

**Etude génotypique de norovirus humains et
bovins contemporains et mise au point de méthodes
rapides de détection et de quantification**

**Genotypical study of contemporaneous human and
bovine noroviruses and development of fast
methods for detection and quantification**

Photo : Reconstruction en trois dimensions de la capsid d'un norovirus par cryo-microscopie électronique, à une résolution de 22 Å
Dr. Prasad, Laboratoire « W.M. Keck Center for Computational Biology » au Collège de Médecine de Baylor

Alexandra Scipioni

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Vétérinaires
Orientation Médecine Vétérinaire

Année académique 2008-2009

Je tiens tout d'abord à remercier mon promoteur, Mr le Professeur Etienne Thiry, pour m'avoir fait confiance, toujours, durant ces années ; Etienne, merci de m'avoir guidée, encouragée, conseillée, fait beaucoup voyager pendant ces années tout en me laissant une grande liberté. Mes remerciements vont également à Mr le Professeur Georges Daube, le co-promoteur de cette thèse, pour la gentillesse et la patience qu'il a manifestées à mon égard durant cette thèse et pour les encouragements et conseils qu'il m'a donnés. Grâce au laboratoire national de référence, j'ai pu prendre conscience des enjeux que représente la sécurité de la chaîne alimentaire. Mon passage dans vos services restera un excellent souvenir, très riche sur le plan humain, et m'a permis d'accéder au jour d'aujourd'hui à une carrière passionnante.

Je remercie le Dr Jan Vinjé pour m'avoir accueillie trois mois au sein du service « GASTRO » de l'Université de Caroline du Nord, à l'époque où il dirigeait ce service (avant de rejoindre les Centers for Disease Control and Prevention à Atlanta), et pour ses conseils précieux et stimulants. Ces trois mois furent très enrichissants. Je remercie aussi Jen, ma colocataire lors de ce séjour, doctorante à l'époque dans le service du Dr Vinjé, qui a su rendre ce séjour aussi intéressant du point de vue scientifique qu'au niveau humain. Jen, you are a real friend and I thank you so much for your kindness. Jan, I thank you very much for your welcome and the knowledge and team spirit you passed on to me.

Je tiens aussi à mentionner le plaisir que j'ai eu à travailler comme responsable du laboratoire national de référence pour le contrôle virologique et bactériologique des mollusques bivalves vivants, avec Yasmine et tous les membres de Quality Partner. Merci à vous tous qui m'avez initiée aux méthodes microbiologiques dans une ambiance chaleureuse.

Je remercie très sincèrement tous ceux sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est : aussi bien par les discussions que j'ai eu la chance d'avoir avec eux, leurs conseils ou contributions par la fourniture entre autres d'échantillons : les Docteurs Eric Dubois, Kathleen Enshilwood, Ingeborg Boxman, Marion Koopmans, Soizick Le Guyader, David Lees, Christophe Gantzer, Katelijne Dierick et Nadine Botteldoorn de l'ISP, le Professeur Patrick Goubau et Valérie Verbelen du laboratoire de virologie de l'UCL, Christian Kinet, Guy Czaplicki et Marc Lomba de l'ARSIA, le Professeur Patrick De Mol et Geneviève Christiaens du service de microbiologie médicale du CHU.

Après neuf années passées au B43bis, j'ai pu rencontrer, côtoyer et connaître plus ou moins bien un grand nombre de personnes qui sont devenues pour certaines d'entre elles de véritables amis : Axel, notre sous-marinier russe, Ange et ses bons gâteaux (en particulier son tiramisu), Julien le « meilleur », Fabiana et son bel accent italien, Benoît jamais fatigué, toujours à l'affût, Elisabeth pour son rire inoubliable, Julie P. l'espagnole dans l'âme, Julie V. la douceur même, Sacha le guide de mes premiers pas dans le labo, Maya, patiente et toujours de bon conseil, François et sa mémoire d'éléphant, Dom partenaire des premières heures... et des dernières, Zazou petite mais costaud, Lorène en binôme pour les TP, Lucie la main sur le coeur, Christina et Jessica notre duo de choc, et encore Pol-Alexandre, Laurence, Philippe, Véronique, Marie-Lys, Frédéric, la « petite » Sophie, Jean-Pierre G., Mylène, Sophie W, Bubu,... Je vous remercie tous, vous qui, au cours de cette tranche de ma vie, m'avez aidée de près ou de loin. Vous avez été nombreux... et ne m'en veuillez pas si je ne vous cite pas ici, je ne vous ai pas oubliés, vous êtes dans mon cœur.

Je remercie toute l'équipe du service d'immunologie-vaccinologie, car notre vie harmonieuse de laboratoire en communauté doit sa réussite à vous tous. Mes remerciements vont aussi aux membres du jeune service d'épidémiologie dont j'ai connu la naissance, particulièrement au Professeur Claude Saegerman pour son aide précieuse dans les deux articles de méthodologie et à Béné, qui m'a succédé pour les TP d'épidémiologie.

J'ai aussi eu le plaisir d'encadrer les travaux de fin d'étude de Pascaline et Geoffrey, et les stages d'apprentissage technique de Loïc et Karolina. Vous m'avez tous apporté beaucoup, chacun à votre manière, par votre motivation et votre personnalité.

Je remercie l'Université de Liège pour les mandats d'assistante que l'institution m'a octroyés. Ce travail a été possible grâce à plusieurs financements dont le Service Public Fédéral, la Région Wallonne, Le Fonds National pour la Recherche Scientifique, l'Université de Liège et l'Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire.

