

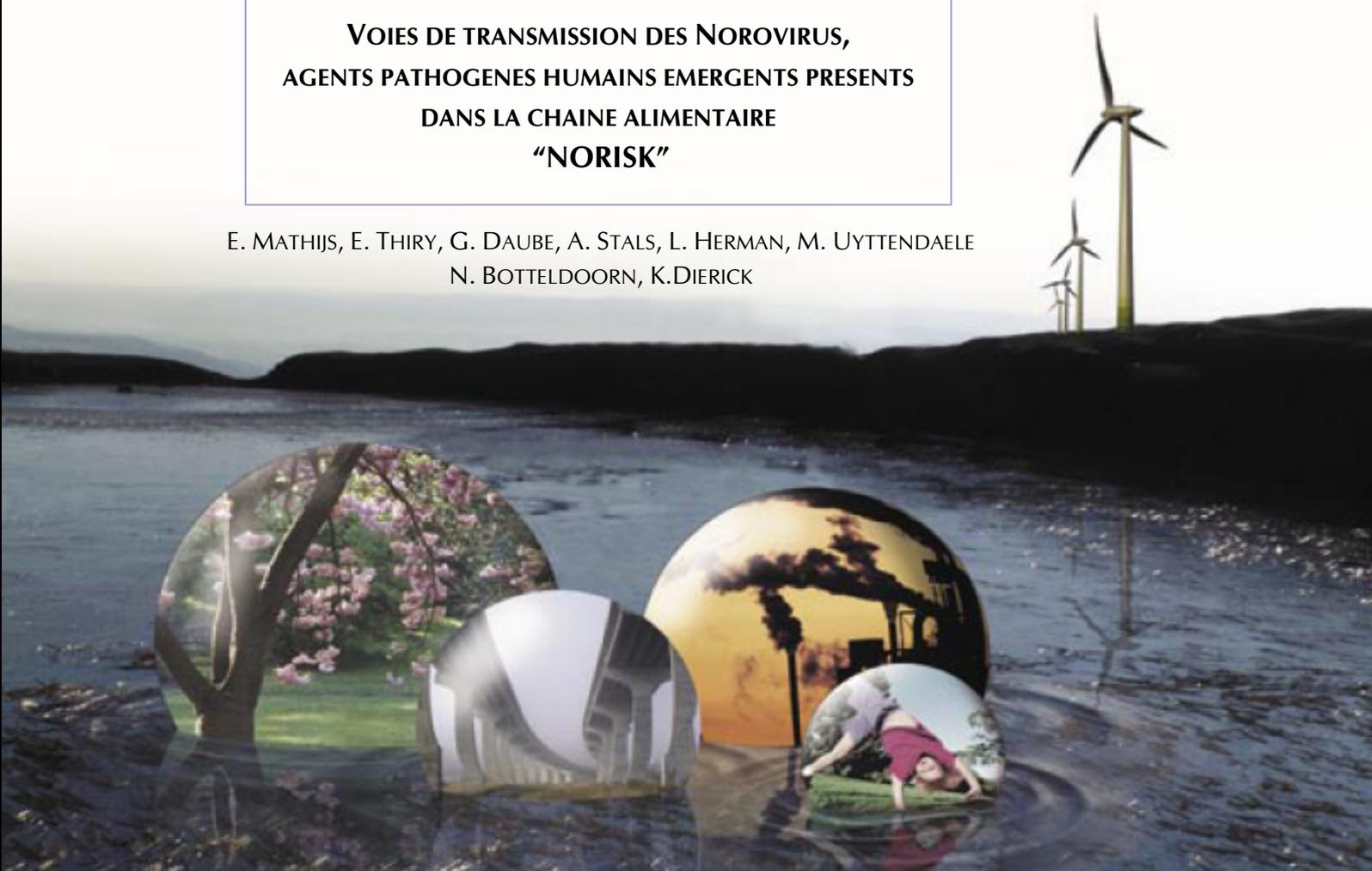
SSD

SCIENCE FOR A SUSTAINABLE DEVELOPMENT



**VOIES DE TRANSMISSION DES NOROVIRUS,
AGENTS PATHOGENES HUMAINS EMERGENTS PRESENTS
DANS LA CHAINE ALIMENTAIRE
"NORISK"**

