d'envisager une étape de concentration. Cependant, la charge virale susceptible d'être retrouvée dans ce type de matrice devant être nettement plus élevée que dans le cas d'une eau d'alimentation, le volume à analyser devrait être moins important mais reste encore aujourd'hui à définir. Pour la technique à employer, l'adaptation d'une technique d'adsorption-élution sur filtre électropositif de type Virosorb sera difficile car la charge importante en matières en suspension contenue dans la matrice provoquera le colmatage des filtres. Il paraît donc plus judicieux d'envisager l'utilisation soit d'une technique de précipitation au polyéthylène glycol (PEG 6000), soit d'une technique de concentration à partir d'érythrocytes de poulets, bien que celles-ci soient limitées par le volume à analyser puisque l'utilisation de volumes supérieurs à 1 litre, voire supérieurs à 500 mL, diminue l'efficacité de ces techniques dans le cas du PEG 6000.

**CONCLUSION sur le choix d'une technique de concentration des virus pour les eaux usées**

Dans les eaux usées, deux cas de figure doivent être considérés en fonction de la localisation de la source de contamination :

- à partir de ou près d'une source potentiellement très contaminée, l'analyse pourrait se faire directement (sans passer préalablement par une étape de concentration)
- à partir d'une source potentiellement peu contaminée ou en cas de dilution importante, il serait nécessaire d'utiliser une procédure utilisant :
  - soit une précipitation au PEG 6000,
  - soit une concentration à partir d'érythrocytes de poulets sur un volume d'échantillon compris entre 500 et 1000 mL.

Cependant il est important de souligner qu'en l'état actuel des connaissances aucun protocole n'a été publié pour la concentration de virus *Influenza* aviaires à partir d'eaux usées.

Après prélèvement, et toujours dans le respect des mesures d'hygiène prévues à cet effet (lunettes, gants, etc.) et, eu égard au niveau de risque biologique pour l'opérateur, l'échantillon devra être acheminé au laboratoire compétent pour la réalisation de l'étape de concentration et/ou de l'analyse.

## II. Détection des virus *Influenza* aviaires dans les eaux d'alimentation et les eaux usées.

Compte tenu de la faible densité des particules virales pouvant être présentes dans les échantillons d'eaux d'alimentation et d'eaux usées, seules les techniques capables de détecter un faible nombre de particules pourront être employées.

Il s'agit principalement des techniques de culture sur cellules ou sur œufs embryonnés (ovoculture) et des techniques de biologie moléculaire (Polymerase Chain Reaction : PCR).

Ces deux techniques peuvent être utilisées et/ou adaptées pour la recherche de virus *Influenza* aviaires soit dans les eaux destinées à la consommation humaine, soit dans les eaux usées.

### II.1 Cultures sur œufs embryonnés et cultures cellulaires

La culture cellulaire et la culture sur œufs embryonnés sont à ce jour les deux seules techniques permettant de **quantifier la présence de particules virales infectieuses** dans un échantillon. L'ovoculture est de loin la technique la plus utilisée pour la recherche de virus *Influenza* dans les concentrats d'échantillons environnementaux de diverses provenances : eaux d'alimentation (Roepke et al. 1989), eaux de surface (Markwell et Shortridge 1982, Sivanandan et al. 1991, Ito et al. 1995). Elle consiste à faire se multiplier le virus au sein d'œufs embryonnés et à confirmer sa présence par un test d'hémagglutination. Concernant la détection de virus dans des échantillons environnementaux, une première étape de décontamination à l'aide d'antibiotiques et antifongiques à des concentrations appropriées devra être appliquée systématiquement avant inoculation.

Même si ces deux techniques restent actuellement des techniques de référence pour l'évaluation de la présence de virus aviaires dans un échantillon, elles présentent un certain nombre d'inconvénients :

- Pour la culture cellulaire, il est important de mentionner que toutes les cellules ne présentent pas la même sensibilité au virus et que, par conséquent, il serait indispensable d'utiliser différentes lignées cellulaires pour détecter le plus grand nombre de particules virales distinctes, ce qui reste difficile à gérer pour un même laboratoire.
- Pour les œufs embryonnés, il est reconnu que certains virus animaux (autres qu'aviaires ou humains) se multiplient faiblement (WHO 2004). Toutefois, les virus *Influenza* aviaires cultivent bien sur œuf embryonné de poule et les souches hautement pathogènes, notamment, entraînent très rapidement la mortalité embryonnaire. Le temps d'analyse pour l'ovoculture est compris entre 2 jours (possible avec certaines souches hautement pathogènes) et 12 jours. Il est de l'ordre de 6 ou 7 jours pour une détection par culture cellulaire.

### II.2 Techniques de biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire (RT-PCR) peuvent également être employées pour cette démarche d'évaluation. Elles consistent à détecter le génome viral (ARN) après son extraction, la rétro-transcription de l'ARN en ADNc et l'amplification de cette molécule. À ce jour, différentes techniques existent mais elles sont principalement utilisées pour la recherche de virus dans des échantillons biologiques.

Des techniques de RT-PCR qualitatives utilisées pour diagnostiquer la présence d'une contamination par des virus *Influenza* ont été développées par différents auteurs (Yuen et al. 1998, Cooper et Subbarao 2000, Munch et al. 2001, Tran et al. 2004). Les échantillons retrouvés positifs sont dans un second temps confirmés et identifiés précisément en utilisant soit une technique de southern Blot (Yuen et al. 1998), soit une technique de digestion enzymatique (RFLP) (Cooper et Subbarao 2000).