Du plus profond de mon cœur, j'adresse un immense merci à toute ma famille qui a toujours été présente lorsque j'en ai eu besoin. Particulièrement Papa, Maman, Juju, Bonne-maman et Michel : c'est grâce à vous si j'en suis arrivée là. Papa, j'aurais tant voulu que tu puisses vivre ces moments ! Tu nous as quittés trop vite mon papoune, mais de là haut tu peux être fier de toi : ton amour, ta volonté, ton courage et l'espoir que tu avais en l'avenir m'ont donné la force et l'envie de continuer. Tu me manques tant...

Fred, toi qui a conquis mon cœur, merci. Merci de m'avoir soutenue, encouragée et aidée à tenir bon, à avancer. Et merci pour ton aide précieuse dans la mise en page de ce travail (et plus encore). Sans ta compréhension et ton amour, je n'y serais pas arrivée. Avec toi, je crois en l'avenir. Tu es mon soleil. Je t'aime chéri.

Pour terminer, je tiens à remercier la firme Merial qui a sponsorisé l'impression de cette thèse.

Table des matières

Table des matières	iii
Liste des abréviations	v
Chapitre 1: Introduction - Les norovirus.....	1
1. Historique	3
2. Classification	5
3. Caractéristiques virales et organisation génomique	6
4. Cycle de multiplication	9
5. Recombinaison	10
6. Pathogénie, signes cliniques et lésions	12
6.1 Infections à norovirus chez l'homme	13
6.2 Infections à norovirus chez les animaux	14
7. Immunité et sensibilité aux norovirus	15
8. Epidémiologie	16
9. Diagnostic	18
9.1 Microscopie électronique	18
9.2 ELISA	19
9.3 RT-PCR	19
10. Risque zoonotique	20
Chapitre 2: Objectifs.....	22
1. Objectifs généraux	23
2. Objectifs spécifiques	23
Chapitre 3: Section expérimentale.....	25
1. Mise au point de méthodes de détection	26
1.1 Préambule	26
1.2 Publication : "A SYBR Green RT-PCR assay in single tube to detect human and bovine noroviruses and control for inhibition"	27
1.3 Publication: "Detection and quantification of human and bovine noroviruses by a TaqMan RT-PCR assay with a control for inhibition"	36

2. Norovirus bovins et humains en Belgique	45
2.1 <i>Préambule</i>	45
2.2 <i>Publication : “Detection of contemporaneous human and bovine noroviruses in Belgium”</i>	46
Chapitre 4: Discussion.....	57
1. Mise au point de méthodes de détection	58
2. Norovirus bovins et humains en Belgique	62
3. Risque zoonotique	64
Chapitre 5: Conclusions et perspectives.....	66
Chapitre 6: Résumé - Summary	69
Chapitre 7: Bibliographie	76

Liste des abréviations

Ac :	anticorps
AMP :	adénosine monophosphate
ARN :	acide ribonucléique
BSA :	albumine de sérum bovin
ELISA :	enzyme-linked immunosorbant assay
G :	génogroupe
IA :	immunoassay
ICTV :	International Committee on Taxonomy of Viruses
Ig :	immunoglobuline
IME :	immuno-microscopie électronique
kb :	kilobase
kDa :	kilodalton
ME :	microscopie électronique
NB :	Nébraska
NLV :	Norwalk-like-virus
NoV :	norovirus
nt :	nucléotide
NTPase :	nucléoside triphosphatase
ORF :	cadre de lecture ouvert ou open reading frame
P :	protruding
RAG2 :	recombination-activating gene 2
RdRp :	ARN polymérase ARN-dépendante
RT-PCR :	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
S :	shell
SaV :	Sapovirus
SLV :	Sapporo-like-virus
SRSV :	small round structured virus
STAT1 :	signal transducer and activator of transcription 1
VLP :	particule “virus-like”
VP :	protéine virale
VPg :	protéine liée au génome viral

1.

Introduction – Les norovirus

Animal noroviruses

The Veterinary Journal (2008) **178**; 32-45

Alexandra Scipioni, Axel Mauroy, Jan Vinjé and Etienne Thiry

L'introduction correspond à cet article de revue, complété et mis à jour.

1. Historique

Les norovirus (NoV) (Figure 1) appartiennent à la famille des *Caliciviridae*. Les calicivirus sont des petits virus non-enveloppés d'approximativement 27-35 nm de diamètre qui possèdent un génome constitué d'ARN monocaténaire de polarité positive de 7,5 kb environ (Green et al., 2001). Ils ont un large spectre d'hôte et provoquent dans leurs espèces hôtes respectives divers troubles incluant des infections du système digestif (homme, bovin, porc, chien et vison), des lésions vésiculaires et des troubles de la reproduction (porc, otarie et d'autres espèces de mammifères marins), des stomatites, des problèmes respiratoires et systémiques (chat), et une maladie hémorragique (lapin) (Bridger, 1990; Ohlinger et al., 1993; Smith et al., 1998b; Green et al., 2000; Green et al., 2001; Guo et al., 2001). De plus, ils ont été identifiés dans l'espèce bovine comme associés à des signes respiratoires (Smith et al., 1983).