E. MATHIJS, E. THIRY, G. DAUBE, A. STALS, L. HERMAN, M. UYTTENDAELE
N. BOTTELDOORN, K. DIERICK



ENERGY 

TRANSPORT AND MOBILITY 

AGRO-FOOD 

HEALTH AND ENVIRONMENT 

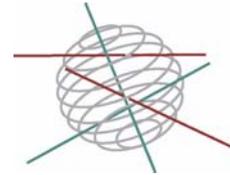
CLIMATE 

BIODIVERSITY 

ATMOSPHERE AND TERRESTRIAL AND MARINE ECOSYSTEMS 

TRANSVERSAL ACTIONS 

SCIENCE FOR A SUSTAINABLE DEVELOPMENT
(SSD)



Agro-alimentaire



RAPPORT FINAL
RESUME

**VOIES DE TRANSMISSION DES NOROVIRUS,
AGENTS PATHOGENES HUMAINS EMERGENTS PRESENTS
DANS LA CHAINE ALIMENTAIRE
"NORISK"**

SD/AF/01A

Promoteurs

Etienne Thiry

Université de Liège (ULg),
Faculty of Veterinary Medicine, Department of infectious and parasitic
diseases, Virology

Georges Daube

Université de Liège (ULg)
Faculty of Veterinary Medicine, Food Sciences Department
Food microbiology

Mieke Uyttendaele

Universiteit Gent (UGent)
Faculty of Bio-science Engineering, Laboratory of Food Microbiology
and Food Preservation

Katelijne Dierick & Bernard Brochier

Institut Scientifique de Santé Publique (ISP)
Department of Microbiology - Division of Bacteriology and Division Virology
NRL Foodborne outbreaks (SPF)

Lieve Herman

Instituut voor Landbouw en Visserijonderzoek (ILVO)
Technology and Food Unit (T&V)

Auteurs

Elisabeth Mathijs, Etienne Thiry, Georges Daube
University of Liège

Ambroos Stals, Lieve Herman, Mieke Uyttendaele
ILVO

Nadine Botteldoorn, Katelijne Dierick
Scientific Institute of Public Health

Janvier 2009



BELGIAN SCIENCE POLICY



Rue de la Science 8
Wetenschapsstraat 8
B-1000 Brussels
Belgium
Tel: + 32 (0)2 238 34 11 – Fax: + 32 (0)2 230 59 12
<http://www.belspo.be>

Contact person: Christine Mathieu
+ 32 (0)2 238 34 93

Neither the Belgian Science Policy nor any person acting on behalf of the Belgian Science Policy is responsible for the use which might be made of the following information. The authors are responsible for the content.

No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without indicating the reference :

Elisabeth Mathijs, Etienne Thiry, Georges Daube, Ambroos Stals, Lieve Herman, Mieke Uyttendaele, Nadine Botteldoorn, Katelijne Dierick. ***Voies de transmission des norovirus, agents pathogènes humains émergents présents dans la chaîne alimentaire "NORISK"***. Rapport Final Phase 1 Résumé. Bruxelles : Politique scientifique fédérale 2009 – 7 p. (Programme de recherche « La science pour un Développement Durable »)

CONTEXTE

Les Norovirus (NV) sont parmi les causes majeures de gastroentérites chez les adultes. Aux Pays-Bas, 153 épidémies de gastroentérites ont été investiguées entre 1994 et 1999. Parmi ces épidémies, 17% ont été considérées d'origine alimentaire et 76% auraient été provoquées par les NVs. Les mollusques bivalves sont reconnus comme une source importante d'infection virale d'origine alimentaire car, de par leur mode d'alimentation, ils concentrent les particules virales. Plusieurs autres types d'aliments ont été impliqués dans la transmission de pathologies virales (fruits, légumes, sandwiches) contaminés suites à un contact avec de l'eau polluée ou à des manipulations lors de leur transformation ou préparation. 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

