

VIRUS ENTÉRIQUES HUMAINS ET COQUILLAGES

HUMAN ENTERIC VIRUSES AND SHELLFISH

Par Sylvain PARNAUDEAU, Cécile LE MENNEC, Takayuki MIURA, Jean-Claude LE SAUX, et Françoise S. LE GUYADER¹
Communication présentée le 6 mars 2014

RÉSUMÉ

Les virus entériques humains rejetés dans les eaux usées sont très résistants dans le milieu extérieur et peuvent être retrouvés dans les eaux de surface, les eaux littorales ou les coquillages. Si les pathologies induites sont souvent relativement bénignes (type gastroentérites aiguës), le nombre de foyers épidémiques liés à la consommation de coquillages et la transmission possible du virus de l'hépatite A ou d'autres virus induisant des pathologies graves, justifie pleinement le développement de cette thématique. Des études environnementales montrent une quantité de virus détectés dans les coquillages supérieure à celles détectées dans les eaux. Cette concentration peut expliquer la prévalence parfois importante des norovirus dans les coquillages. Si de nombreuses questions persistent concernant la contamination des coquillages par les virus humains il semble important avant tout de prévenir la contamination des zones littorales par des rejets humains.

Mots clés : coquillage, virus entérique humain, norovirus, virus de l'hépatite A.

SUMMARY

Human enteric viruses discharged in raw sewage are highly resistant and may be detected in surface waters, coastal areas and shellfish. Whereas noroviruses, responsible for relatively benign acute gastroenteritis, are the most common agents implicated in shellfish borne outbreaks, other human viruses which cause severe human diseases, such as hepatitis A virus, may also be transmitted. Environmental studies have demonstrated that virus concentrations detected in shellfish are higher than in surrounding waters. This concentration may explain the high prevalence of noroviruses detected in various shellfish species collected in different countries. If many questions remain regarding viral contamination of shellfish, the most important seems to be the prevention of coastal areas contamination by human sewages.

Key words: shellfish, human enteric viruses, norovirus, hepatitis A virus.

INTRODUCTION

La conchyliculture, un des principaux secteurs économiques du littoral métropolitain, représente la première activité aquacole française. En 2008, cette activité représentait un total de 2970 entreprises distribuées sur l'ensemble du littoral. Notre pays, premier producteur et consommateur européen d'huîtres, représente environ 90% de la production européenne (www.FranceAgriMer). Les exportations d'huîtres représentent annuellement de 4 à 8 % de cette production, contre 2% à l'importation (principalement des huîtres en provenance d'Irlande). Souvent consommée au printemps, ou lors des fêtes de fin d'année, l'huître occupe une place importante dans l'art culinaire français. Elles sont reconnues

comme une source de vitamines et minéraux comme le fer et le magnésium. Leur mode de production, en zone littorale soumise à une constante augmentation de la population, favorise le risque de contamination par des micro-organismes d'origine entérique humaine.

L'implication des coquillages dans des épidémies est connue depuis plus d'un siècle et des normes produits ont été mises en place pour protéger le consommateur, ainsi que des classements sanitaires des zones de production pour leur gestion (Cf article C. Grastilleur ce numéro). Ces critères bactériologiques ont permis de diminuer de façon significative les toxi-infections ali-

(1) Ifremer Laboratoire de Microbiologie, LSEM, BP 21105 44311 Nantes cedex 03
Courriel : soizick.le.guyader@ifremer.fr

mentaires collectives (Tiac) d'origine bactérienne, cependant des épidémies de gastro-entérites virales liées à la consommation de coquillages persistent.

Les principaux virus humains susceptibles de contaminer les coquillages ou tout autre aliment entrant en contact avec de l'eau contaminée, sont les virus nus (la présence d'une enveloppe chez un virus constituant un élément de fragilité), capable de résister dans l'environnement (surface ou eau...), donc essentiellement les virus présentant un cycle de multiplication entérique. Ces virus, excrétés dans les fèces de malades ou de porteurs sains, sont très variés et appartiennent à plusieurs familles virales (**tableau 1**). Les pathologies induites sont diverses telles que par exemple des hépatites, des gastro-entérites, des méningites, fièvre, rash ou conjonctivites... Les virus transmis par les aliments peuvent être classés, globalement, en trois catégories :

- les virus des gastro-entérites : calicivirus (norovirus et sapovirus), astrovirus, rotavirus, adénovirus entériques, virus Aïchi.
- les virus des hépatites à transmission féco-orale : virus des hépatites A et E.
- les virus se multipliant dans l'intestin mais migrant vers d'autres organes comme le système nerveux central (entérovirus).

