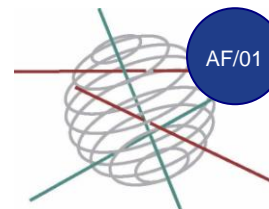


# NORISK - Resultaten



## Transmissieroutes van Norovirussen, opduikende humane pathogenen aanwezig in de voedselketen

DUUR VAN HET PROJECT  
01/01/2007 – 31/01/2011

BUDGET  
569.911 €

### SLEUTELWOORDEN

Humane Norovirus, Dierlijke Norovirus, moleculaire detectie, multiplex real-time RT-PCR, in vitro recombinitie, murine norovirus 1, virus extractie, zacht rood fruit, kant-en-klare maaltijden.

### CONTEXT

Norovirussen (NV) zijn gastroënteritis veroorzakende pathogenen waarvan infecties gekenmerkt worden door typische symptomen zoals buikkrampen, koorts, waterige diarree en andere symptomen zoals hoofdpijn, rillingen en misselijkheid. Deze symptomen manifesteren zich gedurende 2 à 3 dagen, maar de infectie is over het algemeen mild. Het NV genus omvat 5 genogroepen waarvan genogroepen I (GI) en II (GII) de meeste humane NV genotypes bevatten. Runder en muis specifieke NV worden ondergebracht in genogroepen III (GIII) en V (GV), terwijl varkens specifieke NV ook geclassificeerd worden in GII. Humane NV (voornamelijk GI en GII NV) worden steeds meer erkend als een belangrijke oorzaak van acute niet-bacteriële gastroënteritis wereldwijd. Detectie is echter slechts mogelijk door moleculaire technieken, gezien NV tot op heden niet gecultiveerd kunnen worden. Ontwikkeling van moleculaire NV detectiemethoden leidden tot de schatting dat 60 % en 77 % van alle gastroënteritis uitbraken met gekende oorzaak in de USA en in Europa veroorzaakt zouden worden door NV. Eveneens wordt geschat dat 10 tot 20 % van alle NV uitbraken zou veroorzaakt worden door consumptie van NV gecontamineerde levensmiddelen. Levensmiddelen kunnen gecontamineerd worden met NV via 2 transmissieroutes. Enerzijds kan het levensmiddel voor de oogst gecontamineerd worden, een transmissieroute waarbij voornamelijk groenten, fruit en tweekleppige schelpdieren betrokken zijn. De besmetting van de schelpdieren gebeurt door kweek in verontreinigd water, terwijl besmetting van groenten en fruit kan gebeuren via besmet irrigatiewater. Anderzijds kan het voedsel tijdens of na de oogst gecontamineerd worden (door een besmette voedselbehandelaar of voedselplukker). Bij deze laatste transmissieroute kunnen een groot aantal verschillende levensmiddelen betrokken zijn. Detectie van NV in levensmiddelen is moeilijk aangezien detectie van lage aantallen mogelijk moet zijn door de lage infectie dosis van NV. Daarom vereisen protocols voor detectie van NV in levensmiddelen een bijkomende stap voor extractie en concentratie van het virus vanop het levensmiddel. NVs werden ook reeds geïsoleerd uit verschillende diersoorten, waardoor vragen rijzen zoals de mogelijkheid tot een zoönotische transmissie en het bestaan van een dierlijk reservoir voor humane NV..

Ten eerst een real-time RT-PCR test voor detectie van gekende GI en GII NV, die reeds betrokken waren bij NV uitbraken. Dit protocol kan gebruikt worden door overheidsinstanties en voedselbedrijven ter verificatie van geproduceerde levensmiddelen. Ten tweede wordt een real-time RT-PCR protocol ontwikkeld gericht op detectie van verschillende NV genogroepen (inclusief nieuw geïdentificeerde dierlijke NV). Deze test kan gebruikt worden voor onderzoeksdoelinden zoals het analyseren van NV transmissieroutes en het in kaart brengen van momenteel circulerende NV genotypes.