- Mise au point, optimisation et évaluation de la PCR en temps réel, détermination de la spécificité, sensibilité et robustesse.
- Evaluation de l'efficacité de diverses méthodes de concentration, extraction et purification des ARN, avec un accent sur l'élaboration d'une procédure d'extraction appropriée pour les produits frais et les aliments prêts à être consommés.
- Développer et implémenter un protocole standard avec la mise au point de contrôles appropriés pour un screening rapide des aliments (produits de la mer et produits frais).
- Elucider les voies de transmission (hypothèse de zoonose) à travers un suivi moléculaire, avec une vue globale sur les souches de NVs circulant chez l'homme, les animaux et dans les aliments.
- Elaborer un scénario pour coupler les données cliniques des épidémies à NVs à leur cause alimentaire et élaborer un profil de risque.
- Développer un profil du risque
- Suivi de l'évolution génétique des NVs : réalisation des profils génétiques et étude de l'émergence de recombinants.

PLAN DE TRAVAIL

- **Méthodes d'analyse**
Cette partie a été réalisée comme prévue dans le plan initial et sera implémentée pendant la deuxième phase du projet.
 - PCR en temps réel échantillons d'origine humaines, animales et des mollusques bivalves (choix des amorces, sondes et SYBR Green, quantification avec le NV murin et/ou le calicivirus félin)
 - Extraction – méthodes de concentration (eau, plats préparés, fruits, mollusques bivalves)
- **Evolution des virus**
Cette partie a été réalisée comme prévue dans le plan initial et sera implémentée pendant la deuxième phase du projet.
 - Genotypage : NVs dans les échantillons d'origines humaines, animales et des mollusques bivalves, criblage des denrées alimentaires pour la vente au détail, des unités de transformation, de la production primaire pour les contaminations à NV
 - Recombinants : NVs dans les échantillons d'origines humaines, animales et des mollusques bivalves
- **Risk profiling** : Cette partie sera implémentée pendant la deuxième phase du projet.

- **Développement d'un réseau :** Cette partie a été entamée comme prévue dans le plan initial et sera implémentée pendant la deuxième phase du projet.

RESULTATS-CONCLUSIONS

Les méthodes d'analyse pour la détection des NV dans les différentes matrices alimentaires sera optimisé et validé au cours du projet.

A. Des protocoles de RT-PCR en temps réel ont été évalués pour la détection des NV GGI et GGII. L'utilisation du Taqman Universal Mastermix a été privilégiée en combinaison avec les amorces et sondes du CEN/TC/WG6/TAG4. Les méthodes ont été optimisées à l'aide de plasmides pGI et pGII comme standards au lieu de fragments d'ADN monocaténaire pour éviter les contaminations. Les pellicules adhésives optiques ont été choisies pour sceller les plaques 96 puits pour limiter les contaminations. Le protocole de RT-PCR en temps réel pour la détection du NV murin (MNV) -1 mis au point par Baert et al., 2008 s'est montré approprié pour la détection des MNV-1. Tous les prises d'essai en simplex ont été fructueuses dans deux thermocycleurs (ABI Prism® SDS 7000 et Roche Lightcycler LC480). L'analyse de la limite de détection des 3 essais individuels ont montré qu'un minimum de 10 copies des plasmides pGI/pGII/p20.3 – contenant les sites d'hybridation des amorces et sondes pour GGI, GGII et MNV-1 respectivement – ont pu être détectées avec des valeurs de Ct moyennes de 37.38/38.02/35.11 respectivement.

B. Tous les essais de RT-PCR en temps réel simplex optimisés ont été combinés dans une réaction multiplex et, lorsque des quantités identiques de pGI, pGII et p20.3 en mélange ont été détectées par la réaction multiplex, seule une perte négligeable de la sensibilité a pu être constatée par rapport aux réactions simplex.

Lorsque pGI, pGII et p20.3 ont été mélangés à des concentrations différentes, un effet compétitif mutuel a pu être remarqué entre les réactions individuelles de GGI et GGII dans la réaction multiplex. Cet effet compétitif devint clair lorsqu'un excédent de 2 log ($10^5 / 10^3$ copies et $10^3 / 10$ copies) était présent pour l'une des 2 cibles (pGI/pGII), entraînant des écarts des cycles seuils de 1,8 à 5,6 Ct. De plus, lors d'un excédent de 4 log (10^5 and 10 copies), la cible avec la concentration la plus faible ne pouvait être détectée (Ct>50).

