

# NORISK - Résultats

## Voies de transmission des Norovirus, agents pathogènes humains émergents présents dans la chaîne alimentaire

DURÉE DU PROJET  
01/01/2007 – 31/01/2011

BUDGET  
569.911 €

### MOTS CLES

Norovirus humains, Norovirus animaux, détection moléculaire, RT-PCR en temps réel en multiplex, norovirus murin, recombinaison in vitro, extraction virale, fruits rouges, aliments prêt à la consommation.

### CONTEXTE

Les norovirus (NV) sont des pathogènes responsables de gastro-entérites et d'infections dont les symptômes sont typiquement des crampes abdominales, fièvre, diarrhée aqueuse et d'autres symptômes tels que maux de tête, frissons et myalgies généralisées se manifestant généralement pendant 2 à 3 jours. La maladie est auto-limitante dans la plupart des cas. Le genre NV contient 5 génogroupes où le génogroupe I et II (GI et GII) comprennent la plupart des génotypes de NV humains. Les NV bovins et murins sont classés respectivement dans le génogroupe III (GIII) et V (GV), alors que les NV porcins se groupent aussi dans le GII. Les NV humains (majoritairement GI et GII) ont de plus en plus été globalement reconnus comme cause majeure de gastro-entérite aiguë non bactérienne, cependant la détection n'est possible que par des méthodes moléculaires en l'absence de système de culture. Le développement de ces méthodes moléculaires a montré que les NV seraient responsables de 60 % et 77 % des cas de gastro-entérite à étiologie connue aux Etats-Unis et en Europe, respectivement. La proportion d'épidémies à NV causée par la consommation d'aliments contaminés est estimée à 10-20 %. Les produits alimentaires peuvent être contaminés par deux voies principales : soit par contamination avant la récolte, impliquant surtout les produits frais et les mollusques bivalves, ou par contamination pendant ou après la récolte impliquant une personne infectée qui manipule les aliments. Un large éventail de produits alimentaires est concerné par cette dernière voie de transmission. La détection des NV dans les aliments est plus fastidieuse car les NV sont présents en très faible quantité cependant ils devraient pouvoir être détectés due à leur faible dose infectieuse. Ainsi le matériel génomique des NV devrait pouvoir être extrait des matrices alimentaires et successivement détecté par des méthodes de détection moléculaire. De plus, les NVs des espèces bovine et porcine soulèvent des questions sur l'éventuelle transmission zoonotique ou la présence d'un réservoir animal potentiel.

### OBJECTIFS

1. Méthodologie de la détection des NV : élaboration, optimisation et évaluation d'une méthode de RT-PCR en temps réel (RT-qPCR) et détermination de la spécificité, sensibilité et robustesse. Deux protocoles seront développés. Un protocole de RT-qPCR destiné à I a détection des souches de NV GI et GII impliquées dans les épidémies à être utilisé dans le cadre du contrôle et de la surveillance des autorités de la chaîne alimentaire et les opérateurs de l'industrie de l'agro-alimentaire.

Un autre protocole de RT-qPCR dirigé envers un grand éventail de génogroupes de NV (tenant compte des NV animaux récemment décrits) sera développé à des fins de recherche pour l'étude des voies de transmission et rapporter les souches de NV circulantes.

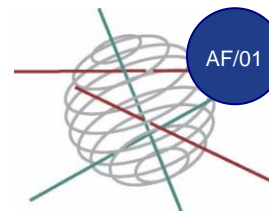
2. Méthode de préparation de l'échantillon : évaluer l'efficacité de plusieurs protocoles de concentration virale, d'extraction d'ARN et de purification d'ARN à partir d'une variété de matrices alimentaires notamment les mollusques bivalves et l'élaboration d'une procédure d'extraction appropriée dans les produits frais/aliments prêts à la consommation.
3. Détection en routine des NV dans les matrices alimentaires (mollusques bivalves et produits frais) : développer et implémenter un protocole standard avec la mise en place de contrôles appropriés pour le criblage rapide des aliments pour la présence de NV en accord avec les recommandations, analyses et harmonisations officiellement approuvées et générer des informations sur la prévalence sur la prévalence des souches de NV dans les aliments vendus au détail, des produits et des procédés de production sous le contrôle des opérateurs de l'industrie agro-alimentaire et la production primaire.
4. Elucider les voies de transmission (hypothèse zoonotique) par traçage moléculaire avec une vue globale sur les souches de NV qui circulent dans les humains, les animaux et les aliments.
5. Traçage des épidémies : scénario pour coupler les données cliniques des épidémies à NV à la cause alimentaire et évaluation du risque.
6. Le développement d'un profil de risque sur les NV présents dans la chaîne alimentaire et les espèces animales (souches circulantes, animal comme réservoir potentiel, zoonose, définition et prévalence dans les aliments à risque et le lien avec les informations épidémiologique).
7. Traçage de l'évolution génétique des NVs : profils génétiques et observation de souches recombinantes.