Des techniques de PCR en temps réel sont également disponibles. Elles offrent l'avantage de pouvoir en même temps diagnostiquer et quantifier à l'aide d'une gamme étalon, la charge en génome viral présente au sein d'un échantillon. Plusieurs protocoles ont été mis au point (Spackman et al. 2002, Ng et al. 2005). L'utilisation de cette technique offre plusieurs avantages par rapport à des protocoles de RT-PCR qualitatifs conventionnels. Ng et al. en 2005 ont par exemple démontré qu'il était possible d'obtenir un gain de sensibilité en utilisant ces techniques pour détecter le virus A H5N1 dans des liquides biologiques humains. Il s'avère que la spécificité est également améliorée notamment grâce à l'utilisation concomitante d'amorces d'amplification et de sondes permettant la révélation. La réalisation simultanée de ces deux étapes (amplification et révélation) dans le même tube réactionnel permet enfin de diminuer le temps d'analyse. Selon l'utilisation qui est envisagée, le choix de la séquence cible ainsi que celui des amorces de RT-PCR et/ou de la sonde, constitue une étape importante. Il est en effet différent selon que l'on cherche à identifier une souche donnée (typage) ou à diagnostiquer la présence d'une contamination. Dans le premier cas, des amorces et des sondes s'hybridant sur des séquences spécifiques propres à la souche recherchée seront sélectionnées alors que, dans le second, la détection est fondée sur la recherche de séquences conservées présentes chez toutes les souches à identifier. Ainsi pour détecter la souche A H5N1, Ng et al. (2005) utilisent simultanément plusieurs jeux d'amorces et de sondes ciblant spécifiquement le gène HA de ce virus. À l'inverse pour détecter différentes souches *Influenza*, Ward et al. (2004) ciblent une séquence différente, celle du gène M. Cette méthodologie (PCR temps réel gène M) est préconisée également dans la note de service NS n° 2005-8235 de la DGAL pour le criblage des suspicions dans le cadre de la « Surveillance de la mortalité des oiseaux sauvages au regard du risque *Influenza* ».

Par rapport aux techniques de culture sur cellules et d'ovoculture, les techniques moléculaires sont rapides à mettre œuvre (environ 4 heures : étape d'extraction du génome et amplification versus 2 à 12 jours pour la culture sur œufs ou sur cellules). Elles peuvent également être automatisées pour l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. Cependant il est à souligner **qu'en aucun cas, elles ne pourront attester la présence de virus infectieux en cas de contamination.**

Par ailleurs il est possible d'obtenir **des réponses faussement négatives** notamment lors de l'analyse d'échantillons d'eaux de diverses origines. Les différentes matrices (eaux d'alimentation, eaux de surface, eaux usées, etc.) sont susceptibles de renfermer un grand nombre de molécules chimiques telles que des polysaccharides (acides fulviques, humiques, tanniques, etc.), des protéines, des métaux lourds, etc., qui seront concentrés en même temps que les virus et qui pourront inhiber la réaction d'amplification (Straub et al. 1995, Kreader 1996, Cromeans et al. 1997, Wilson 1997, Abbaszadegan et al. 1999). Afin de limiter leur action, il est possible soit d'agir directement en éliminant ces composés par l'emploi de différents procédés, soit indirectement en masquant leur effet.

Enfin, à l'inverse, l'extrême sensibilité de ces techniques peut également être à l'origine **de réponses faussement positives** lors de contaminations inter échantillons ou surtout lors des étapes de post-PCR. De façon à limiter ce risque, l'emploi de techniques de type temps réel ou quantitatif pour le diagnostic semble être plus judicieux puisque la révélation des produits amplifiés se fait directement au cours de la réaction.

Il pourrait être intéressant de développer une technique d' ICC-PCR basée sur la détection d'ARNm *Influenza* afin de signer le caractère infectieux du virus dans un délai inférieur à la culture cellulaire. Le développement en routine serait probablement délicat en raison du risque de présence d'inhibiteurs de la PCR dans les échantillons d'eau.

**CONCLUSION : Choix d'une technique de détection des virus**

Idéalement la technique à utiliser devrait être sensible, quantitative, rapide, applicable en routine mais aussi permettre la détection de tous les sous-types viraux en témoignant du caractère infectieux. Compte tenu de l'ensemble des données exposées pour chaque technique énoncée, il est clair que la technique de PCR en temps réel, répondrait en grande partie aux exigences fixées ci-dessus, après s'être assuré qu'elle est bien apte à détecter le virus impliqué dans les épidémies recensées. Cependant elle ne peut être utilisée seule pour l'évaluation de la contamination virale car elle ne permet pas aujourd'hui d'attester la présence d'un virus infectieux car seule la culture cellulaire ou l'ovoculture peuvent en témoigner. Compte tenu de ces données, il serait recommandé d'utiliser successivement deux techniques pour la recherche du virus *Influenza* hautement pathogène dans les matrices :

- dans une première étape de l'analyse, une technique de RT-PCR en temps réel basée sur la recherche du gène M avec incorporation d'étalon interne ou externe permettrait de réaliser un criblage des échantillons positifs.
- dans un second temps, les échantillons retrouvés positifs par RT-PCR en temps réel seraient soumis aux techniques d'ovoculture (Roepke et al. 1989, Sivanandan et al. 1991, Ito et al. 1995) ou de culture cellulaire appropriée afin de démontrer la présence d'agents viraux infectieux.

Toutefois il est important de souligner qu'en l'état actuel des connaissances aucun protocole de RT-PCR en temps réel n'a été publié pour réaliser la détection de virus *Influenza* aviaires dans les eaux de consommation humaine et dans les eaux usées.

En l'état actuel des connaissances, il n'existe pas de grille d'interprétation des éventuels résultats positifs obtenus suite à l'analyse d'échantillons d'eau environnementale, voire d'eau d'alimentation. Il serait judicieux de recueillir, voire d'acquérir les données nécessaires à l'élaboration d'une telle grille.

**Transport d'échantillons**

Bien que des études sur la résistance des virus *Influenza* aviaires en fonction de la température et du pH (Webster et al. 1978, Scholtissek 1984, Stallknecht et al. 1990) aient conclu à la survie des virus *Influenza* aviaires à des températures de l'ordre de 4°C pendant des durées variables allant de plusieurs semaines, voire à plusieurs mois, ces conditions de température ne sont pas de nature à garantir la survie des virus pendant une longue durée. C'est pourquoi la congélation à une température inférieure ou égale à -65°C est utilisée pour une longue conservation des souches, mais sans doute au prix d'une perte d'unités infectieuses. A température ambiante + 20°C et plus, la résistance est moindre : Lu et al. (2003) ont observé une disparition de virus IA (H7N2) en 2 jours à 15-20°C dans des fèces de poulet et en 1 jour à 30-37°C.

La note de service NS n°2001-8113 de la DGAL (« Plan d'urgence Pestes aviaires : Gestion des suspicions : Les prélèvements et les analyses de laboratoires ») définit les conditions thermiques de stockage et le délai d'acheminement pour des échantillons d'organes ou d'écouvillons provenant d'oiseaux lors de suspicion d'*Influenza* aviaire ou de maladie de Newcastle : maintien à + 4°C si le transport peut être réalisé très rapidement (« dans la journée », mais il est raisonnable de penser que ceci devrait valoir également pour un envoi seulement différé au lendemain, à condition que le colis parvienne ce même jour) avec congélation préalable et transport assurant le maintien de la congélation si l'envoi doit être différé davantage.