L'influence de la réaction du MNV-1 sur les réactions des GGI et GGII dans la réaction multiplex était limitée lorsqu'une des cibles pGI ou pGII est présente dans la réaction. Toutefois, la présence de 10^3 et 10^5 copies de p20.3 n'a pas causé d'écarts dans les valeurs de Ct lorsqu'il y eut une différence de 2 log entre pGI et pGII.

Cette observation a montré les limites de la réaction multiplex pour la détection de faibles quantités de NV d'un génogroupe (GGI/GGII) en présence de grandes quantités d'un NV d'un autre génogroupe (GGI/GGII) dans le même échantillon.

Par ailleurs, ces résultats ont montré que l'utilisation de la réaction du MNV-1 comme contrôle d'amplification interne (CIA) est envisageable. Afin d'éviter les effets compétitifs et d'éviter la perte des propriétés quantitatives de la réaction multiplex (en particulier pour la détection de concentrations faibles de virus), un maximum de 10^2 à 10^3 copies du plasmide p20.3 devrait être ajouté à la réaction de PCR en temps réel comme CIA pour la détection des NVs GI/GII

C. La spécificité et sensibilité de la réaction multiplex ont été analysées sur 16 échantillons cliniques, un panel d'ARN de référence NV et 7 virus alternatifs. Tous les échantillons ont été précédemment testés positifs pour NV GGI ou GGII et aussi détectés dans des réactions de PCR respectives GI ou GII dans la réaction multiplex. Tous les génotypes du panel de référence ont été détectés spécifiquement. Pas d'amplification croisée fut constatée entre les deux génogroupes. Les échantillons négatifs et tous les virus alternatifs ont été testés négatifs.

La RT-PCR en temps réel mise au point est une méthode spécifique et sensible pour la quantification des NV GGI et GGII. Le partenaire 3 mettra cette méthode à l'épreuve pour la détection des NV dans les échantillons cliniques et alimentaires pour les épidémies de NV suspectées d'être d'origine alimentaire.

Le développement ultérieur d'une méthode de détection des NV dans les matrices alimentaires inclura le développement et l'optimisation de la préparation des échantillons. Différents protocoles

d'extraction virale et d'ARN dans différentes matrices alimentaires (produits frais et plats préparés) seront comparés et évalués. Dans cette étude, les produits seront contaminés artificiellement avec le MNV-1 et l'efficacité de l'extraction sera analysée à l'aide de la méthode de RT-PCR en temps réel développée.

Le protocole du groupe de travail CEN WG6 TAG4 a été évaluée sur différentes matrices de mollusques bivalves notamment des moules et des huîtres dans la première phase du projet. Afin de limiter les problèmes de contamination rencontrés au début du projet, un nouveau contrôle interne a été développé afin d'éviter l'utilisation de la séquence cible des NV tel que décrit par le CEN. Les limites de détection ont été évaluées sur base d'ARN synthétique à 35 particules/réaction et 25-250 particules/ réaction pour NV GGI et GGII respectivement. Le laboratoire a participé à plusieurs ring-tests organisés entre les membres du CEN pour la détection des NV dans les mollusques bivalves et les résultats ont situé le laboratoire P5 parmi les meilleurs. Cependant, la détection des NV GGI fut plus fastidieuse dans les matrices des mollusques bivalves nécessitant parfois la répétition des prises d'essai. L'utilisation d'une nouvelle trousse d'amplification spécialement conçue pour détecter des faibles quantités d'ARN a permis d'améliorer la sensibilité de la réaction pour les NV GGI. Les valeurs des cycles seuils d'amplification pour la détection des NV GGI et GGII dans les mollusques bivalves étaient largement supérieures à celles observées dans les matières fécales qui indiqueraient une faible contamination virale. Dans la deuxième phase du projet, la préparation des échantillons et la méthode d'extraction virale sera optimisée. Une méthode d'extraction appropriée permettra non seulement d'améliorer la détection des NV mais aussi d'amplifier suffisamment de matériel génétique pour permettre le séquençage des souches de NV détectées.