### CONCLUSIONS

#### Objectif 1:

Une RT-qPCR en multiplex pour la détection simultanée des NV humains GI et GII dans les échantillons cliniques a été conçue avec l'insertion fructueuse du MNV-1 comme contrôle interne d'amplification (CIA). L'évaluation de la méthode a montré une grande concordance entre la réaction en multiplex et les réactions en simplex correspondantes. L'évaluation de la spécificité en testant un éventail d'ARN de NV de référence et des échantillons cliniques positifs pour GI et GII a montré que l'amplification spécifique des NV GI et GII est possible.

AGRO-ALIMENTAIRE



# NORISK - Résultats

Voies de transmission des Norovirus, agents pathogènes humains émergents présents dans la chaîne alimentaire

De plus, aucune amplification croisée n'a été observée lorsqu'une collection de NV bovins et d'autres virus entériques (non NV) ont été soumis au test en multiplex. Finalement, le MNV-1 a été intégré avec succès comme CIA, malgré qu'une concentration suffisamment faible étaient nécessaire afin d'éviter l'interférence avec la réaction multiplex développée pour détecter de façon quantitative et simultanée la présence de GI et GII dans un échantillon donné.

Des problèmes persistants de contamination menant à des résultats faussement positifs ont été rencontrés et une investigation a été menée afin d'identifier la source de contamination. Le problème a pu être résolu et seuls des contaminations occasionnelles ont été observées par la suite.

## Objectif 2:

Deux protocoles d'extraction pour les NV dans les fruits rouges (produits frais) et les aliments prêts à la consommation (APC) ont été évalués pour leur robustesse et la sensibilité. Pour les APC, le protocole était basé sur l'utilisation de guanidine isothiocyanate contenant un réactif pour l'extraction de l'ARN viral des échantillons de matrice alimentaire (protocole basique appelé TriShort) avec une éventuelle étape de concentration/purification (protocole étendu appelé TriConc). Pour l'extraction des NV dans les fruits rouges, le protocole consistait d'une élution alcaline des particules virales de la matrice alimentaire suivie d'une précipitation au polyéthylène glycol et d'une purification à l'aide d'un solvant organique. Après purification, l'ARN fut détecté par la RT-qPCR en multiplex optimisée lors de l'objectif 1. L'influence de i) la concentration en NV de l'inoculum et ii) les différents types de matrice alimentaire sur la récupération des NV à partir de ces matrices a été investiguée pour chaque protocole.

Globalement, le protocole d'élution-précipitation a pu récupérer les NV des fruits rouges avec des efficacités de 10 à 20 % alors que le protocole pour les APC avaient des efficacités de récupération de >1 % (TriShort) et 0,1 % à 10 % (TriConc). Pour les deux protocoles d'extraction, tenant compte des facteurs de dilution la limite de détection était approximativement de 104 copies génomiques/10g. La récupération simultanée de NV GI et GII en quantité similaire jusqu'à 100 fois plus de l'un des deux était possible pour les deux catégories d'aliments.

Une influence significative de la concentration de l'inoculum NV sur son taux de récupération a été observée pour les 2 protocoles : des inoculums hautement concentrés en NV ont pu être retrouvés dans plus de cas et avec plus d'efficacité en comparaison avec les inoculums peu concentrés en NV. On a également noté une influence significative du type d'aliment sur la récupération de NV. Les deux phénomènes étaient plus marqués, il est vrai, pour le protocole d'extraction direct d'ARN en comparaison avec le protocole d'élution-précipitation.

## Objectif 3:

La réaction de RT-qPCR en multiplex décrite dans l'objectif 1 et les protocoles d'extraction décrits dans l'objectif 2 ont été combinés dans deux méthodes de détection. Le NV murin MNV-1, un NV cultivable du génogroupe V, a été utilisé et évalué comme réactif de contrôle dans la réaction de détection. Le MNV-1 a été utilisé afin de contrôler le protocole de détection virale en entier (contrôle de procédé, PC), la réaction de transcription inverse (contrôle de RT, RTC) et la réaction de qPCR (contrôle d'amplification interne, IAC) lors de la détection des NV dans les matrices alimentaires.

L'évaluation a pu montrer que le MNV-1 comme PC et RTC permet la détection respectivement d'une extraction inefficace et de l'inhibition de la RT-PCR. D'autre part, le MNV-1 IAC n'a montré qu'un faible intérêt alors il a été suggéré de l'exclure de la réaction.