2. Staalvoorbereiding: de doeltreffendheid van methodes voor concentratie van virussen en concentratie/opzuivering van viraal RNA zullen geëvalueerd worden in een breed gamma aan levensmiddelen. Hierbij zal toegespitst worden op ontwikkeling van protocols voor tweekleppige schelpdieren, groenten en fruit en kant-en-klare levensmiddelen.
3. Routine detectie van NV in levensmiddelen (tweekleppige schelpdieren en groenten/fruit): een standaard protocol zal ontwikkeld worden waarbij adequate controles ingebouwd zullen worden, waarna dit protocol gebruikt zal worden voor snelle screening van levensmiddelen voor NV. Op deze wijze zal informatie verworven worden aangaande de aanwezigheid van NV in levensmiddelen die aangeboden worden op de markt, levensmiddelen en productieprocessen gecontroleerd door voedselbedrijven en levensmiddelen uit de primaire productie.
4. Opheldering van transmissieroutes (inclusief zoönotische hypothese): De transmissieroutes van NV zullen onderzocht worden m.b.v. moleculaire opsporing, waarbij een globaal beeld zal geschetst worden van NV circulerend in mensen, dieren en levensmiddelen.
5. Het opsporen van uitbraken: het opsporen van NV uitbraken zal onderzocht worden door het koppelen van klinische data met (1) een eventueel voedselgebonden oorzaak en (2) een risico inschatting.
6. Ontwikkeling van een risicoprofiel voor NV: Een risicoprofiel zal opgesteld worden voor NV aanwezig in de voedselketen (typering circulerende NV, potentieel dierlijk reservoir, zoönose, definiëren van risicovolle levensmiddelen, incidentie van NV in deze levensmiddelen, linken met epidemiologische informatie)
7. In kaart brengen van genetische evolutie van NV: Bij het opsporen van de genetische evolutie van NV zullen genetische profielen opgesteld worden en recombinitie onderzocht worden.

### DOELSTELLINGEN

1. NV RNA detectiemethodologie: uitwerking, optimalisatie en evaluatie van een real-time PCR test en bepaling van de specificiteit, gevoeligheid en robuustheid van deze test. Hiervoor zullen 2 protocols ontwikkeld worden.



# NORISK - Resultaten

Transmissieroutes van Norovirussen, opduikende humane pathogenen aanwezig in de voedselketen

## CONCLUSIES

### Objectief 1:

Een multiplex real-time RT-PCR test voor simultane detectie van humane GI en GII NV in klinische stalen werd ontwikkeld, waarbij MNV-1 succesvol geïntegreerd werd als real-time PCR interne amplificatie controle. Evaluatie van deze test toonde een hoge overeenkomst aan tussen de multiplex PCR en de overeenkomstige singleplex PCR reacties. Analyse van de specificiteit van de multiplex PCR werd uitgevoerd door een NV referentie panel en klinische NV GI en GII stalen te onderwerpen aan de PCR. Resultaten toonden aan dat specifieke amplificatie van NV GI en GII mogelijk was en bovendien werd geen cross-amplificatie waargenomen wanneer een collectie van dierlijke NV en andere (niet-NV) enterische virussen aan de multiplex PCR werden onderworpen. Tot slot werd MNV-1 succesvol geïntegreerd als IAC, mits een gepaste concentratie werd gebruikt om interferentie met de kwantitatieve eigenschappen van de multiplex PCR te vermijden.

Aanhoudende contaminatieproblemen leidend tot vals-positieve resultaten werden geobserveerd, maar onderzoek werd gevoerd naar de oorzaak van deze contaminatie. Het probleem kon onder controle gehouden worden en verder werd slechts occasioneel contaminatie waargenomen.