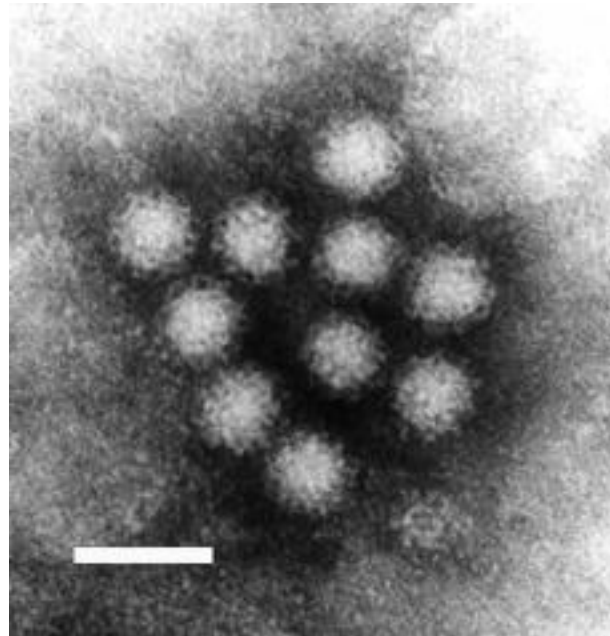


Figure 1 : Photographie en microscopie électronique de norovirus humains. Echelle : 50 nanomètres (F.P. Williams, U.S. Environmental Protection Agency).

Le premier NoV fut découvert dans la ville de Norwalk, dans l'état d'Ohio, USA, en 1968, associé à une épidémie de gastroentérite chez l'homme (Adler et al., 1969). Le virus a été visualisé par microscopie électronique (ME) pour la première fois en 1972 dans des échantillons de matières fécales provenant de volontaires infectés *per os* par des filtrats de matières fécales provenant d'enfants infectés naturellement lors de l'épidémie de 1968 (Kapikian, 2000). Ce NoV est devenu la souche prototype du genre *Norovirus* et fut baptisé « Norwalk », du nom de la ville où il avait été détecté. A la même époque, la famille des *Caliciviridae* fut créée (Matthews, 1979). La découverte du virus de

Norwalk (Kapikian et al., 1972) et des rotavirus (Adams et al., 1963; Bishop et al., 1973; Bridger et al., 1975) comme pathogènes entériques a stimulé la recherche dans ce domaine et finalement permis la découverte de nombreux autres virus entériques dénommés « SRSV » pour Small Round Structured Viruses (littéralement « petits virus de structure ronde »), de par leur aspect général en ME (Appleton et al., 1975; Madeley et al., 1976; Chiba et al., 2000).

Au début des années '90, le séquençage du génome complet du virus de Norwalk a contribué grandement à l'avènement d'une nouvelle ère dans l'étude de ces virus (Xi et al., 1990; Jiang et al., 1993). Ils partagent certaines caractéristiques comme le fait d'être excrétés dans les matières fécales de patients atteints de gastroentérite, de posséder un génome constitué d'ARN monocaténaire de polarité positive ainsi qu'une densité de flottaison de 1,33-1,41 g/cm³ en chlorure de césium (Kapikian et al., 1996). Avec le développement des méthodes moléculaires dans les années '90, les SRSV ont été divisés en NLV pour Norwalk-like-viruses, maintenant connus sous le nom de NoV, les SLV pour Saporo-like-viruses, maintenant appelés Sapovirus (SaV), et les astrovirus.

Grâce à la ME, plusieurs autres virus possédant une morphologie similaire furent découverts dans des matières fécales d'animaux domestiques dont des veaux (Woode et al., 1978) et des porcs (Bridger, 1980; Saif et al., 1980). La souche SW918, prototype de la souche de NoV porcin, a été détectée la première fois dans le contenu caecal de porcs en bonne santé en 1997 au Japon (Sugieda et al., 1998). D'autres NoV porcins ont été détectés dans d'autres continents (van der Poel et al., 2000; Wang et al., 2005). Pour les NoV bovins, les prototypes identifiés jusqu'ici sont le virus Newbury2 et le virus Jena. Le virus Newbury2 a été détecté en 1978 dans des matières fécales diarrhéiques de veaux (Woode et al., 1978), et sa séquence génomique complète a été publiée en 2007 (Oliver et al., 2007a). Le virus de Jena, quant à lui, a été détecté dans les années '80 en Allemagne dans des matières fécales bovines. Sa caractérisation moléculaire date de 1999 (Granzow et al., 1985; Gunther et al., 1987; Liu et al., 1999).

Deux autres calicivirus entériques bovins ont été décrits. Il s'agit du virus Newbury1 et du virus Nebraska (NB). Le virus Newbury1 fut découvert simultanément au virus Newbury2, dans les mêmes échantillons, et a été caractérisé en 1984 (Bridger et al., 1984). Le virus NB, quant à lui, a été détecté aux USA (Smiley et al., 2002). D'après Oliver et collaborateurs (2006a), ces deux virus forment un groupe phylogénétique distinct au sein de la famille des *Caliciviridae* et possèdent 98% d'identité en acides aminés pour la séquence complète de la protéine de capsid.

Récemment, des NoV ont été isolés chez des souris de laboratoire aussi bien immunodéficientes qu'immunocompétentes (Karst et al., 2003; Hsu et al., 2006). Un NoV a également été détecté chez un lionceau en Italie (Martella et al., 2007). Les derniers NoV découverts ont été détectés dans les espèces canine et ovine (Martella et al., 2008; Wolf et al., 2009).