## Objectif 4:

Le criblage de 75 échantillons de fruits pour la présence a été réalisé avec le protocole d'extraction pour les fruits rouges (objectif 2) et la réaction de RT-qPCR en multiplex (objectif 1). Le MNV-1 a été utilisé comme PC, RTC et IAC. Un total de 18 échantillons a été testé positif pour NV GI et/ou GII malgré la bonne qualité bactériologique des aliments. Les résultats obtenus illustrent bien la difficulté à interpréter les résultats positifs des (q)PCR en terme de danger pour la santé publique lorsqu'aucune maladie ou épidémie associée a été rapportée. Malgré le fait que même une faible quantité de NV détectée peut indiquer une contamination virale à un moment donné dans la chaîne alimentaire et les résultats obtenus doivent donc être interprétés avec attention en terme de danger pour la santé publique. Néanmoins, un risque potentiel de transmission alimentaire de NV à partir de ces matrices alimentaires ne peut être exclu.

Le génotypage de 115 échantillons cliniques provenant d'épidémies de gastro-entérite rapportées à l'Institut Scientifique de Santé Publique ont permis de caractériser les souches NV impliquées dans ces épisodes en Belgique pour la période 2007-2010. Parallèlement, le criblage d'échantillons cliniques d'animaux domestiques, après création d'une banque de matières fécales pour différentes espèces animales, a permis la caractérisation de NV animaux au cours de la première partie du projet notamment dans l'espèce bovine et porcine. Les résultats obtenus confortent le fait que les NV bovins et porcins sont endémiques dans nos régions. Cependant des NV n'ont pas pu être mis en évidence pour d'autres animaux domestiques dans cette étude.

## Objectif 5 :

Après l'introduction d'une méthode d'analyse spécifique aux norovirus pour la surveillance des épidémies d'origine alimentaire, il est devenu clair, que NV est un agent important responsable d'épidémies de gastro-entérite en Belgique. Pendant ces trois dernières années, les NV étaient les agents les plus rapportés. De plus, la détermination des voies de transmission des NV s'est avérée être difficile. Par la présentation d'un scénario pour les gastro-entérites, une classification basée sur la transmission potentielle a été possible. Pour toutes les épidémies rapportées aucune matrice alimentaire contaminée de façon primaire comme les mollusques bivalves ou les fruits rouges n'a pu être incriminée. Les aliments contaminés de façon secondaire jouent un rôle important dans la transmission des NV avec les personnes impliquées dans la préparation des aliments (food handler) comme vecteur crucial. Mis à part les épidémies d'origine alimentaire, les transmissions de personne à personne et une contamination importante de l'environnement représentaient des facteurs de risque pour la transmission des NV dans la population. La promiscuité comme dans les colonies de vacances ou les maisons de repos, le partage des installations sanitaires et la préparation commune des repas, en concomitance avec la grande infectiosité des NV et l'existence de porteurs asymptomatiques rendent les populations dans les collectivités très vulnérables. Bien que les infections à NV sont pour la plupart bénignes, elles ont un impact majeur sur la santé publique (particulièrement dans les maisons de repos) et peuvent engendrer des frais importants (moins de personnel à disposition) ainsi que d'autres embarras tels que la fermeture d'un camp de jeunesse. Malgré la difficulté pour prévenir et limiter les risques d'infection à NV, certaines mesures doivent toute fois être prises.



## NORISK - Résultats

Voies de transmission des Norovirus, agents pathogènes humains émergents présents dans la chaîne alimentaire

Une bonne hygiène des mains, des toilettes et de la cuisine, une infrastructure adéquate ainsi qu'un rapportage rapide des épidémies à NV peuvent réduire les risques d'infection et limiter la progression des infections. Les connaissances acquises pour les épidémies rapportées à la plateforme au cours du projet nous ont permis de formuler et de publier des mesures et des recommandations spécifiques pour les épidémies à NV afin d'aider les inspecteurs et les médecins à réaliser un diagnostic rapide et à contenir les épidémies.

### Objectif 6 :

Tout au long du projet NORISK des NVs ont pu être détectés dans différentes matrices alimentaires destinées à la consommation humaine, dans des échantillons cliniques humains et animaux notamment dans l'espèce bovine et porcine. Pour une meilleure compréhension des voies de transmission, les séquences des NVs détectés ont été déterminées et ont été analysées. Le géotypage des NVs détectés dans les aliments s'est avéré constituer un véritable défi et a constitué un facteur limitant car la contamination virale dans ces matrices était trop faible pour permettre une amplification par PCR suivi du séquençage. Cet obstacle n'a pu être surmonté et seules les séquences des NVs détectés dans les échantillons cliniques humains et animaux ont pu être déterminées. Aucun NV animal n'a pu être détecté dans les échantillons cliniques humains. Inversement, aucun NV humain n'a pu être détecté dans les échantillons cliniques animaux. Rien n'indique donc une éventuelle transmission inter-espèce pour les NV et la possibilité d'éventuelles transmissions zoonotiques paraît peu probable. Toutefois, les NV sont des virus à ARN avec une grande plasticité génomique et ces changements pourraient conduire à des modifications d'hôtes qui ne sont pas à exclure (objectif 7).