Les pH acides peuvent aussi faire chuter le titre viral très rapidement (4 log d'abattement en 10 minutes à pH 4,5 selon Webster et al. 1978), les virus H5 et H7 étant les plus sensibles (Scholtissek 1984). Il y a donc lieu de neutraliser le cas échéant les échantillons ou les concentrés à transporter. La survie serait également écourtée avec des salinités élevées (Stallknecht et al. 1990).

Il est évidemment nécessaire de neutraliser tout résiduel de chlore ou autre désinfectant dès le prélèvement (pr EN ISO 19458, Avril 2005, Qualité de l'eau : prélèvements pour l'analyse micro biologique). Le thiosulfate de sodium est utilisé à raison de 7,1 mg (anhydre) pour 1 mg de chlore résiduel mais il est souvent ajouté en excès (jusqu'à 50 mg/L) car cela ne nuit pas aux bactéries mais il faut cependant signaler que l'effet du thiosulfate en excès n'a pas été étudié sur les virus *Influenza* aviaires.

Pour ce qui concerne le niveau de sécurité de l'emballage et du système de transport, il n'y a pas de raison d'adopter un niveau supérieur à celui requis pour tout envoi d'un échantillon d'origine clinique d'étiologie indéterminée, si la recherche est réalisée en dehors d'un contexte épidémiologique défavorable. Sinon, il convient de respecter la réglementation en vigueur.

#### **CONCLUSION :**

Vers 4°C à pH neutre, une durée de transport de 24 ou 48 h semblerait sans effet sur le titre de virus *Influenza* aviaires dans les échantillons d'eau. Dans des conditions de pH proche de la neutralité, les échantillons devraient donc être acheminés à la température de  $4^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$  dans un délai maximal de 48 h. Si ce délai et ces conditions de pH ne peuvent être respectées, il est recommandé de congeler les échantillons avant envoi (température la plus basse possible) et d'assurer le maintien de leur congélation pendant le transport (de préférence sous carboglace). Le niveau de sécurité du transport doit être conforme aux exigences réglementaires.

#### **Laboratoires potentiellement sollicitables**

##### **I. Laboratoires d'analyses vétérinaires départementaux (LDA)**

Pour la prise en charge des cas aviaires, six laboratoires vétérinaires départementaux, disposant tous de P3, ont été agréés pour la recherche virologique du VIA par criblage dans le cadre de la campagne 2005-2006 de surveillance de la mortalité des oiseaux sauvages au regard du risque *Influenza* (NS n° 2005-8235 de la DGAL du 19 octobre 2005) comme pour l'application des mesures de police sanitaire applicables en cas de découverte d'un oiseau sauvage infecté par le virus A de l'*Influenza* aviaire hautement pathogène de sous type H5N1 (NS n°2006-8049 de la DGAL du 20 février 2006).

La méthodologie qu'il leur est demandé d'appliquer, à partir des écouvillons trachéaux et des écouvillons cloacaux réalisés, est la RT-PCR temps réel gène M, mais deux (voire trois) de ces laboratoires sont également opérationnels pour réaliser l'ovoculture virale. Les échantillons trouvés positifs par ces laboratoires sont systématiquement soumis pour confirmation au laboratoire national de référence (Afssa).

##### **II. Laboratoires agréés pour le contrôle sanitaire des eaux**

Le contrôle sanitaire des eaux (de consommation humaine, de ressources destinées à la potabilisation, de loisirs : piscines et baignades) est exercé par le Ministère chargé de la Santé (DDASS) qui en confie les analyses (et de plus en plus les prélèvements) à des laboratoires agréés (un par département environ). Quelques-uns de ces laboratoires, précédemment qualifiés « laboratoires de référence pour le contrôle sanitaire des eaux », ont développé en complément des activités de routine, des moyens d'intervention, de prélèvements, de mesures sur site et d'analyses spécifiques, notamment pour l'étude de la contamination virale des eaux. Certains de ces laboratoires (parfois accrédités)

disposent de l'expérience de la norme « entérovirus » et du matériel suffisant pour mener de front la concentration simultanée de nombreux échantillons. Plusieurs d'entre eux ont aussi développé des protocoles PCR de recherche de virus entériques. et certains disposent de P3 voire de P3+ ou y ont accès et y manipulent. Ils font partie désormais du réseau-pilote « eau » du dispositif Biotox et ont été mis sous astreinte et dotés à ce titre d'équipement destiné à rechercher, après inactivation, par PCR, des germes pathogènes, voire d'en faire des isollements en P3 en vue de transmettre aux CNR des souches « environnementales ».

En cas de pré-pandémie, il faut disposer d'un plus grand nombre de laboratoires et, en particulier, de quelques-uns prêts à se déplacer en tant que de besoin et à effectuer des mesures et concentrations à partir d'échantillons d'eaux afin d'évaluer leur éventuelle contamination. A cet égard, la phase de concentration, la plus délicate, détermine en grande partie le rendement. Dans cette perspective, il conviendrait d'identifier les laboratoires agréés pour le contrôle sanitaire des eaux qui seraient volontaires pour se former à la détection et au dénombrement dans les eaux d'un éventuel virus humain, mutant ou réassortant, en ce qui concerne le screening par PCR., en acquérant les sondes et amorces nécessaires et en adaptant les techniques de concentration qu'ils pratiquent pour les virus entériques (changement de pH, de filtres, etc.).

### III. Laboratoires hospitaliers

Pour la prise en charge des cas humains suspects, la DGS et la DHOS ont identifié une liste de laboratoires hospitaliers possédant tous un P3, répartis sur l'ensemble du territoire national, et appliquent une ou plusieurs techniques de détection moléculaire du virus A H5N1 qu'ils doivent réaliser en urgence devant une suspicion de cas humain. Ces laboratoires, dont la liste figure dans la nouvelle version du plan pandémique (Novembre 2005) ont des procédures adaptées aux prélèvements humains. Toutefois, en cas de nécessité, ils pourraient être sollicités pour réaliser des tests de criblage moléculaires pour déterminer si des eaux contiennent des séquences nucléotidiques spécifiques du virus A H5N1. En aucun cas ces laboratoires ne sont habilités à faire la mise en culture de l'échantillon pour isoler le virus A H5N1. En termes de prise en charge des cas humains, seuls les 2 centres nationaux de référence (CNR) du virus *Influenza*, qui ont respectivement accès à une structure P3+ et P4, sont habilités à cultiver ces virus.