2. Classification

La première classification des calicivirus était basée sur leur morphologie. Le Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV) a proposé une nouvelle classification et une nomenclature des calicivirus en 1998, qui ont été adaptées par la suite. La famille *Caliciviridae* a été divisée en 4 genres (Green et al., 2000; Mayo, 2002) : *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Norovirus* et *Sapovirus*. Plus récemment, un cinquième genre, provisoirement nommé *Nabovirus* ou *Becovirus*, a été proposé pour classer les virus Newbury1 et NB, car ils diffèrent des autres genres de la famille des *Caliciviridae* (Figure 2).

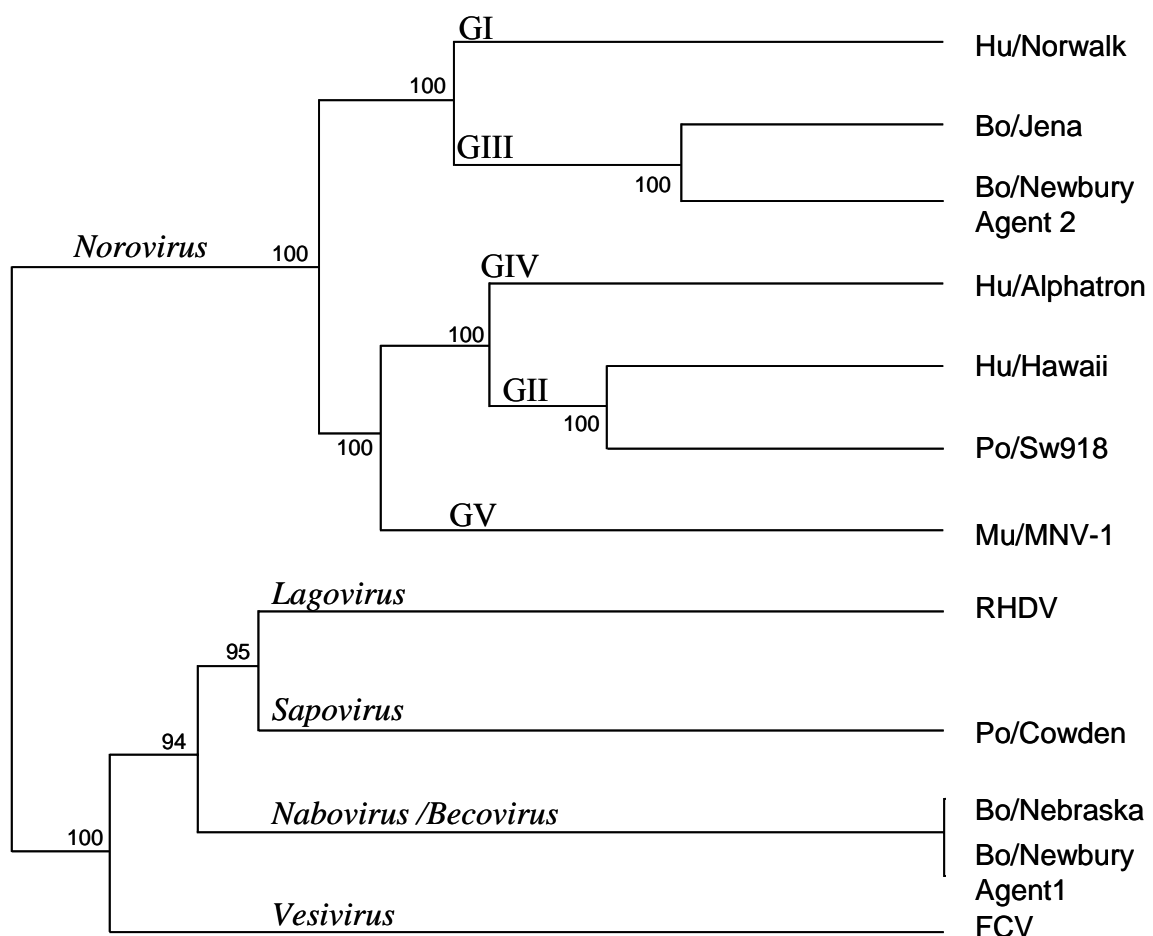


Figure 2 : Analyse phylogénétique des membres de la famille des *Caliciviridae*. L'alignement multiple a été réalisé avec le programme ClustalW sur la séquence partielle de la protéine de capsid du norovirus (NoV) Alphatron (bases 1-1668) et celles de différents NoV représentatifs des genres appartenant à la famille des *Caliciviridae*. Les nombres situés près des branches indiquent les valeurs de bootstrap. Les numéros d'accès dans GenBank sont M87661 pour le NoV humain Norwalk, U07611 pour le NoV humain Hawaï, AB074893 pour le norovirus porcin SW918, AJ011099 pour le NoV bovin Jena, AF097917 pour le NoV bovin Newbury2, AF195847 pour le NoV humain Alphatron, AY228235 pour le NoV murin, DQ013304 pour le virus bovin Newbury1, NC_004064 pour le virus bovin Nebraska, M67473 pour le virus lagovirus de la maladie hémorragique du lapin, L40021 pour le calicivirus félin et AF182760 pour le sapovirus porcin Cowden.

