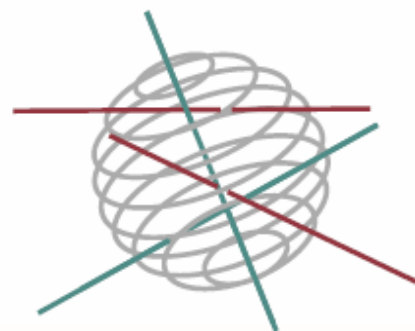


SSD

SCIENCE FOR A SUSTAINABLE DEVELOPMENT



**TRANSMISSIEROUTES VAN NOROVIRUSSEN,
OPDUIKENDE HUMANE PATHOGENEN AANWEZIG
IN DE VOEDSELKETEN**

“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



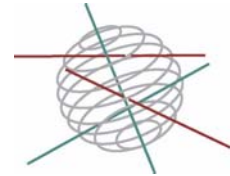
ATMOSPHERE AND TERRESTRIAL AND MARINE ECOSYSTEMS



TRANSVERSAL ACTIONS



SCIENCE FOR A SUSTAINABLE DEVELOPMENT
(SSD)



Agro-voeding



EINDVERSLAG FASE 1

SAMENVATTING

**TRANSMISSIEROUTES VAN NOROVIRUSSEN,
OPDUIKENDE HUMANE PATHOGENEN AANWEZIG
IN DE VOEDSELKETEN**

“NORISK”

SD/AF/01A

Promotoren

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

Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV)
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

Januari 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. ***Transmissieroutes van norovirussen, opduikende humane pathogenen aanwezig in de voedselketen "NORISK"***. Eindverslag Fase 1 Samenvatting. Brussel : Federaal Wetenschapsbeleid 2009 – 6 p. (Onderzoeksprogramma Wetenschap voor een Duurzame ONtwikkeling)

CONTEXT

Norovirussen (NVs) behoren wereldwijd tot één van de belangrijkste oorzaken van gastro-enteritis bij volwassenen en veroorzaken voornamelijk uitbraken. Het Nederlands Instituut van Volksgezondheid bestudeerde 153 gastroënteritisuitbraken tussen 1994 en 1999. 17% van deze uitbraken werd beschouwd als voedselgerelateerd, en 76% werd zeer waarschijnlijk veroorzaakt door NV. Voornamelijk tweekleppige schelpdieren zijn gekend als verspreiders van virale infecties aangezien ze virussen kunnen concentreren in hun spijsverteringsstelsel. Overige levensmiddelen die betrokken kunnen zijn in de transmissie van NVs (fruit, groenten, broodjes) worden dikwijls besmet door contact met vervuild water tijdens de teelt of door onhygiënische hantering tijdens distributie of bereiding. 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.

OBJECTIEVEN

- Ontwikkeling, optimalisatie en evaluatie van een real-time PCR methode en het bepalen van de specificiteit, sensitiviteit en robuustheid ervan.
- Evaluatie van de doeltreffendheid van verschillende virale concentratie-, extractie- en purificatieprotocollen voor allerlei levensmiddelen en een gedetailleerde uitwerking van een aangepaste extractiemethode voor vers en kant-en-klaar voedsel.
- Ontwikkeling en implementatie van een standaard protocol voor routinedetectie van NVs in voedsel (zeevruchten en verse producten) met adequate controles.
- Opheldering van de transmissiewegen (zoönose hypothese) door middel van moleculaire opsporingsmethoden, met enerzijds een overzicht van de NV-stammen overgedragen tussen mensen en dieren, anderzijds een globaal overzicht van de NV-stammen overgedragen via voedsel.
- Analyse van NV-uitbraken: ontwikkelen van een scenario dat klinische data van uitbraken koppelt met hun voedselgerelateerde origine.
- Ontwikkeling van een risicoprofiel.
- Opvolging van de genetische evolutie van NVs: genetische profielen en opduikende recombinante stammen.