Des combinaisons virus-aliments peuvent être comparées selon différents facteurs tels la gravité et la prévalence de la maladie, la probabilité des expositions, l'impact sur le commerce, les coûts en matière de santé publique et la capacité de maîtriser ces infections d'origine alimentaire. Basé sur ces divers facteurs, la combinaison norovirus et coquillage est fréquemment rapporté dans de nombreux pays comme source d'épidémie (EFSA, 2011). Il est donc important de comprendre les différents facteurs impliqués dans ces contaminations afin de les prévenir et ainsi de protéger le consommateur (EFSA, 2012).

LES NOROVIRUS, AGENT MAJEUR DE GASTROENTÉRITES

Le genre *Norovirus*, (NoV) appartient à la famille des *Caliciviridae*. Ces petits virus ronds, non enveloppés, possèdent un génome à ARN d'environ 7 700 bases, comportant trois cadres de lecture (ORF). L'ORF 1 code les protéines non structurales, l'ORF2 l'unique protéine de capsid VP1, et l'ORF3 une protéine mineure intervenant dans la stabilité de la capsid (Atmar, 2010). Comme nombre de virus à ARN, les NoV sont très divers génétiquement et, en l'absence de système de multiplication in vitro, ils sont classés par comparaison des séquences codant l'ORF2. À l'heure actuelle, ils sont répartis en cinq géogroupes (G) comprenant au moins 33 géotypes ou clusters et de nombreuses souches en attente de classement (**figure 1**). Les souches infectant l'homme appartiennent aux GI, GII et GIV. Depuis plusieurs années les souches appartenant au GII sont détectées majoritairement et représentent 70 à 80% des souches identifiées dans les cas cliniques (Atmar, 2010).

Caractéristiques importantes pour ces virus, la sensibilité à l'infection est liée à deux mécanismes. L'immunité protectrice est brève et spécifique du géotype, n'induisant pas de protection croisée (Atmar, 2010). Ensuite, la sensibilité dépend de facteurs génétiques liés aux antigènes des groupes sanguins expliquant la symptomatologie différente observée lors d'études chez les volontaires ou lors d'épidémies. Certaines personnes infectées peuvent excréter du virus sans présenter de symptômes (Atmar *et al.*, 2008). L'infection et le développement des signes cliniques dépendent de la souche et du groupe sanguin de l'individu, car ces virus reconnaissent les carbohydrates des antigènes tissulaires de type ABH et Lewis, ligands nécessaires à l'infection (Ruvoen-Clouet *et al.*, 2013). Chez les personnes sensibles, la dose infectieuse de quelques particules virales place ces virus parmi les micro-organismes les plus infectieux. Pour la souche Norwalk, prototype du GI, moins de 10 particules virales peuvent déclencher l'apparition des symptômes chez les individus sensibles (Teunis *et al.*, 2008).

Nom	Taille	Capsid	Génome	Incubation	Pathologie	Saison	Age
Adenovirus	70 nm	complexe	ADN db	3-10 jours	gastroentérite	toute l'année	Jeunes enfants
Aïchi virus	27-32 nm	icosaèdre	ARN sb	1-2 jours	gastroentérite	toute l'année	Tout âge
Astrovirus	27-32 nm	icosaèdre	ARN sb	3-5 jours	gastroentérite	hiver	enfants
Calicivirus	27-32 nm	icosaèdre	ARN sb	2-3 jours	gastroentérite	hiver	Tout âge
Enterovirus	20-30 nm	icosaèdre	ARN sb	7-30 jours	diverse	été	Tout âge
Rotavirus	70 nm	icosaèdre, triple	ARN db	3 jours	gastroentérite	hiver	Jeunes enfants
V. hépatite A	27-32 nm	icosaèdre	ARN sb	jusqu'à 50 jours	hépatite	toute l'année	Tout âge
V. hépatite E	27-32 nm	icosaèdre	ARN sb	jusqu'à 50 jours	hépatite	toute l'année	Tout âge

Tableau 1 : Principaux virus entériques humains rejetés dans l'environnement.