Le séquençage complet de la protéine de capsidie a permis la classification des NoV en cinq génogroupes (G). Les NoV humains se retrouvent dans les GI, II et IV (Green et al., 2000; Vinje et al., 2000; Fankhauser et al., 2002), les NoV bovins dans le GIII (Ando et al., 2000; Oliver et al., 2003; van der Poel et al., 2003), les NoV murins dans le GV (Karst et al., 2003; Hsu et al., 2007), les NoV porcins dans le GII (Sugieda et al., 2002), les NoV félins et canins dans le GIV (Martella et al., 2007; Martella et al., 2008) et les NoV ovins dans le GIII (Wolf et al., 2009).

Il n'y a pas de règle officiellement établie pour une sous-classification au sein d'un même génogroupe. Cependant, une méthode standardisée de classification en génotypes a été proposée par Zheng et collaborateurs (2006). Ils ont apporté des critères clairs pour la nomenclature des NoV sous le niveau génogroupe, basés sur la séquence complète en acides aminés de la protéine majeure de capsidie. La distance à l'intérieur d'un génotype est de 0 à 14%, entre génotypes de 14,3 à 43,8% et entre génogroupes de 44,9 à 61,4%. Ils suggèrent la subdivision des 5 génogroupes en 29 génotypes (clusters génétiques) : huit dans le GI (GI.1 à GI.8), 17 dans le GII (GII.1 à GII.17) - augmentés à 19 par Wang et collaborateurs (2007) en suivant la même procédure -, deux dans le GIII (GIII.1 et GIII.2), un dans le GIV et un dans le GV. Vu les possibilités de recombinaison (Kageyama et al., 2004) pouvant affecter la classification correcte des NoV, il n'est pas recommandé d'utiliser des séquences partielles pour les classer mais de considérer la séquence complète de la protéine majeure de capsidie (Zheng et al., 2006).

En se basant sur des analyses phylogénétiques, les NoV porcins ont été classés dans trois génotypes différents du GII : le GII.11, qui est le plus proche des NoV humains, le GII.18 et le GII.19 (Wang et al., 2005; Wang et al., 2007). Le GII est le génogroupe le plus répandu chez l'homme.

L'étude moléculaire des NoV bovins a clarifié leur relation avec les NoV humains, montrant qu'ils forment un génogroupe distinct dans le genre *Norovirus*. Les virus Jena et Newbury2 sont les prototypes des génotypes GIII.1 et GIII.2, respectivement (Figure 2).

3. Caractéristiques virales et organisation génomique

Les NoV humains et animaux sont non-enveloppés, sphériques, possèdent une apparence peu distincte et sont dits « duveteux » en ME. La capsidie est composée de 180 sous-unités d'une seule protéine qui s'associent en dimères et son architecture est basée sur une symétrie icosaédrique de T=3. Sa surface montre 32 dépressions en forme de calice avec des protrusions en forme d'arches (Prasad et al., 1999) (Figure 3). Ces propriétés sont conservées parmi les membres de la famille des *Caliciviridae*, mais certaines variations de structure ont été observées et leurs implications fonctionnelles étudiées (Chen et al., 2004).

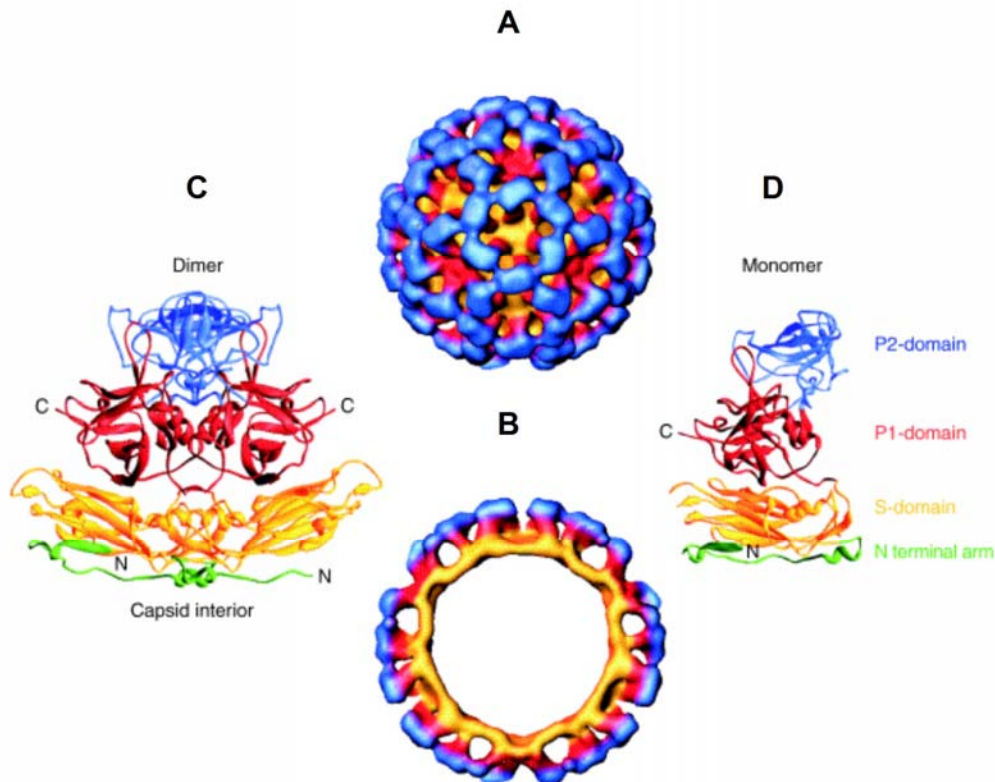


Figure 3 : Structure de la capside de particules « virus-like » par cryo-microscopie électronique à 22Å et par cristallographie aux rayons X. (A) Représentation de la surface ; (B) Section transversale ; (C) Dimère de la protéine de capside. Nonante dimères forment la capside ; (D) Monomère de la protéine de capside, organisé en domaines et sous-domaines. La partie N-terminale (vert) fait face à l'intérieur de la capside, un domaine S forme la structure interne continue de la capside (jaune) et le domaine P forme la partie externe (arches et cupules) de la capside. Il est divisé en deux sous-domaines P1 (rouge) et P2 (bleu). Ce dernier intervient dans les interactions virus-hôte. Figure adaptée avec permission de Huston et collaborateurs (2004).