WERKPLAN

Analysemethodes : werk in dit deel zal doorgezet worden in de tweede fase van het project

- Real-time RT-PCR: klinische stalen, stalen van dierlijke oorsprong en van tweekleppige weekdieren (keuze van primers, probes en SYBR Green, quantificatie met de murine NV en/of feline calicivirus)
- Extractie – concentratie methodes (water, kant-en-klare maaltijden, fruit, tweekleppige weekdieren)

Evolutie van de virussen : werk in dit deel zal doorgezet worden in de tweede fase van het project

- Genetische karakterisatie : NVs in klinische stalen, stalen van dierlijke oorsprong en van tweekleppige weekdieren
- Recombinante stammen : NVs in klinische stalen, stalen van dierlijke oorsprong en van tweekleppige weekdieren

Risk profiling : werk in dit deel zal doorgezet worden in de tweede fase van het project

Ontwikkeling van een netwerk : werk in dit deel zal doorgezet worden in de tweede fase van het projekt

RESULTATEN-CONCLUSIES

De analyse- en detectie methodes voor de detectie van NoVs in verschillende voedselmatrices zullen worden geoptimaliseerd en gevalideerd.

Real time RT-PCR protocols voor de detectie van GGI en GGII NoVs werden geëvalueerd. Hierbij werd het gebruik van de Taqman Universal Mastermix verkozen, in combinatie met het gebruik van het gebruik van de primers en probes ontwikkeld door de CEN/TC/WG6/TAG4 onderzoeksgroep. Om moleculaire contaminatie te vermijden werd geopteerd om plasmide pGI en pGII in plaats van enkelstrengige DNA fragmenten te gebruiken als real-time PCR standaard positieve controle bij de detectie van GGI en GGII NoVs. Bovendien werden de 96-well real-time PCR platen gesloten door optische zelfklevende films. Het real-time RT-PCR detectie protocol ontwikkelde door Leen Baert *et al.* (2008) voor de detectie van MNV-1 bleek geschikt voor de detectie van MNV-1. Alle singleplex assays werden getest op 2 real-time PCR systemen (ABI Prism® SDS 7000 en Roche Lightcycler LC480) en analyse van de gevoeligheid van de GGI, GGII en MNV-1 assays toonde aan dat een minimum van 10 plasmide-kopiën consistent kon gedetecteerd worden bij Ct-waarden van respectievelijk 37.38, 38.02 en 35.11

De geoptimaliseerde singleplex assays werden gecombineerd tot 1 multiplex assay en een verwaarloosbaar gevoeligheidsverlies werd waargenomen ten opzichte van de singleplex assays bij de multiplex-detectie van mengsels bestaande uit gelijke concentraties van plasmides pGI, pGII en p20.3. Een competitie-effect was echter wel waarneembaar bij de detectie van mengsels bestaande uit verschillende concentraties van plasmides pGI, pGII en p20.3. Dit resulteerde in Ct-shifts bij de detectie van pGI en pGII bij een 2 log concentratieverschil ($10^5 / 10^3$ kopiën en $10^3 / 10$ kopiën) tussen beide plasmides. Bovendien zorgde een 4 log concentratieverschil (10^5 en 10 kopiën) tussen beide plasmides ervoor dat het plasmide aanwezig in de laagste concentratie niet meer gedetecteerd kon worden ($Ct > 50$). Het competitie-effect tussen enerzijds de MNV-1 reactie en anderzijds de GGI en GGII reacties binnen multiplex was beperkt wanneer enkel pGI óf pGII aanwezig was in het mengsel, gecombineerd met verschillende concentraties van p20.3. Er ontstond echter wel een competitief effect wanneer zowel pGI als pGII aanwezig waren in een sample, gecombineerd met hoge concentraties ($\geq 10^3$ kopiën) van p20.3. Dit leidde tot Ct-shifts (tot 8 Ct's) bij de detectie van pGI en pGII. Deze waarnemingen tonen aan dat detectie van GGI en GGII NoVs in 1 sample mogelijk is, maar ook dat de limieten van de multiplex zich bevinden bij de detectie van lage concentraties van 1 NoV genotype (GGI/GGII) in de aanwezigheid van hoge concentraties van een ander genotype (GGII/GGI). Bovendien duiden deze resultaten op de bruikbaarheid van de MNV-1 reactie als IAC. Om competitieve effecten te vermijden en om de quantitativiteit van de assay te behouden, lijken 10^2 tot 10^3 kopiën van het p20.3 plasmide een gunstige IAC-concentratie.