### Objectief 2:

Twee protocollen voor extractie van NV uit zacht rood fruit (geselecteerd als risicovol levensmiddel in de groenten en fruit categorie) en uit kant-en-klare levensmiddelen werden geëvalueerd naar robuustheid en gevoeligheid toe. Voor de kant-en-klare levensmiddelen werd een direct RNA extractieprotocol geëvalueerd, dat gebruik maakte van guanidine isothiocyanaat ter extractie van het genomisch materiaal van NV uit het levensmiddel (kort protocol: TriShort), eventueel aangevuld met een concentratie/opzuivering (uitgebreid protocol: TriConc). Het protocol voor extractie van NV uit zacht rood fruit bestond uit alkalische elutie van de NV uit het levensmiddel, gevolgd door polyethyleenglycol precipitatie en opzuivering m.b.v. organische solventen. Na opzuivering van het RNA werd dit RNA gedetecteerd door de multiplex test ontwikkeld voor objectief 1. Zowel de invloed van de concentratie van het NV inoculum als de invloed van verschillende voedseltypen op de detectie van NV werden onderzocht voor beide protocols.

Over het algemeen konden NV m.b.v. het elutie-concentratieprotocol gerecupereerd worden met een efficiëntie van 10 tot 20 % uit het geïnoculeerde levensmiddel. Het direct RNA extractie protocol resulteerde in dergelijke efficiënties van >1 % (TriShort) en 0.1 tot 10 % (TriConc). Voor beide protocols bleek de detectielimiet te schommelen rond 104 NV genomische kopieën / 10 g levensmiddel. Simultane detectie van GI en GII NV aanwezig in 100-voudige concentratieverschillen was mogelijk bij beide protocols.

Een significante invloed van de NV inoculum concentratie op het terugvinden ervan werd waargenomen voor beide protocols, waarbij hoog geconcentreerde NV inocula in meer gevallen en met een hogere efficiëntie konden teruggevonden worden in vergelijking met de laag geconcentreerde NV inocula. Er werd ook een significante invloed van het levensmiddelentype waargenomen op het terugvinden van NV. Beide fenomenen waren weliswaar meer uitgesproken voor het direct RNA extractie protocol in vergelijking tot het elutie-precipitatie protocol.

### Objectief 3:

De multiplex test beschreven in objectief 1 werd gecombineerd met de virus extractie protocols in objectief 2, wat leidde tot de beschrijving van 2 NV detectie methodes.

Het murine norovirus 1, een cultiveerbaar GV NV, werd in deze methodes geïntegreerd als controle reagens. MNV-1 werd gebruikt ter controle van het volledige detectieprotocol (proces controle; PC), de reverse transcriptie (reverse transcriptie controle; RTC) en de real-time PCR test (interne amplificatie controle; IAC) bij detectie van NV in levensmiddelen. Evaluatie toonde enerzijds aan dat de MNV-1 PC en RTC gebruikt konden worden voor opsporen van inefficiënte extractie en inhibitie van de RT-PCR, respectievelijk. Anderzijds bleek de MNV-1 IAC weinig bijkomende waarde te geven en een protocol werd gesuggereerd zonder gebruik te maken van MNV-1 IAC.

### Objectief 4:

Een totaal van 75 fruitstalen werden geanalyseerd op aanwezigheid van NV, waarbij gebruik werd gemaakt van de multiplex test (objectief 1) en elutie-precipitatie protocol. MNV-1 werd gebruikt als PC, RTC en IAC. 18 Stalen testten positief voor GI en/of GII NV, ondanks een goede bacteriologische kwaliteit. Resultaten behaald tijdens deze screeningsstudie toonden aan dat interpretatie van detectie van NV met behulp van moleculaire technieken niet eenvoudig bleek, in het bijzonder naar de volksgezondheid toe. Hoewel deze lage NV concentraties een indicatie geven van virale contaminatie gedurende de productieketen van groenten en fruit, moeten deze resultaten met omzichtigheid geïnterpreteerd worden. Hoewel deze resultaten niet meteen een gevaar aanduiden voor de volksgezondheid, kon een mogelijk risico voor voedselgebonden transmissie van NV via deze levensmiddelen evenmin uitgesloten worden.