Le génome des NoV est constitué d'un ARN monocaténaire de polarité positive d'environ 7,5 kb et contient trois cadres de lecture ouverts (ORF, open reading frame) (Tableau 1). A l'extrémité 5', l'existence d'une protéine liée au génome viral appelée VPg est suspectée (Daughenbaugh et al., 2003). En effet, les NoV ne possèdent pas de site d'entrée ribosomale ni de coiffe caractéristique des ARN messagers eucaryotes, mais l'extrémité N-terminale de leur génome pourrait être liée à une protéine VPg, comme décrit pour les autres calicivirus animaux (Burroughs et al., 1978; Schaffer et al., 1980; Herbert et al., 1997; Dunham et al., 1998). *In vitro*, cette protéine VPg interagit avec des composants de la machinerie de traduction par des interactions protéine-protéine et pourrait jouer un rôle dans l'initiation de la traduction de l'ARN des NoV (Daughenbaugh et al., 2003). Il n'y a pas de preuve expérimentale de la liaison de cette protéine potentielle VPg à l'ARN génomique viral, excepté pour le NoV murin (Daughenbaugh et al., 2006) (Figure 4).

Tableau 1 : Organisation génomique complète de norovirus animaux et humains de référence

Souche	Génogroupe	Numéro d'accès Genbank	Longueur du génom (nt)	Position nucléotidique		
				ORF1	ORF2	ORF3
Hu/Norwalk	I	M87661	7654	5 - 5374	5358 - 6950	6950 - 7588
Hu/Hawaii	II	U07611	7513	5 - 5104	5085 - 6692	6692 - 7471
Bo/Jena	III	AJ011099	7338	22 - 5064	5051 - 6610	6600 - 7271
Bo/Newbury2	III	AF097917	7311	22 - 5076	5063 - 6631	6423 - 7271
Mu/MNV1	V	NC_08311	7382	6 - 5069	5056 - 6681	6681 - 7307

nt : nucléotide ; ORF : open reading frame ou cadre de lecture ouvert

**Figure 4 : Organisation génomique des norovirus.**

VPg : protéine présumée attachée au génome viral ; p48 : protéine 48 ; NTPase : nucléoside triphosphatase ; 3CLPro : 3C-like protéase ; RdRp : ARN polymérase ARN-dépendante ; VP1 : protéine structurale majeure (protéine de capsid) ; VP2 : protéine de structure mineure ; ORF : open reading frame ou cadre de lecture ouvert.

A l'extrémité 5' du génome, l'ORF1 code pour une polyprotéine d'environ 195 kDa qui est clivée par une protéase « 3C-like » virale en au moins six protéines non-structurales : la protéine p48, qui jouerait un rôle dans le trafic intracellulaire (Ettayebi et al., 2003) ; une nucléoside triphosphatase (NTPase) ; la protéine p22, qui serait impliquée dans le trafic des membranes cellulaires et les complexes de réplication ; VPg ; une protéinase et l'ARN polymérase ARN-dépendante (Belliot et al., 2003; Hardy, 2005). L'ORF2 code pour la protéine majeure de capsid (VP1) d'environ 60 kDa qui possède les fonctions suivantes : auto-assemblage et formation de la capsid virale, reconnaissance du récepteur cellulaire, spécificité d'hôte, diversité des NoV et immunogénicité (Chen et al., 2004). Une région génomique hautement conservée parmi les NoV de génogroupes I et II, incluant une région consensus de 18 nucléotides, s'étend de la région C-terminale codant pour la polymérase jusqu'à la

partie N-terminale de la région codant pour la protéine de capsid. Cette séquence pourrait être un signal d'emballage pour le génome des NoV ou un site d'initiation de la transcription (Lambden et al., 1995) et pourrait également correspondre à un point privilégié de recombinaison (Katayama et al., 2002; Bull et al., 2005).

La protéine VP1 est organisée en deux domaines : S pour « shell » en anglais (la base de la capsid) et P pour « protruding » en anglais (partie qui fait saillie à la surface de la capsid). Cette partie P présente des variations structurales entre les différents NoV, et est subdivisée en deux sous-domaines P1 et P2 (Chen et al., 2004) (Figure 3). P2 constitue le domaine hypervariable de la protéine de capsid des NoV et sa localisation externe sur la capsid est compatible avec sa fonction de ligand aux récepteurs cellulaires présents à la surface des cellules intestinales (Tan et al., 2004). L'ORF3, situé à l'extrémité 3' du génome des NoV, code pour une petite protéine structurale mineure, VP2, d'environ 20 kDa, et qui est impliquée dans l'expression et la stabilité de la protéine de capsid VP1 (Bertolotti-Ciarlet et al., 2003).