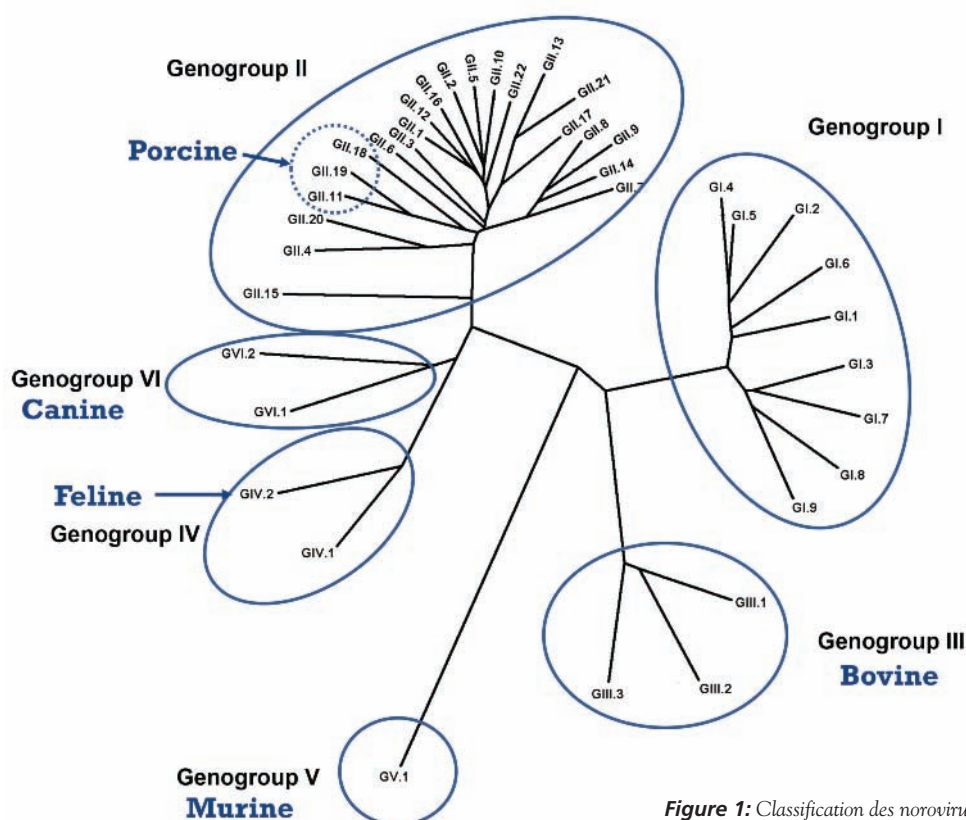


Figure 1: Classification des norovirus en génogroupes et génotypes

Première cause de gastroentérite aigüe chez l'homme toutes classes d'âges confondues les NoV sont les principaux responsables du pic hivernal de gastro-entérite (Ahmed *et al.*, 2013). Les symptômes, relativement mineurs, se caractérisent par le déclenchement soudain d'un ou plusieurs épisodes de vomissements violents puis par une diarrhée accompagnée de douleurs abdominales, nausées et plus rarement de fièvre (Atmar, 2010). La période d'incubation est relativement brève (12 à 72h, en moyenne 24h). Les signes cliniques persistent pendant environ deux à quatre jours au plus, mais l'excrétion virale peut se poursuivre pendant quelques semaines après la disparition des symptômes. Cette excrétion virale explique la transmission fréquente de personne à personne, mais aussi la contamination possible des aliments ou des eaux de surface, en raison d'un nombre important de particules virales rejetées dans le milieu extérieur *via* les fèces humains.

REJET DANS L'ENVIRONNEMENT

Comme présenté ci dessus, en périodes épidémiques hivernales, le nombre de particules virales rejetées par la population est très important et les quantités de virus arrivant dans les stations d'épuration peuvent être élevées. Par exemple, aux Pays-Bas ou au Japon tous les échantillons d'eaux en entrée et sortie de station d'épuration ont été trouvés positifs en NoV, et environ 80% en Italie (Le Guyader *et al.*, 2013). Malgré la diversité des technologies de traitement des eaux usées et des méthodes

de détection de ces virus, les diverses études s'accordent pour montrer un rejet important de particules, pouvant atteindre 105 à 107 copies de génome de NoV/L pendant l'hiver (Le Guyader *et al.*, 2013). Concernant les autres virus entériques tels les virus des hépatites A ou E, leur présence dans les eaux usées est ponctuelle et dépend de l'épidémiologie locale. L'élimination lors des traitements épuratoires dépend de divers facteurs, comme les concentrations initiales en virus des eaux brutes, de leur temps de séjour, de la température, de la radiation solaire, de l'adsorption et de la destruction enzymatique (da Silva *et al.*, 2011). De nombreux points inconnus demeurent car les mécanismes d'épuration sont complexes et difficiles à élucider, particulièrement pour les virus non-cultivables. Après rejet, les NoV s'agrègent entre eux ou sur des particules, ce qui augmente vraisemblablement leur résistance aux différents traitements d'épuration (chlors, UV, ozone). Les nouvelles technologies épuratoires associant un traitement final par ultrafiltration éliminent plus efficacement ces virus (Sima *et al.*, 2011, Simmons, *et al.* 2011).