Resultaten verzameld bij genotypering van 115 klinische stalen afkomstig van gastro-enteritis uitbraken gerapporteerd bij het Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid tussen 2007 en 2010 lieten ons toe om de betrokken NV genotypes te karakteriseren. Het opstellen van een collectie fecale stalen afkomstig van gedomesticeerde dieren (voornamelijk runderen en varkens) en het screenen van deze stalen voor aanwezigheid van dierlijke norovirussen liet toe tot karakterisering van norovirussen die circuleren in deze dieren. Resultaten behaald tijdens deze karakterisering bevestigden dat zowel runder- als varkensgerelateerde NVs endemisch kunnen zijn in onze regio's. Anderzijds werden geen NVs gedetecteerd in fecale stalen afkomstig van andere dieren.

### Objectief 5:

Na de introductie van een specifieke analysemethode voor Norovirus voor de surveillance van voedseluitbraken werd duidelijk dat Norovirus een belangrijk agens is bij het veroorzaken van voedseluitbraken in België. Gedurende de voorbije drie jaren was het zelfs het meest gerapporteerde agens. Het werd ook duidelijk dat het niet eenvoudig is om de transmissiewegen van Norovirus te bepalen. Dankzij de introductie van een draaiboek voor gastro-enteritis specifiek voor Norovirus, werd een classificatie gebaseerd op de mogelijke transmissieweg mogelijk. In geen enkele van de gerapporteerde uitbraken was primair besmette voeding zoals tweekleppige weekdieren of rood fruit betrokken. Secundair besmette voeding speelt wel een belangrijke rol in de transmissie van Norovirus met een geïnfecteerde voedselbereider als cruciale vector. Behalve de voedselgerelateerde uitbraken, werd het duidelijk dat verspreiding van persoon op persoon en een hoge besmettingsgraad in de omgeving, risicofactoren zijn voor verdere verspreiding van Norovirus in de bevolking. Het feit dat vele mensen samenleven in bijvoorbeeld jeugdkampen of in rusthuizen, het gemeenschappelijk gebruik van sanitaire voorzieningen en het gemeenschappelijk bereiden van maaltijden, in combinatie met de hoge infectiviteit van Norovirus en het voorkomen van asymptomatische dragers resulteert in zeer gevoelige populaties voor Norovirus-infecties in deze omstandigheden. Hoewel Norovirus infecties meestal een goede afloop kennen, kunnen ze een hoge impact hebben op de gezondheid (vb rusthuizen) en kunnen zij hoge kost (minder personeel op de werkvloer) en veel leed (vb sluiten van een jeugdkamp) veroorzaken.





# NORISK - Resultaten

Transmissieroutes van Norovirussen, opduikende humane pathogenen aanwezig in de voedselketen

Alhoewel zowel de preventie als inperking van een Norovirus infectie niet evident zijn, moeten een aantal maatregelen genomen worden. Een goede hand-, toilet-, en keukenhygiëne, een goede infrastructuur en het vroegtijdig signaleren van gastro-enteritis uitbraken kunnen het risico op Norovirus-infecties verlagen en kunnen het verdere verspreiden van Norovirus beperken. De kennis die voortvloeit uit de Norovirus uitbraken gerapporteerd aan het NRL VTI liet toe om specifieke maatregelen en aanbevelingen voor Norovirus uitbraken te formuleren en te publiceren. Deze zullen inspecteurs en artsen helpen voor het stellen van een snelle diagnose en preventie van de verdere verspreiding van Norovirus-uitbraken.