Une autre caractéristique du genre, actuellement démontrée pour les NoV humains et murins, est l'expression et l'accumulation d'ARN subgénomiques durant la réplication dans des cellules infectées et transfectées par de l'ADN complémentaire (Wobus et al., 2004; Asanaka et al., 2005). L'expression d'ARN subgénomiques est également utilisée par d'autres virus à ARN de polarité positive afin de réguler et de permettre la synthèse de suffisamment de protéines structurales (Miller et al., 2000).

4. Cycle de multiplication

La stratégie de réplication découverte pour les calicivirus partage beaucoup de caractéristiques avec les autres virus à ARN de polarité positive (Figure 5). Premièrement, le virion doit interagir avec la cellule hôte (certainement via un récepteur spécifique) et, après entrée dans la cellule, l'ARN génomique est libéré de la capsid et se retrouve dans le cytoplasme. Ces premières étapes sont peu comprises pour les calicivirus mais la reconnaissance du récepteur est essentielle. Les hydrates de carbone sont impliqués comme composant du récepteur. La traduction du génome serait médiée par la protéine VPg, liée au génome et interagissant avec la machinerie de traduction cellulaire. L'ORF1 est traduite en polyprotéine constituée des protéines non-structurales qui seront clivées par la protéase virale. L'initiation de la synthèse de l'ARN antisens (négatif) à partir de l'ARN génomique viral se produit. Le brin négatif sert alors à la transcription de deux types d'ARN viraux de polarité positive : l'ARN génomique complet et l'ARN subgénomique. Les ARN subgénomiques servent à la synthèse des protéines issues de l'ORF2 et 3, à savoir la protéine de capsid VP1 et la protéine structurale mineure VP2. Comme pour les autres virus à ARN de polarité positive, la réplication de l'ARN viral est associée aux membranes cellulaires. L'encapsidation, la maturation et la sortie des virus sont des étapes peu comprises (Green, 2007).

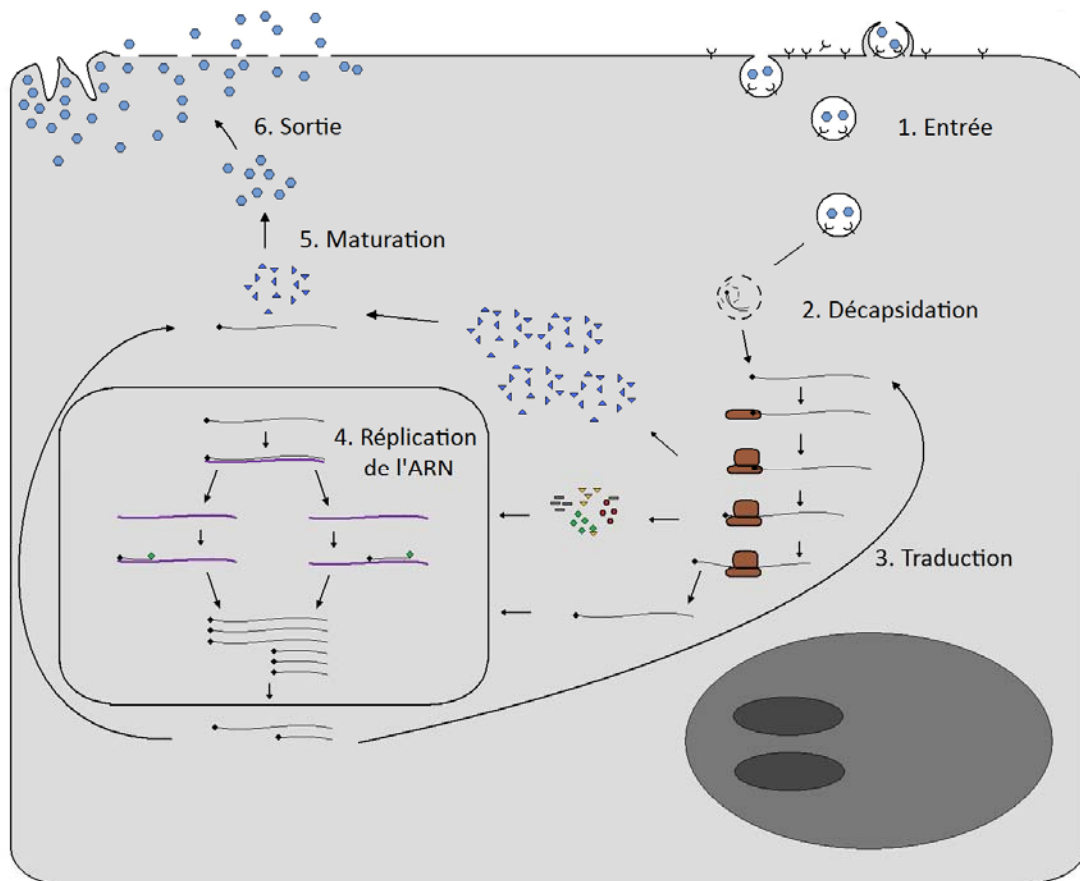


Figure 5 : Proposition d'une stratégie de répliation pour les norovirus. Comme pour les autres virus à ARN de polarité positive, le cycle de répliation implique les étapes suivantes : 1. Entrée ; 2. Décapsidation ; 3. Traduction de l'ARN ; 4. Réplication de l'ARN ; 5. Maturation ; 6. Sortie (d'après Green et al., 2007).

5. Recombinaison

La recombinaison est un mécanisme important pour l'évolution des virus à ARN car elle permet des modifications importantes du génome viral par l'échange de séquences, générant des variations génétiques et l'émergence de nouvelles souches virales (Worobey et al., 1999).