Lorsque l'on analyse les événements impliqués dans la contamination des coquillages, le déversement accidentel d'eaux usées intervient fréquemment. Divers dysfonctionnements sur les réseaux d'assainissement, peuvent entraîner des rejets pouvant impacter la qualité sanitaire des coquillages élevés à proximité. Ainsi des ruptures de canalisation ou des événements climatiques avec des pluies importantes entraînant des débordements des bassins de traitement ont été rapportés dans diverses études (Thomas *et al.*, 2011).

MÉTHODE DE DÉTECTION

Ces virus étant non ou difficilement cultivables (en particulier si l'on considère norovirus et virus de l'hépatite A respectivement), l'analyse repose essentiellement sur l'utilisation des techniques de biologie moléculaire.

Deux facteurs importants doivent être pris en compte pour l'analyse de coquillage: contrairement à des prélèvements cliniques, la contamination dans l'environnement est faible (proche des limites de sensibilité des techniques de détection) et les virus sont le plus souvent adsorbés sur les tissus. La démonstration que les virus se concentrent majoritairement dans les tissus digestifs de l'huître a permis d'améliorer la sensibilité des méthodes en augmentant la prise d'essais (les tissus digestifs représentant environ 10% du poids de chair d'une huître) et en éliminant des inhibiteurs (souvent présents dans le manteau) (Atmar *et al.*, 1995). À l'heure actuelle la majorité des méthodes cible ces tissus (**tableau 2**). Ces tissus sont homogénéisés le plus souvent par broyage avant traitement par un tampon pour éluer les particules virales. Les particules virales doivent alors être concentrées et diverses techniques s'appuyant sur les propriétés de ces virus (charge ionique, taille..) peuvent être utilisées : précipitation, floculation organique, ultracentrifugation, filtration, lyophilisation (**tableau 2**). La capture antigénique est parfois utilisée à ce stade pour purifier le virus de l'hépatite A, pour lequel un antigène de groupe est connu.

L'étape suivant consiste à extraire et purifier les acides nucléiques. Le génome de ces virus étant constitué d'un ARN, cette étape constitue le point délicat de l'analyse, et les méthodes classiques d'extraction sont associées à des étapes de

purification destinées à éliminer les nombreux inhibiteurs des enzymes reverse-transcriptase ou *Taq* DNA polymérase utilisées dans la RT-PCR. Traditionnellement l'extraction des acides nucléiques a été réalisée par lyse enzymatique (protéinase K), par lyse chimique (thiocyanate de guanidium) ou par simple ébullition, ces étapes étant suivies de phases de purification et de précipitation. Le développement des kits commerciaux de purification est un apport indéniable pour la standardisation des méthodes, en privilégiant les kits permettant une prise d'essai importante. Par ailleurs ces kits commerciaux sont souvent efficaces pour éliminer les inhibiteurs. En effet, si le problème des résultats faux positifs est une préoccupation majeure lors des analyses, le problème des faux négatifs est également très important. La variété et l'hétérogénéité des échantillons de l'environnement rendent impossible l'identification des inhibiteurs et il est donc important d'avoir une efficacité globale sur leur élimination. Sur la demande de la Communauté Européenne, un groupe de travail a été constitué pour élaborer une méthode pour la détection des norovirus et virus de l'hépatite A dans les aliments (dont les coquillages) et l'eau embouteillée, méthode en phase finale de validation. Concernant les coquillages, les virus sont élués à partir des tissus digestifs par la protéinase K puis une extraction directe des acides nucléiques sans étape de concentration est réalisée. La lyse des capsides doit être effectuée par le thiocyanate de guanidium et les acides nucléiques purifiés après adsorption sur de la silice. Des kits commerciaux présentant ces approches sont disponibles sur le marché, certains permettant l'utilisation d'automate ce qui facilitera l'application de cette méthode. L'approche novatrice de ce travail réside dans l'introduction d'un contrôle d'extraction, virus ajouté dans l'échan-