Des NV et autres calicivirus ont été détectés dans les échantillons de matières fécales animales diarrhéiques collectés au cours de la première phase du projet. La majorité des NV bovins détectés correspondaient à la souche Newbury GIII.2. De plus, plusieurs souches détectées s'alignaient avec une souche naturellement recombinante Thirsk GIII.1/GIII.2. Cette observation confirme que, comme les NV humains, les NV bovins seraient capable de recombiner. Dès lors, même si jusqu'à ce jour il n'y pas d'évidence claire que les bovins peuvent être infectés par des souches de NV humains, cette observation pourrait laisser en suspens la question du potentiel zoonotique des NV animaux. En effet, le phénomène de recombinaison pourrait générer des nouvelles souches capables de transgresser la barrière spécifique des espèces. Ce phénomène est plus susceptible de se produire dans les pays tels que la Belgique où la proximité des hommes avec des animaux de rente est particulièrement élevée. La transgression de cette barrière d'espèce pour un calicivirus n'est pas une hypothèse à écarter puisqu'elle a déjà été décrite pour le virus de San Miguel du phoque vers l'espèce porcine (virus de l'exanthème vésiculeux du porc). De plus, le calicivirus félin serait capable d'infecter l'espèce canine cependant aucun lien pathologique n'a pu être montré. La détection des NV et sapovirus (SV) étroitement liés aux souches de NV et de SV humains dans l'espèce porcine fait craindre pour un risque de transmission zoonotique de ces virus. De plus, l'infection expérimentale du porc avec une souche de NV humain a été décrite dans la littérature. Cependant aucune observation sur le terrain de ce phénomène n'a été rapporté dans la littérature jusqu'à ce jour. La recombinaison entre des NV et SV humains et porcins n'a pas encore été décrite mais ne devrait pas être exclue.

La caractérisation génétique des souches de NV détectées dans les différentes matrices et les échantillons cliniques est essentielle afin de comprendre les voies de transmission des NV. Tous les échantillons positifs des épidémies de 2007 (partenaire 3) étaient des souches variantes NV GII.4 2006a et 2006b. Ces résultats sont en accord avec d'autres études rapportées qui décrivent que, depuis leur apparition en 2006, ces souches variantes sont responsables de la majorité des épidémies de gastro-entérite dans le monde (seul leur dénomination change selon les continents : Laurens et Minerva aux Etats-Unis, v4 et v6 au Royaume-Uni). Ces deux souches auraient co-circulé dans des proportions égales cependant la souche 2006b semble prévaloir dans la plupart des pays européens pour les épidémies de la saison 2007-2008. Malheureusement, le faible nombre d'épidémies rapportées pour cette période n'a pas pu montrer cette tendance au niveau belge. Pour la saison 2008-2009, cette tendance n'a pas pu être montrée. Les souches variantes 2006a et b étaient toujours responsable d'épidémies de gastro-entérite cependant d'autres génogroupes et génotypes de NV ont été détectés dans les matières fécales provenant d'épidémies ou de cas isolés de gastro-entérite. Une

co-infection par des NV de génogroupes distincts (GGII/GGIV) a été incriminée dans un échantillon. De par le fait que la co-infection d'un individu pourrait favoriser la recombinaison, cet échantillon sera investigué à la recherche de souches recombinantes. Dans un autre cas isolé de gastro-entérite, on a montré la présence d'un SV GI.2 cependant ce résultat ne pourra pas être inclus dans l'étude de l'analyse du risque pour la Belgique car l'échantillon a été prélevé dans une région frontalière en France. Aucun échantillon clinique prélevé en Belgique n'était positif pour le SV malgré qu'ils aient été incriminés dans plusieurs épidémies dans des pays frontaliers comme la France et les Pays-Bas.

La caractérisation et l'étude des recombinants des NV requièrent l'obtention de séquences couvrant la jonction de l'ORF1/ORF2 et la séquence complète du gène de la capsid. Grâce à l'amplification de fragment couvrant l'ensemble de ces régions (plus de 3000 pb) pour 6 échantillons cliniques, il est possible de s'assurer que les régions de la polymérase et de la capsid proviennent bien de la même particule virale ou d'exclure une potentielle recombinaison. Malheureusement, aucun long fragment n'a pu être réalisé pour les souches UCL5 et UCL6 suspectées d'être des souches recombinantes GIIB/GII.3. Alternativement, un fragment d'environ 1000 pb couvrant la jonction ORF1-ORF2 a pu être obtenu pour UCL5. L'analyse de similarité avec des souches parentales potentielles a localisé le point de recombinaison au niveau de cette jonction comme cela avait été décrit pour d'autres souches naturellement recombinantes de NV et de SV.