Sur la base de ce constat, il revient aux autorités sanitaires d'identifier les laboratoires agréés pour le contrôle des eaux qui seraient susceptibles de bénéficier d'un transfert de compétence venant des laboratoires assurant le diagnostic *Influenza* aviaire, et qui, dans des conditions sécurisées, seraient à même d'effectuer ce dépistage en première ligne.

## Références bibliographiques

- Abbaszadegan, M., Stewart, P. & Lechevallier, M. 1999.** A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 444-449.
- Cooper, L.A. & Subbarao, K. 2000.** A simple restriction fragment length polymorphism-based strategy that can distinguish the internal genes of human H1N1, H3N2, and H5N1 influenza A viruses. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 2579-2583.
- Cromeans, T.L., Nainan, O.V. & Margolis, S.H. 1997.** Detection of hepatitis A virus in oyster meat. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2460-2463.
- Halvorson, D., Karunakaran, D., Senne, D., Kelleher, C., Bailey, C., Abraham, A., Hinshaw, V. & Newman, J. 1983.** Epizootiology of avian influenza—simultaneous monitoring of sentinel ducks and turkeys in Minnesota. *Avian Diseases* 27 (1), 77-85.
- Ito, T., Okazaki, K., Kawaoka, Y., Takada, A., Webster, R.G. & Kida, H. 1995.** Perpetuation of influenza A viruses in Alaskan waterfowl reservoirs. *Archives of Virology* 140 (7), 1163-1172.
- Jorgensen, P.H. 2001.** Detection and subtyping (H5 and H7) of avian type A influenza virus by reverse transcription-PCR and PCR ELISA. *Archives of Virology* 146, 87-97.
- Kreder, C.A. 1996.** Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1102-1106.
- Lu, H., Castro, A.E., Pennick, K., Liu, J., Yang, Q., Dunn, P., Weinstock, D., Henzler, D. 2003.** Survival of avian Influenza virus H7N2 in SPF chickens and their environments. *Avian Diseases* 47 (3 suppl), 1015-1020.
- Markwell, D.D. & Shorridge, K.F. 1982.** Possible waterborne transmission and maintenance of influenza viruses in domestic ducks. *Applied and Environmental Microbiology* 43 (1), 110-115.
- Munch, M., Nielsen, L.P., Handberg, K.J. & Ng, E.K.O., Cheng, P.K.C., Ng, A.Y.Y., Hoang, T.L. & Lim, W.W.L. 2005.** Influenza A H5N1 Detection. *Emerging Infectious Diseases* 11, 1303-1305.
- Roepke, D.C., Halvorson, D.A., Goyal, S.M. & Kelleher, C.J. 1989.** An adsorption-elution technique for the recovery of influenza virus from water. *Avian Diseases* 33 (4), 649-653.
- Schottissek, C. 1984.** Stability of infectious Influenza A viruses to treatment at low pH and heating. *Archives of Virology* 85 (1-2), 1-11.
- Sivanandan, V., Halvorson, D.A., Laudert, E., Senne, D.A. & Kumar, M.C. 1991.** Isolation of H13N2 influenza A virus from turkeys and surface water. *Avian Diseases* 35 (4), 974-977.
- Spackman, E., Senne, D.A., Myers, T.J., Bulaga, L.L., Garber, L.P. & Perdue, M.L. 2002.** Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 3256-3260.
- Stallknecht, D.E., Kearney, M.T., Shane, S.M. & Zwank, P.J. 1990.** Effects of pH, temperature, and salinity on persistence of avian influenza viruses in water. *Avian Diseases* 34 (2), 412-418.
- Straub, T.M., Pepper, I.L. & Gerba, C.P. 1995.** Removal of PCR inhibiting substances in sewage sludge amended soil. *Water Science and Technology* 31, 311-315.
- Tran, T.H., Nguyen, T., Nguyen, T.D., Loung, T.H., Pham, P.M. & Nguyen, V.C. 2004.** Avian influenza A(H5N1) in 10 patients in Vietnam. *The New England Journal of Medicine* 350, 1179-1188.
- Ward, C.L., Dempsey, M.H., Ring, C.J., R.E., K., Zhang, L. & Gor, D. 2004.** Design and performance testing of quantitative real time PCR assays for influenza A and B viral load measurement. *Journal of Clinical Virology* 29, 179-188.
- Webster, R.G., Yakhno, M., Hinshaw, V.S., Bean, W.J. & Murti, K.G. 1978.** Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* 84 (2), 268-278.
- WHO 2004.** Manual on Animal Influenza : Diagnosis and Surveillance. 97 p.
- Wilson, I.G. 1997.** Minireview : Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3741-3751.
- Yuen, K.Y., Chan, P.K., Peiris, M., Tsang, D.N., Que, T.L. & Shorridge, K.F. 1998.** Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza AH5N1 virus. *The Lancet* 351, 467-471.

## Annexe 3

### Quelle est l'efficacité des produits et des procédés de traitement des eaux usées et des eaux destinées à la consommation humaine ?

---

#### Introduction

S'agissant du traitement des eaux aux fins d'élimination et de destruction des particules virales, les données sont nombreuses sur les virus hydriques, entériques mais inexistantes sur les virus *Influenza* aviaries (VIA). Concernant les produits de désinfection, les données sur les *Orthomyxovirus* sont plus fournies mais doivent cependant être complétées par celles relevées sur les *Paramyxovirus* (en particulier le virus de la maladie de Newcastle) qui, par leur similarité de structure d'enveloppe, permettent une extrapolation fiable. A partir des données de la littérature, il faut avoir un regard très critique car la grande diversité des protocoles opératoires conduit à des écarts très significatifs aussi bien au niveau des concentrations actives qu'à celui des chutes de titre des suspensions virales traitées. Cependant les conclusions vont dans le même sens.

#### Contexte réglementaire

Aux textes réglementaires applicables aux produits et aux procédés de traitement des eaux de consommation humaine et aux traitements des eaux usées (code de la santé publique), s'ajoutent ceux traitant des mesures communautaires de lutte contre l'*Influenza* aviaire et la maladie de Newcastle (Directives 92/40/CEE et 92/66/CEE - Arrêté ministériel 8 juin 1994) et la note de service "Plan d'urgence – Peste aviaire" du 10 juillet 2001 (DGAL/SDSPA/N2001-8096).