De specificiteit en sensitiviteit van de multiplex assay werd geanalyseerd door 16 klinische GGI/GGII NoV-samples, een Norovirus RNA reference panel en 7 alternatieve virussen te testen. Alle klinische samples en alle geteste genotypes in het Norovirus RNA referentie panel werden specifiek gedetecteerd door de GGI en GGII reacties binnen de multiplex. Bovendien werd in geen enkel geval kruisamplificatie waargenomen en alle negatieve samples en alternatieve virussen testten negatief.

De ontwikkelde multiplex real-time RT-PCR is een specifieke en gevoelige methode voor de quantificatie van GGI en GGII NoVs in klinische en voedsel stalen. Partner 3 zal deze assay gebruiken en evalueren voor de detectie van NoVs in kinische en voedsel stalen bij (voedsel-gerelateerde) NoV-uitbraken.

Verdere ontwikkeling van een methode voor de detectie van NoVs in voedselmatrices zal ondermeer de ontwikkeling en optimalisatie van de staalvoorbereiding inhouden: verschillende protocols voor de virus/RNA-extractie op verschillende voedselmatrices (tuinbouwproducten en kant-en-klare maaltijden) zullen vergeleken en geëvalueerd worden. Hiervoor zullen verschillende voedselproducten gespiked worden met MNV-1 en de extractie-efficiëntie kan dan geanalyseerd worden door de ontwikkelde real-time RT-PCR methode.

Het CEN WG6 TAG4 protocol werd getest op verschillende tweekleppige weekdiermatrices, in het bijzonder mosselen en oesters. Om moleculaire omgevingscontaminatie te vermijden (een hardnekkig probleem bij de start van dit project) werd een nieuwe interne controle ontwikkeld om het gebruik van NoV-specifieke sequenties als interne controle te vermijden. Detectielimieten van 35 en 25-250 synthetische RNA kopiën voor respectievelijk de GGI en GGII reacties werden vastgesteld. Ring-tests, georganiseerd tussen de CEN-leden, voor de detectie van NoVs in tweekleppige weekdieren plaatste het P5 laboratorium tussen de best scorende laboratoria. Niettemin, de detectie van GGI NoVs was minder efficiënt bij voedselmatrices en het gebruik van een alternatieve commerciële mastermix leek dit probleem op te lossen, resulterend in betere resultaten. Ct-waardes bij de detectie van GGI en GGII NoVs in tweekleppige weekdieren waren veel hoger in vergelijking met detectie in faeces stalen, wat aangeeft dat de virale contaminatie in deze tweekleppige weekdier stalen bijzonder laag kan zijn. De staalvoorbereiding en de virus-extractiemethode zal in een volgende fase dan ook op punt gesteld worden. Een aangepaste en geschikte extractiemethode zal enerzijds de detectie van NoVs verbeteren en anderzijds de genotypering van de gedetecteerde NoVs mogelijk maken, momenteel een probleem door het gebrek aan genetisch materiaal in de extracten.