Des échantillons alimentaires et de mollusques bivalves positifs fournis respectivement par P3 et P5 ont été amplifiés pour l'analyse des séquences. Malheureusement, la faible quantité de matériel génétique dans l'échantillon n'a pas permis d'amplifier assez d'ADN pour le séquençage. Dans la seconde phase, un effort considérable sera effectué pour surmonter cet obstacle. La quantité d'ARN dans les matrices alimentaires était insuffisante même lorsque les matrices avaient été liées à une épidémie. Les effets inhibiteurs sont particulièrement importants dans ces matrices et la mise au point d'une méthode appropriée d'extraction sera une étape cruciale pour la détection des NV.

Depuis le début de la déclaration des épidémies, l'agent causal demeure inconnu dans 20 à 50% des épidémies d'origine alimentaire déclarées en Belgique. NV est suspecté d'être une cause importante d'épidémie d'origine alimentaire et pourrait être responsable de la majeure partie des cas inconnus. Cependant, à ce jour, aucun système robuste d'extraction et de détection n'est disponible pour détecter le virus en routine dans les différentes sortes de matrices alimentaires. De plus, aucune méthode d'isolement et de détection des NV n'a été approuvée au niveau international et les procédures décrites dans la littérature ne conviennent pas aux analyses de routine. D'autre part, dans la plupart des cas, aucun échantillon clinique n'est prélevé et, dans certains cas, il n'y a aucun reste des repas. Ainsi il est difficile d'établir un lien épidémiologique pour retracer l'aliment incriminé comme étant la source de l'infection. En outre les infections à NV sont sous-estimées car les signes cliniques sont généralement limités à une durée 24 heures et les complications sont rares. De par l'existence de ces limitations, un meilleur protocole a été établi avec les médecins de l'inspection de la santé publique avec l'envoi du matériel fécal lors d'épidémies. Le matériel fécal est plus apte aux analyses que les denrées alimentaires de par la plus grande concentration des particules virales et le grand nombre de protocoles standard d'extraction d'ARN disponible pour cette matrice. Cependant, il a été possible de détecter des NV dans différentes matrices alimentaires avec la procédure décrite par Baert et al. 2006. Dans la seconde phase, nous mettrons à l'épreuve le protocole de RT-PCR en temps réel optimisé de P4 qui, combiné à une méthode d'extraction adéquate, devrait donner une meilleure sensibilité.

RECOMMANDATIONS

Le réseau Norisk a déjà permis la mise au point et l'application d'une procédure de diagnostic pour la détection des NV dans les matrices alimentaires et les échantillons humains. La procédure diagnostique a permis l'identification de plusieurs épidémies de gastro-entérite et la mise en application de cette procédure a permis l'identification des NV comme étant la première cause de gastro-entérite d'origine alimentaire en Belgique en 2007.

Par conséquent, la santé publique devrait prendre en compte ces données en Belgique et des instructions devraient être transmises aux professionnels afin de réduire les risques de contamination par les denrées alimentaires ainsi que les transmissions de personne à personne de l'infection.

Les recommandations émanant du travail scientifique du projet Norisk sont actuellement transmises aux communautés scientifiques et médicales au travers des participations des membres du projet aux

différents comités et groupes de travail. En effet, tous les partenaires sont membres du groupe de travail belge du *Conseil Supérieur de la Santé (CSS) – Hogegezondheidsraad (HGR)* qui étudie la question de la transmission des virus par les aliments. De plus, les partenaires 1 et 2 participent tous deux au projet européen *European Network for Environmental and Food Virology (COST Action 929)*. Les partenaires 3 et 5 sont respectivement Laboratoire National des toxi-infections alimentaires et des contaminations virales des mollusques bivalves.