Ces textes prévoient que les désinfectants à utiliser ainsi que leurs concentrations d'emploi doivent être officiellement approuvés par les autorités compétentes et que les opérations de nettoyage et de désinfection doivent être effectuées sous contrôle officiel, suivant les procédures décrites dans ces textes. Ces autorisations se réfèrent à une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) pour les traitements virucides des matériels d'élevage, des locaux et matériels de transport des animaux (décret n° 74-682 du 1er août 1974), complétée par un Agrément des Services Vétérinaires (arrêté du 28/02/1957).

Pour le traitement des eaux usées d'origine urbaine aucun texte ne prescrit un agrément préalable des produits et des procédés de traitement, sauf pour l'assainissement autonome (arrêté interministériel du 6 mai 1996 modifié).

#### Efficacité des produits de désinfection

A côté des substances actives et des produits de désinfection classiquement utilisés dans le domaine des eaux, la bibliographie relative au VIA apporte peu d'informations en raison notamment du fait que les virus de la famille des *Orthomyxoviridae* sont connus, comme la plupart des virus enveloppés, pour leur grande sensibilité expliquée par la rapide destruction de l'enveloppe conduisant à la perte d'infectiosité. Les grandes familles chimiques constituant les désinfectants applicables dans de nombreux secteurs (ammoniums quaternaires, alcools, dérivés phénoliques, aldéhydes, peroxydes et peracides, halogènes, amines, biguanides, etc.) produisent une destruction rapide du VIA et du virus de la maladie de Newcastle (modèle

utilisable en l'absence de données sur le VIA), c'est-à-dire une chute du titre viral au moins égale à 4 log décimal en moins de 30 minutes. Dans des conditions optimales d'évaluation de l'activité virucide réalisée au niveau du laboratoire, nous pouvons situer la place des *Orthomyxovirus* dans l'échelle de résistance des virus vis-à-vis des substances actives, du plus résistant au moins résistant :

*Parvovirus*, MS2 › *Picornavirus* (ex: *poliovirus*...) › *Rotavirus* et *Réovirus* › *Adénovirus* › *Poxvirus* › *Paramyxo-*, *Orthomyxo-*, *Coronavirus* › *Herpesvirus* › *Rhabdovirus*.

L'activité virucide potentielle de tous ces produits est confrontée aux réalités du terrain que sont notamment la très grande diversité des eaux à traiter, la grande variété de sites liés à leur taille et à la possibilité de mise en œuvre des procédures de désinfection chimique ou physique. En d'autres termes, il y a beaucoup d'incertitudes sur ces résultats ce qui oblige à recourir à l'emploi d'indicateurs d'efficacité judicieusement choisis.

Pour réduire ces incertitudes il faudrait *a minima*:

- pour les **particules virales** à détruire : connaître la quantité de particules virales, l'état dans lequel elles se trouvent (adsorbées sur des supports biologiques ou inertes, agrégées, incluses éventuellement dans des biofilms, etc.) et pouvoir mettre en relation ce titre supposé avec la dose minimale infectieuse afin de définir une chute de titre minimale et, au delà, la concentration optimale de désinfectant. Par ailleurs la capacité de rétention du virus dans les opérations de traitement d'eaux est une donnée essentielle dépendant à la fois du ou des points isoélectriques de ces virus et du pH de l'eau à traiter.
- pour les **désinfectants** : connaître les concentrations, non pas simplement d'emploi, mais effectives qui sont fortement dépendantes des facteurs principaux suivants :
  - la connaissance des charges organiques et minérales des milieux qui interfèrent avec toutes les substances actives.
  - la relation à établir entre le pH du milieu à traiter et le pH optimal d'activité des substances actives (ex : pour le chlore un pH de 6-7 permet à l'acide hypochloreux d'exprimer son efficacité maximale).
  - la production à partir des substances actives de sous-produits qui peuvent avoir des activités rémanentes moins puissantes (ex : chloramines inorganiques produites avec l'acide hypochloreux : mono- et dichloramine) et présenter des risques toxicologiques.
  - la température pour laquelle une baisse de 10°C nécessite généralement le doublement de la concentration d'emploi.

**Il faut rappeler la très grande sensibilité de ces traitements aux matières organiques, et aux matières en suspension qu'un traitement de filtration « préalable » permet de réduire.**

Pour les boues, déchets solides, matières fécales, il paraît difficile d'employer les produits chimiques précédemment cités. Un traitement à la chaux (ou hydroxyde de sodium ou autres agents alcalins) afin d'amener le pH à une valeur supérieure à 11 serait plus adapté avec la possibilité d'un suivi simple assurant le maintien de cette valeur pendant la durée du traitement. Cette remarque vaut aussi pour les lisiers (canards, etc.).

### ? Les effluents de nettoyage et de désinfection

Dans le domaine de l'élevage et au niveau des abattoirs, les produits désinfectants autorisés par le Ministère de l'Agriculture (autorisation de Mise sur le Marché, voire Agrément vétérinaire) présentent une garantie d'efficacité vis-à-vis des virus *Influenza* aviaires dans la mesure où les procédures de nettoyage et de désinfection décrites par les fabricants de produits et recommandées par la profession sont rigoureusement respectées.

En conséquence les effluents produits lors de ces traitements visant les locaux, les matériels d'élevage ou d'abattoir, les pédiluves et rotoluves, les matériels de transport

mais aussi l'environnement de ces sites, présentent un risque négligeable de contamination par le VIA. En effet, à côté des désinfectants proprement dits, les produits de nettoyage contenant des détergents non-ioniques et/ou anioniques, par leur pH élevé ou neutre, agissent aussi sur l'intégrité de l'enveloppe et réduisent ainsi l'infectiosité du virus.

### **Efficacité des produits et des procédés de traitement des eaux destinées à la consommation humaine**

Le code de la santé publique prescrit que les produits et les procédés de traitement des eaux destinées à la consommation humaine doivent être autorisés par le Ministère chargé de la santé.

De plus, les filières de traitement doivent être autorisées par arrêté préfectoral et être conçues de manière à réduire les dangers à un niveau acceptable et conforme aux limites de qualité fixées par le code.