Zowel norovirussen als calicivirussen werden gedetecteerd in dierlijke faeces stalen genomen bij de start van het project. Het merendeel van de gedetecteerde runder-gerelateerde NVs behoorden tot de GGIII.2 Newbury NV genotype. De identificatie van de verschillende natuurlijk voorkomende recombinante GII.1/GIII.2 NV types laat het vermoeden rijzen dat de mogelijkheid tot recombinitie niet exclusief voorkomt bij humane norovirussen. Niettegenstaande er tot op heden geen bewijs bestaat dat vee besmet zou kunnen worden door humane norovirussen, draagt deze vondst toch bij tot de discussie met betrekking tot het zoönotisch potentieel van dierlijke NVs. Dit recombinitie proces zou kunnen leiden tot het overschrijden van de mens-dier grens van deze NVs, in het bijzonder in landen waar mens en vee in nauw contact staan met elkaar. Bovendien draagt de detectie van nauw aan humane genotypes verwante NVs en sapovirussen in varkens bij aan de vrees voor een potentiële zoönose. Uit experimenten is namelijk gebleken dat varkens geïnfecteerd kunnen worden door humane NVs, al konden deze resultaten niet bevestigd worden bij veldonderzoek. Recombinitie tussen NVs die voorkomen in mensen en varkens is tot op heden nog niet beschreven, maar werd evenmin uitgesloten.

Genotypering van NVs gedetecteerd in de verschillende matrices is belangrijk om de transmissieroutes van NVs op te helderen. In de (door het WIV onderzochte) faeces stalen afkomstig van NV-uitbraken gedurende 2007 bleek dat enkel NV GGII.4 varianten 2006a and 2006b voorkwamen. Deze resultaten zijn in overeenstemming met andere verslagen die, sinds hun emergentie in 2006, eveneens de globale circulatie beide types melden (de nomenclatuur kan verschillen van continent tot continent: beide types zijn respectievelijk gekend als "Laurens" en "Minerva" in de VSA, en als "v4" en "v6" in het VK). Beide varianten zouden in dezelfde mate co-circuleren, al lijkt er een hogere prevalentie van type GII.4 2006b in meeste Europese landen bij uitbraken gedurende 2007-2008. Door een gebrek aan positieve stalen gedurende deze studie konden wij deze trend niet bevestigen op Belgisch niveau. Deze trend werd niet waargenomen tijdens 2008: alhoewel aanwezigheid van NV GII.4 2006 varianten in NV-uitbraken vastgesteld werd, bleken ook andere NV genotypes en genogroepen aanwezig in faeces stalen afkomstig van NV-uitbraken en geïsoleerde NV-gerelateerde gastroënteritis gevallen. In 1 staal werden NVs uit 2 verschillende genogroepen (GII en GIV) gedetecteerd en dit staal zal verder geanalyseerd worden om eventuele (vermoedens van) recombinitie vast te stellen tussen beide genotypes. Analyse van één enkel gastroënteritis staal duidde op de aanwezigheid van sapovirus GI.2. Dit staal kon echter niet meegerekend worden in de risico-analyse voor België, gezien het afkomstig was uit de Franse grensstreek.

Sequenties die de genomische ORF1/ORF2 overlap en het volledige capsid-gen bevatten zijn absoluut noodzakelijk voor de karakterisering en bestudering van recombinante NVs. Door de zes geamplificeerde DNA fragmenten konden we vaststellen dat de sequenties van het polymerase-gen en de genomische capsid-regio afkomstig waren uit hetzelfde genoom en dat de stalen dus klaarblijkelijk niet co-geïnfecteerd waren door verschillende NV-types. Tot dusver konden we nog niet slagen in de amplificatie van een lang fragment afkomstig van de UCL5 en UCL6 stalen, al clusterden sequenties van deze stalen uit het polymerase-gen en de genomische capsid-regio niet in hetzelfde genotype.