## Objectief 6:

Doorheen het NORISK project werden NVs gedetecteerd in verschillende humane levensmiddelen, in mensen en in dieren zoals runderen en varkens. Om de transmissie van NVs op te helderen werden sequenties van gedetecteerde NVs bepaald en verder geanalyseerd. Genotypering van NVs gedetecteerd in levensmiddelen bleek een uitdaging, gezien de lage concentratie van het gedetecteerd genomisch materiaal het sequencen niet toe liet. Dit obstakel werd tijdens het project aangepakt, maar kon niet overkomen worden, wat ervoor zorgde dat de NV sequenties die gegenereerd werden in het project afkomstig waren van human en dierlijke fecale oorsprong. Belangrijk hierbij op te merken is het feit dat dierlijke NVs niet in humaan fecaal materiaal en humane NVs niet in dierlijk fecaal materiaal kon teruggevonden worden. Deze vaststelling ondersteunt de huidige hypothese dat interspecies transmissie en zoönotische transmissie van NVs zeer onwaarschijnlijk is. Desondanks is het niet onmogelijk dat nieuwe NV varianten met afwijkende biologische eigenschappen kunnen ontstaan, mede door de grote genomische drift die NVs kenmerkt (objectief 7).

## Objectief 7:

NV Sequenties bekomen uit humane en dierlijke klinische stalen tonen aan dat deze dierlijk of humane NVs mogelijk recombinante NVs zijn, gezien zij incoherente clustering vertonen ter hoogte van (partiële sequenties van) de polymerase en capside regio's. Voor de humane NVs werden voornamelijk GII.4 NVs gedetecteerd in gastro-enteritis uitbraken in 2007 en 2008, terwijl ook andere niet-GII.4 NVs werden gedetecteerd tussen 2008 en 2010. Tussen deze gedetecteerde niet-GII.4 NVs werd een variëteit aan nieuwe recombinante NVs waargenomen. Nieuwe nucleotide sequenties van "super" polymerases (in NV genotypes GII.e en GII.g) werden gerelateerd met eerder beschreven GII.b nucleotide polymerase sequenties, die eveneens werden gedetecteerd in dezelfde periode. De exacte betekenis en significantie, maar ook de exacte oorsprong van deze nieuwe polymerases werd tot op heden nog niet opgehelderd, maar de detectie van de polymerase sequenties in NV uitbraken kan mogelijk duiden op een selectief (evolutief) voordeel ten opzichte van ouderlijke NVs.

Recombinante NVs werden reeds beschreven aan de hand van sequentiedata, maar experimentele data voor dit fenomeen ontbrak tot op heden. Met behulp van het murine norovirus (MNV) model werd recombinitie tussen twee co-infecterende wild-type MNV isolaten aangetoond in RAW cellen. Het ontwikkelen van een PCR-gebaseerde genotyperings-tool liet ons toe om een accuraat onderscheid te maken tussen de ouderlijke genomen en een infectieuze recombinant-MNV (Rec MNV) tussen de virussen afkomstig van de co-infectie. Door genetische analyse van de Rec MNV recombinant kon een homologe recombinitie gelokaliseerd op de ORF1-ORF2 overlap geïdentificeerd worden. Rec MNV vertoonde afwijkende groeicurves en produceerde kleinere plaques in vergelijking met de wild-type MNV in RAW cellen. In dit onderzoek kon experimenteel aangetoond worden dat MNV homologe recombinitie kan ondergaan op eerder beschreven recombinitie hot spots. Dit onderzoek suggereerde ook dat het MNV model mogelijk geschikt is voor in vitro studies betreffende NV recombinitie. Bovendien toonden resultaten aan dat uitwisseling van genomisch materiaal tussen NVs kan leiden tot het ontstaan van recombinant virussen met afwijkende eigenschappen ten opzichte van de oudervirussen.

## CONTACT INFORMATIE

### Coördinator

#### **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

### Promotoren

#### **Mieke Uyttendaele & Johan Debevere**

Universiteit Gent  
Bio-ingenieurswetenschappen  
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**

Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid,  
Departement Microbiologie  
Division of Bacteriology and Division Virology,  
NRL Foodborne outbreaks (FOD)  
Juliette Wytsmanstraat 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**

Faculté de médecine vétérinaire, Département  
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