La description des filières de traitement en service figure dans la base de données SISE-EAUX qui permet d'identifier quatre catégories, selon la classification en vigueur :

- A1 : traitement physique simple (filtration) et désinfection,
- A2 : traitement physique normal, traitement chimique poussé, affinage et désinfection,
- A3 : traitements physique et chimique poussés, affinage et désinfection,
- N : absence de désinfection.

La synthèse des références bibliographiques disponibles sur l'efficacité des différents produits et procédés sur les virus entériques classiquement présent dans l'environnement a permis au groupe de travail « Virus transmissibles à l'homme par voie orale » de l'Afssa d'aboutir au tableau 1 :

Tableau 1:

## Abattement des entérovirus lors des différentes étapes du traitement de l'eau

Etapes	Abattement en log	Turbidité	Autres conditions nécessaires
Stockage d'eau brute	0		
Filtration sur berge	3	≤ 0,3 NFU	
Filtration lente	2		
Pré-traitement physique	0		
Pré-ozonation 0.25 mgO <sub>3</sub> /mg COT	0		
Coagulation-floculation -décantation-filtration	2	≤ 0,3 NFU	
Pré-ozonation-Coagulation-floculation - décantation-filtration	2.5	≤ 0,3 NFU	
Adsorption CAG 2 <sup>ème</sup> étage	1	/	
Ozonation 0.4 ppm après 4 min	4	≤ 0,3 NFU	
Chlore 0.5 ppm après 30 min	4	≤ 0,3 NFU	et pH ≤ 8
ClO <sub>2</sub> 0.25 ppm après 30 min	1	≤ 0,3 NFU	
NH <sub>2</sub> Cl	0	/	
UV 600 J/m <sup>2</sup> (Astrovirus 1000 J/m <sup>2</sup> )	4	≤ 0,3 NFU	Absorbance UV > 95%
MF 0.2 µm	2	≤ 0,3 NFU	
Coagulation + MF	7		
Ultra filtration 100 000 Da	6		
Nanofiltration	2		prise en compte de 1% de fuite au niveau des joints
Osmose inverse	2		prise en compte de 1% de fuite au niveau des joints

Les valeurs contenues dans ce tableau ne sont valables que si le contrôle de la turbidité est assuré

Chaque étape du traitement contribue à l'élimination des virus présents dans l'eau et la fiabilité du résultat dépend du nombre d'étapes, c'est-à-dire du nombre de barrières.

L'une d'elle, la désinfection, est indispensable pour les eaux qui ne sont pas naturellement protégées contre un risque de contamination microbiologique.

**Lorsque la désinfection est chimique** (chlore et ses dérivés, ozone), son efficacité dépend principalement de la concentration (C) du désinfectant et du temps de contact (T). Pour un microorganisme donné, le produit de ces deux valeurs (CT) est voisin d'une constante exprimée en mg/L.mn. Les virus *Influenza* appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae* qui sont des virus ARN à enveloppe lipidique. Ils ne sont pas aussi résistants à ces désinfectants que les virus non enveloppés (ex : *Norovirus*, *Poliovirus*, virus de l'hépatite A), et les filières de traitement des eaux doivent les éliminer, sauf défaillance ou non respect des règles de l'art.

**D'autres procédés de type physique** tels que l'ultrafiltration et l'osmose inverse sont adaptés à la rétention des virus, mais sont encore peu utilisés. Les rayons ultra-violet (UV) utilisés pour la désinfection des eaux destinées à la consommation

humaine, des eaux usées et des locaux connaissent aujourd'hui un regain d'intérêt. Leur action désinfectante dépend principalement de la dose d'UV, exprimée J/m<sup>2</sup>, réellement reçue par l'eau transitant dans le réacteur et leur efficacité peut être réduite par la présence dans l'eau de matières en suspension et de colloïdes. De plus, il faut signaler la résistance particulière aux UV des adénovirus pour lesquels une dose de 1000J/m<sup>2</sup> est nécessaire pour obtenir un abattement de 4 log.

Pour ces raisons, et en l'absence de données sur l'efficacité des produits et des procédés autorisés pour le traitement des eaux d'alimentation vis-à-vis des virus *Influenza*, il est possible de considérer, au regard des caractéristiques de ces virus, que l'abattement par les filières sera au moins égal à celui qu'elles permettent d'obtenir pour les virus habituellement présents dans l'eau et que leur efficacité augmentera si l'on multiplie les barrières.

### **Efficacité des procédés et produits de traitement des eaux usées et des boues résiduaires**

La finalité d'un système d'assainissement est de collecter des eaux usées et de les traiter pour pouvoir les éliminer sans effets dommageables pour l'environnement et pour la santé.

Les procédés et les produits utilisés pour le traitement des eaux usées et des boues résiduaires ne sont pas réglementés. Il n'existe qu'un arrêté du 8 janvier 1998 visant l'épandage des boues qui définit l'hygiénisation comme « un traitement qui réduit à un niveau non détectable les agents pathogènes présents dans la boue ». Un seuil de référence est fixé pour les salmonelles (< 8 NPP/10gMS), les entérovirus (< 3NPPUC/10gMS) et les œufs d'helminthes viables (< 3/gMS).

Dans la pratique, les stations d'épuration ne sont conçues que pour traiter les pollutions carbonée, azotée et parfois phosphorée. Les modalités du rejet des effluents traités sont choisies pour éviter un impact direct ou indirect sur la santé.

Sauf exceptions (petites stations d'épuration à lits de rhizophytes et lagunage naturel avec temps de séjour suffisant), les filières classiques de traitement des eaux usées ne permettent pas, si elle ne sont pas complétées par un traitement approprié, d'abaisser à un seuil suffisant un danger microbien, Actuellement, très peu de stations d'épuration sont équipées d'un dispositif de désinfection. Celles qui le sont se trouvent généralement en zone littorale et rejettent les effluents traités à proximité d'une zone de baignade ou d'une zone conchylicole.

De plus, le traitement des eaux usées produit des déchets issus des prétraitements (refus de dégrillage, sables, graisses, etc.) et des boues dans lesquels se concentre une bonne partie de la charge microbienne.

#### **? Traitement de désinfection des effluents**

Le chlore et ses dérivés (chlore gazeux et eau de javel) ont des performances insuffisantes et engendrent des sous-produits qui ont des effets néfastes sur les milieux. Dans la pratique, il s'agit d'un traitement par des chloramines résultant de la réaction du chlore avec l'azote organique et ammoniacal contenu dans l'effluent. La faible efficacité virucide des chloramines est reconnue.