### Objectif 7 :

L'analyse des séquences obtenues dans les échantillons cliniques humains et bovins montrent plusieurs souches dont la classification dans la région de la capsid diffère de celle de la région de la polymérase indiquant qu'il s'agit là probablement de souches recombinantes. Pour les NV humains, alors que la majorité des NV détectés au cours des épisodes de gastro-entérite en 2007 et 2008 appartenaient au GII.4, d'autres NV du GII ont été détectés à partir de fin 2008 aux côtés des GII.4. Parmi elles, différentes souches de NV recombinantes détectées dans des échantillons provenant de différentes épidémies entre 2008 et 2010. De nouvelles séquences de « super » polymérases (GII.e et GII.g) telles que la polymérase GIIB ont été détectées pendant ces années. La signification exacte de l'apparition de ces polymérases et leur origine n'a pas encore été élucidée mais leur implication dans plusieurs épisodes de gastro-entérite indiquent qu'elles pourraient avoir un avantage par rapport aux souches parentales de capsid.

De nombreux NV recombinants ont été décrits sur base des données de séquences nucléotidiques cependant aucune donnée expérimentale sur la recombinaison chez les NV n'était disponible. A l'aide du modèle cultivable du MNV, nous avons investigué la fréquence de recombinaison entre deux souches sauvages co-infectantes de MNV dans les cellules RAW. La mise au point d'un outil de géotypage par qPCR a permis de discriminer de façon précise entre les deux souches parentales et la détection d'un MNV recombinant viable (Rec MNV) parmi les virus filles. L'analyse génétique du recombinant a permis de mettre en évidence un événement de recombinaison homologue localisé au niveau de la jonction ORF1-ORF2. Rec MNV possédait des courbes de croissance distinctes par rapport aux souches parentales et produisaient des plages de lyse plus petites que les souches sauvages dans les cellules RAW. Nous avons donc montré expérimentalement que les MNV subissent la recombinaison homologue à l'endroit reconnu comme point préférentiel de recombinaison pour les NV suggérant que le modèle MNV pourrait être utilisé pour les études in vitro de recombinaison chez les NV. De plus, les résultats montrent que l'échange de matériel génétique entre NV peut générer des virus avec des propriétés biologiques distinctes de celles des virus parentaux.

## COORDONNEES

### Coordinateur

#### *Etienne Thiry*

Université de Liège  
Faculté de médecine vétérinaire  
Département Maladies infectieuses  
et parasitaires, Virologie  
Bld de Colonster, 20, B43 b  
B-4000 Liège  
Tel: +32 (0)4 366 42 51  
Fax: +32 (0)4 366 42 61  
Etienne.thiry@ulg.ac.be

### Promoteurs

#### *Mieke Uyttendaele & Johan Debevere*

Universiteit Gent  
Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen  
Laboratory of Food Microbiology and  
Food Preservation  
Coupure Links 653, B-9000 Gent  
Tel: +32 (0)9 264 61 78  
Fax: +32 (0)9 225 55 10  
mieke.uyttendaele@UGent.be,  
johan.debevere@UGent.be

#### *Katelijne Dierick & B. Brochier*

Instituut scientifique de santé publique  
Département de Microbiologie, division  
Bactériologie et division Virologie  
NRL Foodborne outbreaks (SPF)  
Rue Juliette Wytzman 14  
B-1050 Brussels  
Tel: +32 (0)2 642 51 53  
Fax: +32 (0)2 642 53 27  
Katelijne.Dierick@iph.fgov.be, bernard.  
brochier@iph.fgov.be

#### *Lieve Herman*

Instituut voor Landbouw en Visserijonderzoek  
(ILVO)  
Technology and Food Unit (T&V)  
Brusselsesteenweg 370  
B-9090 Melle  
Tel: +32 (0)9 272 30 00  
Fax: +32 (0)9 272 30 01  
l.herman@ilvo.vlaanderen.be

#### *Georges Daube*

Université de Liège  
Faculté de médecine vétérinaire  
Sciences des denrées alimentaires  
Microbiologie des denrées alimentaires  
Bld de Colonster, 20, B43 b  
B-4000 Liège  
Tel: +32 (0)4 366 40 15  
Fax: +32 (0)4 366 40 44  
Georges.Daube@ulg.ac.be