Coquillage	Poids TD	Elution virale	Concentration	Poids utilisé pour extraction AN	Extraction AN	Reference
Huîtres	1.5 g	Chloroforme-butanol, CatFloc (Calgon)	PEG	1.5 g	Prot. K, CTAB	(Atmar <i>et al.</i> , 1995)
	5 g	Tampon pH 8 + Prot. K	nc	0.05 g	Silice et guanidium	(Greening <i>et al.</i> , 2008)
	2 g	Tampon pH 8 + Prot. K	-	nc	Silice et guanidium	(Lowther <i>et al.</i> , 2008)
	1.5 g	Glycine pH 9	PEG	1.5 g	Nuclisens (bioMérieux)	(Le Guyader <i>et al.</i> , 2009)
	5 g	Finely chopped + Prot. K	-	0.15g	RNeasy (Qiagen)	(Gentry <i>et al.</i> , 2009)
	25 g*	Adsorption & elution	PEG (double)	25 g (flesh)	RNeasy (Qiagen)	(dePaola <i>et al.</i> , 2010)
Moules	25 g	Glycine pH 9.5	Ultracentrifugation	1.5 g	TRIzol (Gibco)+ Boom	(Myrmel <i>et al.</i> , 2004)
	2 g	Glycine pH 9.5	Ultracentrifugation	0.1 g	guanidium	(Hernroth <i>et al.</i> , 2002)
	1.5 g	Glycine pH 9.5	PEG	1,5	Nuclisens (bioMérieux)	(Vilarino <i>et al.</i> , 2009)

* : seule méthode basée sur chair totale, PEG: polyéthylène glycol, CTAB: cetyltriméthylammonium bromide.

nc: non communiqué dans l'article;

- : pas d'étape de concentration ;

Tableau 2 : Exemple de méthode utilisée pour détecter les virus dans les coquillages.

tillon (par exemple les tissus digestifs de coquillage). Ceci permet d'évaluer le bon déroulement des étapes de la méthode et d'établir des critères d'acceptabilité. L'interprétation du résultat final dépendra des contrôles d'efficacité d'extraction (bon déroulement des étapes d'éluion-concentration) et d'efficacité d'amplification (vérification d'absence d'inhibiteurs), qui devront être validés avant la détection du pathogène (ISO/TS 15216-2, 2013).

La dernière étape réside donc dans la détection des acides nucléiques présents. Comme indiqué ci dessus seules les techniques d'amplification génomiques présentent une sensibilité suffisante pour l'analyse de ces échantillons. Ces dernières années, la RT-PCR en temps réel avec une sonde d'hybridation est devenue la méthode la plus utilisée en raison de sa spécificité, sensibilité et facilité d'utilisation (développement de kit en une étape). Cependant une difficulté supplémentaire pour détecter ces virus réside dans leur variabilité génomique, en particulier concernant les NoV, ce qui n'est pas le cas du VHA. En effet, le génome, relativement bien connu, possède des régions conservées (comme la partie 5' non traduite) qui est utilisée pour la détection par RT-PCR en temps réel, tandis que des régions plus variables permettent le génotypage (régions codant pour les protéines de capsid VP1-VP3 ou VP1-2A) (Pinto *et al.*, 2010). En revanche, concernant les NoV, cette variabilité génomique est restée pendant longtemps problématique pour la désignation d'amorces consensus. Seule une petite région localisée au début de l'ORF2 codant la protéine de capsid a permis la sélection d'amorces et d'une sonde permettant le développement de tests sensibles et spécifiques pour leur détection par RT-PCR en temps réel (Sima *et al.*, 2011). Le typage s'effectue ensuite par l'amplification d'une partie de cette même ORF. Il est parfois nécessaire d'amplifier une seconde région (polymérase) car de nombreux réassortants ont été décrits ces dernières années (Atmar, 2010).

Le développement de la PCR en temps réel permet d'aborder l'aspect quantitatif de la PCR. Mais cette estimation quantitative doit s'accompagner des différents contrôles d'extraction et d'amplification afin de ne pas sous-estimer la concentration en particules virales de l'échantillon (ISO/TS 15216-1, 2013). La possibilité d'estimer la charge virale des échantillons, sous réserve d'un strict contrôle des phases de concentration, extraction et purification, constituera une aide précieuse pour les études d'analyse de risque (Cf article A. Thebault ce numéro).

CONTAMINATION DES COQUILLAGES

Pour leurs activités physiologiques, les coquillages filtrent de grandes quantités d'eau de mer. Les particules alimentaires vont entrer dans l'estomac par un court oesophage puis les particules sont triées selon leur taille, leur densité et leur digestibilité. L'action ciliaire des cellules épithéliales trie les particules dans l'estomac de la façon suivante: les petites et lourdes particules (ou en excès) sont immédiatement rejetées tandis que les par-

ticules plus grosses ou plus légères vont entrer dans un nouveau cycle pour une nouvelle dégradation. Chez l'huître, le manteau intervient dans la nutrition en participant au premier tri des particules extérieures. Les cellules ciliaires et à mucus des branchies attirent, sélectionnent, capturent et conduisent les particules vers les palpes et la bouche. Les particules sélectionnées pour l'ingestion sont acheminées sous l'action de l'épithélium cilié vers les tissus digestifs, constitué par l'oesophage, l'estomac, la glande digestive. Ensuite les débris sont éliminés via l'intestin, le rectum et l'anus.