Globalement pour la chloration, des chutes de titres viraux de 2 à 4 log décimal, pour des doses de l'ordre de 2 à 10 mg/L avec une durée de contact inférieure à 30 minutes, peuvent être obtenues avec un suivi de l'efficacité au moyen des indicateurs suivants présentés par ordre de résistance décroissante :

Bactériophage ARN F-spécifiques › Entérovirus / Coliphage › Rotavirus › Streptocoques fécaux › Coliformes.

Bien qu'il soit virucide, le bioxyde de chlore, qui ne réagit pas avec l'ammonium, a été peu utilisé pour des raisons d'ordre technique et économique.

En raison de ses performances insuffisantes, la chloration est progressivement remplacée par une désinfection par rayonnements ultra-violet.

L'ozone qui est un virucide efficace n'est que rarement utilisé sur des installations importantes. En effet, en raison de la nécessité d'une production "in situ" et du coût, l'ozonation ne peut être d'application universelle.

Ozonation et traitements U.V. ont des efficacités similaires. Globalement, pour des doses de 5 à 10 mg/L d'ozone ou de 400 J/m<sup>2</sup> (pour le traitement U.V.) dans les eaux résiduaires, les abattements de titres pour différents indicateurs sont :

- de 1 à 3 log décimal pour les bactériophages ARN F-spécifiques et Coliphages,
- de 3 à 5 log décimal pour les streptocoques fécaux.

Il faut rappeler que l'efficacité de ces deux traitements est fortement diminuée par la présence de matières organiques et que les doses d'emploi pourraient être diminuées si les matières en suspension étaient éliminées par des procédés de filtration.

L'acide peracétique, comme le peroxyde d'hydrogène qu'il libère, sont souvent évoqués, mais rarement utilisés car ils nécessitent des concentrations et des temps de contact élevés et parce que leur efficacité virucide fait débat.

Les techniques membranaires sont, pour l'instant, très peu utilisées. Leur efficacité pour retenir les virus, qui est en théorie élevée, ne semble pas avoir été évaluée sur les installations qui sont récentes.

Enfin, l'efficacité d'une désinfection exige une bonne régulation des débits pour que soit respecté le couple « temps de contact - concentration ». Le fonctionnement hydraulique des réseaux d'assainissement ne permet que rarement de respecter cette condition.

**CONCLUSION** : Très peu de stations d'épuration sont équipées d'un dispositif permettant de désinfecter l'effluent traité et leur efficacité peut se révéler parfois insuffisante.

### ? Traitement de désinfection des boues

Une grande partie de la charge microbienne présente dans une eau usée se concentre dans les boues produites lors du traitement de ces eaux par des procédés biologiques. Les boues peuvent donc contenir des virus infectieux que la plupart des traitements ne permettent pas d'éliminer dans des proportions suffisantes pour effacer le danger viral.

La plus grande partie de ces boues est épandue en agriculture sans être hygiénisée et la maîtrise du risque sanitaire repose sur l'application de règles de bonnes pratiques.

Les traitements d'hygiénisation résultent d'une conduite particulière des traitements de stabilisation : des boues correctement chaulées, séchées thermiquement ou encore compostées peuvent être considérées comme des boues hygiénisées.

Les facteurs de traitement sont principalement la température, le pH (un pH > 11,5 est nécessaire pour inactiver les virus) et la durée du traitement (temps de séjour).

Le tableau 2 ci-dessous présente les traitements qui permettent d'obtenir un abattement de 4 log (99,99 %) sur tous les microorganismes pathogènes potentiellement présents (virus, bactéries, parasites) dans certaines conditions. (Elissalde et al. 1994).

**Tableau 2 : Systèmes de traitements des boues et conditions permettant d'obtenir un abattement de 4 log (Elissalde et al. 1994)**

Traitements efficaces (4log)	Conditions
Digestion thermophile	55°C, 10 à 20 jours
Stabilisation thermophile	55°C, 10 jours
Compostage bien conduit	50-60°C, 15-30 jours
Chaulage fort	pH 12, 10 jours
Pasteurisation	70°C, 3h

Quant à l'incinération, elle n'est utilisée que pour les unités très importantes parfois en co-incinération avec des déchets ménagers. Le danger après incinération est nul.

#### CONCLUSION :

La plupart des boues issues des stations d'épuration, notamment en milieu rural, sont épandues en agriculture, sans traitement préalable d'hygiénisation.

- Le risque sanitaire lié à cette pratique est faible si des règles appropriées d'épandage et d'hygiène du personnel sont respectées,
- Un traitement d'hygiénisation approprié permet de réduire le risque à un niveau négligeable,
- En cas d'incinération, le risque devient nul.

#### Intérêt des phages en tant qu'indicateurs indirects de l'efficacité des traitements sur le danger viral

La présence de virus dans les fèces et la transmission possible par voie féco-orale laissent supposer une possible transmission *via* les eaux usées ou l'épandage des boues (The Writing Committee of the WHO consultation on Human *Influenza A/H5 2005*)<sup>11</sup>.

Les indicateurs bactériens de pollution fécale (*Escherichia coli*, Entérocoques) permettent de contrôler le bon déroulement du traitement appliqué. Cependant, l'abattement en indicateurs bactériens n'est comparable à l'abattement viral que dans certains cas particuliers (traitement primaire, traitement par boues activées, etc.) alors que, dans d'autres cas, il le surestime (traitement de désinfection par le chlore, les UV, etc.). Dans cette deuxième situation, la recherche de bactériophages fécaux apporte une information plus précise quant à l'abattement viral susceptible d'être obtenu (Havelaar 1991, Lucena et al. 2004). Le choix du type de bactériophages (coliphages somatiques, phages ARN F-spécifiques et phages de *B. fragilis*) est ensuite directement dépendant du type de traitement appliqué.

<sup>11</sup> L'estimation de la capacité d'un traitement à éliminer les virus a été partiellement abordée par le groupe de travail « Virus transmissibles à l'homme par voie orale » de l'Afssa, dans le cadre de la rédaction de la question relative à l'« interprétation de la présence de génome viral dans des matrices alimentaires et en milieu hydrique en termes d'infectiosité potentielle »

Une approche utilisant simultanément un indicateur bactérien et un indicateur phagique pour surveiller le rejet de virus H5N1 dans l'environnement proche des zones d'élevage semble à la fois réalisable et sécurisant.