Een fragment van ongeveer 1000 bp dat de genomische ORF1/ORF2 overlap bevat werd geamplificeerd en Simplot-analyse bevestigde wat al eerder werd vastgesteld dat het breekpunt ter hoogte zou liggen van de overlap. Een gebrek aan genetisch materiaal uit positieve voedsel en tweekleppige weekdier stalen (afkomstig van P3 en P5) zorgde voor de onmogelijkheid tot amplificatie voor sequentie-analyse. Dit probleem zal dan ook grondig aangepakt worden gedurende de volgende projectfase. Zelfs als voedselstalen gelinked waren was er niet genoeg RNA in de stalen. Inhibitie van moleculaire technieken is een belangrijke hinderpaal en de optimalisatie van virus-extractie methodes zal dan ook een cruciale stap zijn bij het ontwikkelen van een virus-detectie methode.

Sinds het begin van de rapportering van voedsel-gerelateerde uitbraken blijft de pathogeen verantwoordelijk voor de uitbraak onbekend in 20 tot 50% van de onderzochte voedseltoxi-infecties in België. NV is verdacht van een belangrijke oorzaak te zijn van voedseltoxi-infecties en zou verantwoordelijk kunnen zijn voor een groot deel van de uitbraken met een onbekende pathogeen. Er is echter momenteel nog steeds geen robuust NV extractie- en detectie systeem beschikbaar voor routine-analyse van verschillende voedselproducten, noch is er een internationaal aanvaarde NV isolatie- en detectiemethode in verschillende voedselproducten. Bovendien is de staalname bij gastroënteritis uitbraken veelal een probleem: er worden geen faeces-stalen genomen van patiënten bij gastroënteritis of er zijn geen overschotten van de betrokken voedselproducten. Om deze redenen is het moeilijk om de oorzaak van de NV-infectie epidemiologisch te linken aan het gecontamineerde voedsel. De onderrapportering van NV-infecties wordt in de hand gewerkt door de relatieve mildheid van de aandoening: de duur is meestal beperkt tot 24h en complicaties zijn niet gekend. Om deze onderrapportering aan te pakken werd een verbeterd protocol opgesteld om het opsturen van faecaal materiaal door gezondheidsinspectie-geneesheren te vergemakkelijken. Door de hoge virale concentratie in faeces en de beschikbaarheid van verschillende virus/RNA-extractieprotocollen voor faeces is het namelijk gemakkelijker om dergelijke stalen te analyseren in vergelijking met voedselstalen. Recent werd echter een protocol beschreven door Leen Baert *et al.* (2006) voor de detectie van NVs in verschillende voedselproducten. Momenteel wachten wij op een geoptimaliseerd protocol in ontwikkeling door partner 4 om onze voedselstalen te testen met een methode met verhoogde gevoeligheid.

AANBEVELINGEN

Het Norisk netwerk was al geslaagd in het opzetten en toepassen van een diagnose procedure voor het opsporen van NV in voedsel matrijzen en menselijke stalen.

De diagnose procedure heeft de identificatie van verschillende uitbarstingen van gastro-enteritis mogelijk gemaakt.

Het toepassen van deze procedure heeft het mogelijk gemaakt vast te stellen dat NV de eerste oorzaak was van voedseltoxi-infecties in België in 2007.

Daarom zou de volksgezondheid deze diagnose in België serieus moeten nemen en zouden er instructies gegeven moeten worden aan de beroeps om het risico op voedsel besmettingen en intermens verspreiding te verminderen.

De aanbevelingen voortgekomen uit Norisk's wetenschappelijk werk worden verspreid bij de wetenschappelijke en medische gemeenschappen door het deelnemen van Norisk partners aan verschillende commissies en werkgroepen.

Alle partners zijn ook deelnemers aan de werkgroep van het Belgische *Conseil Supérieur de la Santé (CSS) – Hogegezondheidsraad (HGR)* om de transmissie door voedsel van virussen te bestuderen.

Partners 1 en 2 nemen ook allebei deel aan het European Network for Environmental and Food Virology (COST Action 929). Partners 3 en 5 zijn respectievelijk nationale referentie laboratoria van voedseltoxi-infecties en virale ziekten van tweekleppige weekdieren.