Lors d'une étude environnementale, la présence de NoV a été identifiée dans différents apports d'eaux douces, et un lien étroit a pu être établi entre ces apports et la présence de NoV dans les coquillages (Zakhour *et al.*, 2010). La présence de virus dans des coquillages est rapporté dans de nombreux pays avec une variabilité liée à l'épidémiologie ou aux conditions climatiques (**tableau 3**). Cependant, considérant les études portant sur un nombre important d'échantillons, les NoVs peuvent être détectés dans des coquillages produits dans divers pays. Considérant que ces virus persistent longtemps dans le coquillage il est important de prévenir cette contamination. En effet suite à des contaminations de zones de production l'analyse hebdomadaire d'échantillons montrent que les concentrations peuvent rester stable pendant plusieurs semaines, la contamination devenant indétectable après un à deux mois selon la contamination initiale (Le Guyader *et al.*, 2008) (données Ifremer non publiées). La mise en évidence de ligand spécifique des NoVs dans les tissus digestifs est un des mécanismes pouvant expliquer cette persistance (Maalouf *et al.*, 2010). Par ailleurs, les virus entériques humains étant résistant ils peuvent persister aux traitements thermiques comme démontré à plusieurs reprises lors d'épidémies. Ainsi, des palourdes produites et cuites en Chine et exportées congelées aux USA ont entraîné des cas de gastro-entérites (Kingsley *et al.*, 2002). En Australie et Nouvelle-Zélande, des huîtres, importées congelées du Japon ou de Corée, ont induit de nombreux cas de gastro-entérites, même après cuisson (Simmons *et al.*, 2007; Webby *et al.*, 2007). Des tellines importées congelées du Pérou et cuisinées dans la paella ont occasionné par deux fois des épidémies d'hépatite A en Espagne (Pinto *et al.*, 2009). Ces divers exemples montrent l'extrême résistance de ces virus entériques qui restent toujours infectieux après i) rejet dans le milieu marin, ii) accumulation par le coquillage, iii) cuisson et ou congélation, puis éventuellement de nouveau cuisson.

CONCLUSION

Les agents pathogènes les plus souvent impliqués dans les épidémies liées à la consommation de coquillage sont les NoV. Les méthodes permettant leur détection dans les aliments, dont les coquillages, connaissent un développement important grâce à l'apport de la RT-PCR en temps réel et des contrôles en biologie moléculaire. Dans un futur proche, la

standardisation de ces méthodes permettra vraisemblablement la mise en place d'une réglementation spécifique sur les virus entériques et éventuellement un contrôle des zones de production et/ou des produits mis sur le marché. Cependant la contamination des huîtres dépend de nombreux facteurs inhérents aux conditions de production, climatiques, épidémiologiques mais aussi du coquillage lui-même. Afin de pré-

venir la mise sur le marché de coquillages contaminés il est donc important de comprendre les différents mécanismes entrant dans ces divers phénomènes et de supprimer et/ou limiter les sources d'apport de contamination humaine en zone littorale. À terme, la qualité des produits conchylicoles mis sur le marché sera améliorée, et la santé du consommateur mieux protégée.

Étude	Coquillage	Pays	Nb échantillons	Nb. échantillons positif.	Référence
Environnement	Huîtres	USA	45	9 (20%)	(Costantini <i>et al.</i> , 2006)
		Japon	483	33 (6.8%)	(Nishida <i>et al.</i> , 2007)
		UK	146	83 (56.8)	(Lowther <i>et al.</i> , 2008)
		Irlande	38	36 (95%)	(Flannery <i>et al.</i> , 2012)
		Irlande	23	22 (95.6%)	(Rajko-Nenow <i>et al.</i> , 2012)
		Pays-bas	21	1 (16.6%) ³	(Boxman <i>et al.</i> , 2006)
	Moules	Italie	117	60 (51%)	(Pepe <i>et al.</i> , 2012)
		Finlande	51	3 (5.9%)	(Diez-Valcarce <i>et al.</i> , 2012)
		Grèce	51	0	
		Espagne	51	23 (45%)	
Italie		120	10 (8%)	(Suffredini <i>et al.</i> , 2008)	
Marché	Huîtres	UK	66	39 (59%)	(Lowther <i>et al.</i> , 2010)
		US	381	15 (3.9%)	(Woods <i>et al.</i> , 2010)
		UK	844	643 (76%)	(Lowther <i>et al.</i> , 2012)
		France	387	34 (8.8%)	(Schaeffer <i>et al.</i> , 2013)
		Italie	116	14 (12.1%)	(Terio <i>et al.</i> , 2010)
	Moules, huîtres et palourdes	Espagne (importation)	50	12 (24%)	(Polo <i>et al.</i> , 2010)
		Italie	46	34 (70%)	(Pepe <i>et al.</i> , 2012)