Cette approche est possible car les volailles rejettent de grandes quantités d'indicateurs bactériens mais aussi de bactériophages fécaux. Par exemple les phages ARN F-spécifiques et des coliphages somatiques sont retrouvés respectivement entre 3 et 7  $\log_{10}/g$  et entre 3 et 8  $\log_{10}/g$  dans les fèces de volailles et, par suite, dans les eaux usées issues de ces élevages à des concentrations comprises entre 3 et 5  $\log_{10}/mL$  (Havelaar 1991). Par ailleurs, l'analyse de bactériophages est rapide<sup>12</sup> et d'un faible coût.

Cette approche semble sécurisante car s'il est difficile de garantir que l'abattement en indicateurs bactériens reflète celui obtenu pour un virus *Influenza* H5N1, il est probable que l'abattement en bactériophages fécaux le sous-estime. Ceci est dû au fait que les virus H5N1 sont des virus enveloppés qui sont reconnus comme étant moins résistants dans l'environnement et à différentes conditions de pH et de température que les virus nus comme les bactériophages fécaux. Ils peuvent donc constituer des indicateurs d'efficacité de traitement.

En conclusion, la stratégie de surveillance recommandée serait d'associer un indicateur bactérien et un indicateur phagique pour estimer la capacité d'un traitement à éliminer les virus sur les sites d'élevage de volailles. Cette stratégie semble, d'un point de vue analytique, facilement réalisable et sécurisante. Il s'agit, par contre, de fixer l'abattement viral minimum à obtenir pour un traitement des eaux et/ou des boues. Ceci doit s'effectuer à partir de données plus précises concernant l'excrétion virale et la dose minimale infectante des virus *Influenza A* (H5N1).

---

<sup>12</sup> Le temps de réponse est fonction du degré de pollution de l'échantillon

## Références bibliographiques

- Block S. (2001)** Disinfection, sterilization and preservation, 5ème Edition Lippincott Williams and Wilkins.
- Elissalde N. Ganière, J.P., L'Hostis, M., Legeas, M., Demillac, R. & Carré, J. 1994.** Les germes pathogènes dans les boues résiduaires des stations d'épuration urbaines. *ADEME*. 90 p.
- Evans D.H., Stuart P., Roberts D.H. (1977)** Disinfection of animal viruses. *Br. Vet. J.* (133), 356-359.
- Havelaar A.H. 1991.** Bacteriophages as model viruses in water quality control (AWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology). *Water Research* 25 (5), 529-545.
- King D.J. (1991)** Evaluation of different methods of inactivation of Newcastle disease virus and avian influenza virus in egg fluids and serum. *Avian Diseases*, 35, (3), 505-514.
- Kohn A., Gitelman J., Inbar M. (1980)** Unsaturated free fatty acids inactivate animal enveloped virus. *Arch. Virol.* (66), 301-307
- Langmark J., Storey M.V., Ashbolt N.J., Stenstrom T.A. (2005).** Accumulation and fate of microorganisms and microspheres in biofilms formed in a pilot-scale water distribution system, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71 (2), 706-712.
- Lu H. (2003)** Survival of avian influenza virus H7N2 in SPF chickens and their environments. *Avian Diseases*, (47), 3 (suppl), 1015-1020.
- Lucena F., Duran A.E., Moron A., Calderon E., Campos C., Gantzer C., Skraber S. & Jofre J. 2004.** Reduction of bacterial indicators and bacteriophages infecting faecal bacteria in primary and secondary wastewater treatments. *Journal of Applied Microbiology* 97 (5), 1069-1076.
- Mahnel H. (1976)** Stability of Teschen, HCC, ND and vaccinia viruses against 5 disinfectants. *Zentralbl. Veterinarmed B*, 23 (5, 6), 403-411.
- Mahnel H. (1979)** Resistenzunterschiede zwischen viren verschiedenen gruppen gegenüber einigen chemisch-physikalischen dekontaminationsverfahren, *Infection*, (7) 5, 240-246.
- Mahnel H., Schmidt M. (1986)** Über die wirkung von silberverbindungen auf viren in wasser, *Zbl. Bakt. Hyg. B*, 182, 381-382.
- OMS, Influenza A (H5N1): WHO Interim Infection Control Guidelines for health care facilities.**
- Petit F., Craquelin S., Guespin-Michel J., Buffet-Janvresse C. (1999)** Nucleic acid extraction from polluted estuarine water for detection of viruses and bacteria by PCR and RT-PCR analysis. *Research Microbiol.*, 150 (2), 143-151.
- Quignon F., Coton E., Picoche B. (2003).** Eléments de réflexion pour une meilleure prise en compte du risque viral en alimentation humaine. *Revue bibliographique – Adria Normandie*.
- Quignon F., Sardin M., Kiene L., Schwartzbrod L. (1997).** Poliovirus-1 inactivation and interaction with biofilm: a pilot-scale study. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (3), 978-982.
- Rose W.G., Perlberg W. (1970)** Method of evaluation of viral inactivation by a chemical disinfectant. *Proceedings of the 56th meeting of the Chem. Spec. Manuf. Association*, 111-115
- Sato H. (1990)** Virucidal effect of ozone treatment of laboratory animal viruses. *Experimental Animals*, 39 (2), 223-229.
- Song C.S. (1988)** Effects of chemical inactivants on viral polypeptide of Newcastle disease virus. *Research reports of the rural development administration veterinary*, 30 (3), 77-89.
- Stallknecht D.E., Shane S.M., Kearney M.T., Zwank P.J. (1990).** Persistence of avian influenza viruses in water. *Avian Diseases*, (34), 406-411.
- Storey M.V., Ashbolt N.J. (2001).** Persistence of two model enteric viruses (B40-8 and MS-2 bacteriophages) in water distribution pipe biofilms, *Water Sci Technol.*, 43 (12), 133-138.
- Storey M.V., Ashbolt N.J. (2003).** Enteric virions and microbial biofilms, a secondary source of public health concern ? *Water Sci Technol.*, 48 (3), 97-104.
- Suarez D.L. (2003)** The effect of various disinfectants on detection of avian influenza virus by realtime RT-PCR. *Avian Diseases*, (47), 1091-1095
- The Writing Committee of the WHO consultation on Human Influenza A/H5 2005.** Avian influenza (H5N1) infections in humans. *The New England Journal of Medicine* 353 (13), 1374-1385.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.