Tableau 3 : Prévalence dans divers pays.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahmed SM, Lopman BA, Levy K. A systematic review and meta-analysis of the global seasonality of norovirus. *Plos One*. 2013; 8: e75922.
- Atmar RL. Noroviruses: state of the art. *Food Environ Virol*. 2010; 2: 117-26.
- Atmar RL, Opekum AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, Neill FH, Graham DY. Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14: 1553-7.
- Atmar RL, Neill FH, Romalde JL, Le Guyader F, Woodley CM, Metcalf TG, Estes MK. Detection of Norwalk virus and Hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl Environ Microbiol*. 1995; 61: 3014-8.
- Boxman ILA, Tilburg JJHC, te Loeke NAJM, Vennema H, Jonker K, de Boer E, Koopmans M. Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. *Int J Food Microbiol*. 2006; 108: 391-6.
- Costantini V, Loisy F, Joens L, Le Guyader FS, Saif LJ. Human and animal enteric caliciviruses in oysters from different coastal regions of the United States. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72: 1800-9.
- da Silva A, Kavanagh OV, Estes MK, Elimelech M. Adsorption and aggregation properties of norovirus GI and GII virus like particles demonstrate differing responses to solution chemistry. *Environ Sci Technol*. 2011; 45: 520-6.
- dePaola A, Jones JL, Woods J, Burkhardt III W, Calci KC, Krantz JA, et al. Bacterial and viral pathogens in live oysters: U.S. Market Survey 2007. *Appl Environ Microbiol*. 2010; 76: 2754-68.
- Diez-Valcarce M, Kokkinos P, Soderberg K, Bouwknegt M, Willems K, de Roda-Husman A-M, et al. Occurrence of human enteric viruses in commercial mussels at retail level in three European countries. *Food Environ Virol*. 2012; 4: 73-80.
- EFSA Scientific opinion on an update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses. *EFSA J*, 2011; 9: 2190.
- EFSA Scientific Opinion on Norovirus (NoV) in oysters: methods, limits and control options. *EFSA J*. 2012;10: 2500.

- Flannery J, Keaveney S, Rajko-Nenow P, O'Flaherty V, Dore W. Concentration of norovirus during wastewater treatment and its impact on oyster contamination. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78: 3400-6.
- Gentry J, Vinje J, Guadagnoli D, Lipp EK. Norovirus distribution within an estuarine environment. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75: 5474-80.
- Greening G, Hewitt J. Norovirus detection in shellfish using a rapid, sensitive virus recovery and real-time RT-PCR detection protocol. *Food Anal Methods.* 2008; 1: 109-18.
- Hernroth BE, Conden-Hansson A-C, Rehnstam-Holm A-S, Girones R, Allard AK. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first scandinavian report. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68: 4523-33.
- ISO/TS 15216-1 Microbiology of food and animal feed -horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR, Part 1: method for quantification, 2013.
- ISO/TS 15216-2 Microbiology of food and animal feed -horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR, Part 2: method for qualitative detection, 2013.
- Kingsley DH, Meade GK, Richards GP. Detection of both hepatitis A virus and norwalk-like virus in imported clams associated with food-borne illness. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68: 3914-8.
- Le Guyader FS, Miura T, Atmar RL. Prevalence and control of norovirus and hepatitis A virus in shellfish. in: Foodborne viruses and prions and their significance for public health. Food safety assurance and veterinary public health. 2013; 6: 137-68.
- Le Guyader FS, Parnaudeau S, Schaeffer J, Bosch A, Loisy F, Pommepey M, Atmar RL. Detection and quantification of noroviruses in shellfish. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 74: 618-24.
- Le Guyader FS, Le Saux J-C, Ambert-Balay K, Krol J, Serais O, Parnaudeau S, et al. Aichi virus, norovirus, astrovirus enterovirus and rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 4011-7.
- Lowther J, Henshilwood K, Lees DL. Determination of norovirus contamination in oysters from two commercial harvesting areas over an extended period, using semiquantitative real-time reverse transcription PCR. *J Food Prot.* 2008; 71: 1427-33.
- Lowther JA, Avant JM, Gizysztof K, Rangdale EE, Lees DN. Comparison between quantitative real-time reverse transcription PCR results for norovirus in oysters and shelf-reported gastroenteritis illness in restaurant customers. *J Food Prot.* 2010; 73: 305-11.
- Lowther JA, Gustar NE, Powell AL, Hartnell RE, Lees DN. Two-year systematic study to assess norovirus contamination in oysters from commercial harvesting areas in the United Kingdom. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78: 5812-7.
- Maalouf H, Zakhour M, Le Pendu J, Le Saux J-C, Atmar R L, Le Guyader FS. Norovirus genogroup I and II ligands in oysters: tissue distribution and seasonal variations. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76: 5621-30.
- Myrnel M, Berg EMM, Rimstad E, Grinde B. Detection of enteric viruses in shellfish from the Norwegian coast. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70: 2678-84.
- Nishida T, Nishio O, Kato M, Chuma T, Kato H, Iwata H, Kimura H. Genotyping and quantitation of norovirus in oysters from two distinct sea areas in Japan. *Microbiol Immunol.* 2007; 51: 177-84.
- Pepe T, Ventrone I, Suffredini E, Ceruso M, Croci L, Anastasio A, Cortesi ML. Norovirus monitoring in bivalve molluscs harvested and commercialized in Southern Italy. *J Food Prot.* 2012; 75: 976-81.
- Pinto RM, Costafreda I, Perez-Rodriguez FJ, D'Andrea L, Bosch A. Hepatitis A virus: state of the art. *Food Environ Virol.* 2010; 2: 127-35.
- Pinto RM, Costafreda MI, Bosch A. Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75: 7350-5.
- Polo D, Vilarino ML, Manso CF, Romalde JL. Imported mollusks and dissemination of human enteric viruses. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16: 1036-7.
- Rajko-Nenow P, Kaeveney S, Flannery J, O'Flaherty V, Dore W. Characterisation of norovirus contamination in an Irish shellfishery using real-time RT-qPCR and sequencing analysis. *Int J Food Microbiol.* 2012; 160: 105-12.
- Ruvoen-Clouet N, Belliot G, Le Pendu J. Sensibilité génétique aux infections à norovirus et protection innée de population. *Virologie.* 2013; 17: 264-77.
- Schaeffer J, Le Saux J-C, Lora M, Atmar RL, Le Guyader FS. Norovirus contamination on French marketed oysters. *Int J Food Microbiol.* 2013; 166: 244-8.
- Sima LC, Schaeffer J, Le Saux J-C, Parnaudeau S, Elimelech M, Le Guyader FS. Calicivirus removal in a membrane bioreactor wastewater treatment plant. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77: 5170-7.
- Simmons FJ, Kuo DH-W, Xagorarakis I. Removal of human enteric viruses by a full-scale membrane bioreactor during municipal wastewater processing. *Wat Res.* 2011; 45: 2739-50.
- Simmons G, Garbutt C, Hewitt J, Greening G. A New Zealand outbreak of norovirus gastroenteritis linked to the consumption of imported raw Korean oysters. *New Zealand Med J.* 2007; 120: 50-53.
- Suffredini E, Corrain C, Arcangeli G, Fasolato L, Manfrin A, Rossetti E, et al. Occurrence of enteric viruses in shellfish and relation to climatic-environmental factors. *Let Appl Microbiol.* 2008; 47: 467-74.
- Terio V, Martella V, Moschidou P, Di Pinto P, Tantillo G, Buanavoglia C. Norovirus in retail shellfish. *Food Microbiol.* 2010; 7: 29-32.
- Teunis PFM, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, Baris RS, et al. Norwalk virus: how infectious is it? *J Med Virol.* 2008; 80: 1468-76.
- Thomas A, Le Saux J-C, Ollivier J, Maalouf H, Pommepey M, Le Guyader FS. Norovirus et huîtres: de la terre à la mer. *Virologie.* 2011; 15: 353-60.
- Vilarino ML, Le Guyader FS, Polo D, Schaeffer J, Krol J, Romalde JL. Assessment of human enteric viruses in cultured and wild bivalve molluscs. *Int Microbiol.* 2009; 12: 145-51.
- Webby RJ, Carville KS, Kirk MD, Greening G, Ratcliff RM, Creara SK., et al. Internationally distributed frozen oyster meat causing multiple outbreaks of norovirus infection in Australia. *Clin Infect Dis.* 2007; 44: 1026-31.
- Woods JW, Burkhardt III W. Occurrence of norovirus and hepatitis A virus in US oysters. *Food Environ Virol.* 2010; 2: 176-82.
- Zakhour M, Maalouf H, diBartolo I, Haugarreau L, Le Guyader FS, Ruvoen-Clouet N, et al. Bovine norovirus ligand, environmental contamination and potential cross-species transmission via oyster. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76: 6404-11.