Un NoV recombinant peut être défini par le fait qu'il se rapproche de deux groupes distincts de NoV quand deux régions différentes de son génome (généralement celles codant pour la polymérase et la capsid) sont analysées phylogénétiquement.

La recombinaison peut affecter fortement la classification phylogénétique et la rendre confuse ; elle peut aussi avoir un impact sur la conception de vaccins.

Des recombinants intragénogroupes sont décrits, correspondant à la combinaison de NoV appartenant au même génogroupe au sein de la même espèce : bovine (Han et al., 2004; Oliver et al.,

2004), porcine (Wang et al., 2005) ou humaine (Jiang et al., 1999; Vinje et al., 2000; Katayama et al., 2002). Récemment, un recombinant intergénogroupes entre NoV humains de GI et de GII a été détecté (Nayak et al., 2008). L'analyse de ces recombinants suggère que les points de recombinaison se situent autour de la jonction entre l'ORF1 et l'ORF2, cette hypothèse n'étant pas prouvée à ce jour.

Un modèle de recombinaison a été proposé par Bull et collaborateurs (2005) (Figure 6). Il est basé sur deux mécanismes de recombinaison déjà décrits que sont le modèle du « switch de matrice » (Worobey et al., 1999) et celui de la synthèse d'ARN subgénomiques par le mécanisme « d'initiation interne » (Miller et al., 2000).

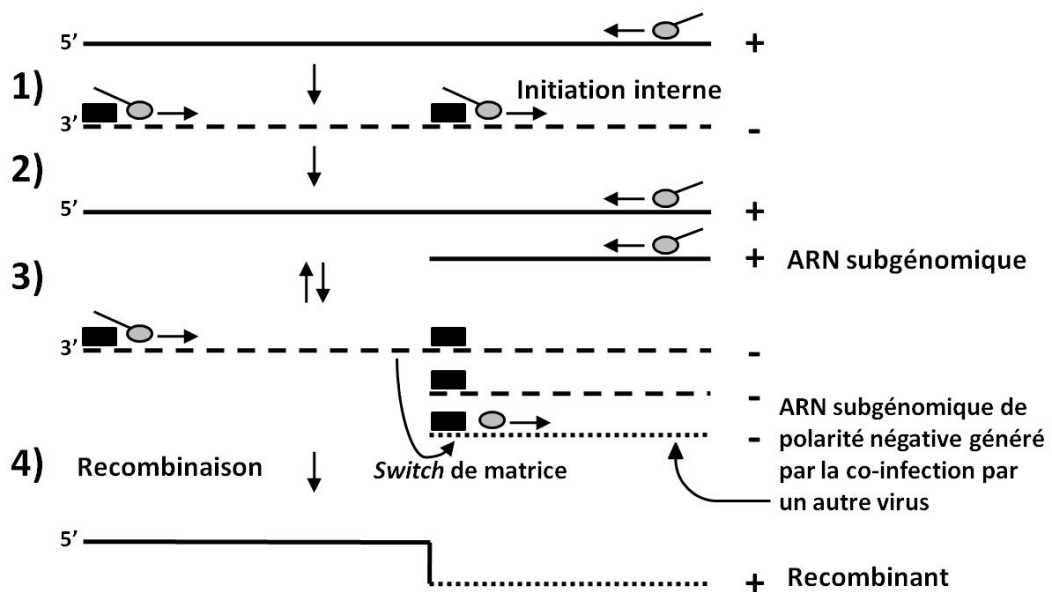


Figure 6 : Mécanisme simple proposé pour la recombinaison des norovirus (d'après Bull et al., 2005). 1) La transcription de l'ARN par l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) (cercle gris) génère un brin intermédiaire de polarité négative (tirets). 2) La liaison de la RdRp aux séquences promoteurs quasi identiques (carré noir) génère des brins d'ARN de polarité positive génomiques et subgénomiques. 3) Ils servent directement comme modèles pour la synthèse d'ARN à partir de leur extrémité 3' et cela conduit à la génération d'ARN génomique complet et subgénomique de polarité négative. 4) La recombinaison se produit quand l'enzyme qui initie la synthèse de l'ARN de polarité positive à partir de l'extrémité 3' de l'ARN génomique complet, est bloquée par le promoteur situé au début de l'ARN subgénomique et se déplace sur un ARN subgénomique présent généré par une co-infection par un autre norovirus. Le résultat est un virus recombinant qui a acquis des nouveaux ORF2 et 3.

Des points de recombinaison ont été décrits au sein des ORF2 et 3, mais leur analyse statistique ultérieure par Bull et collaborateurs (2007) les remet en question. Ces derniers ont démontré pour la première fois un double événement de recombinaison pour un NoV décrit par Waters et collaborateurs (2007) comme la première souche recombinante dont l'évènement de recombinaison se situe dans la polymérase.

6. Pathogénie, signes cliniques et lésions

La voie de transmission principale des NoV humains et animaux est la voie féco-orale (Hall et al., 1984; Graham et al., 1994; Green et al., 2001; Hsu et al., 2005) et principalement lors de contacts directs. Des transferts par des vecteurs tels que l'eau ou les aliments sont possibles (Figure 7). A la fois les données épidémiologiques et les observations expérimentales suggèrent qu'une autre voie d'infection pourrait se produire via les particules aérosolisées par les vomissures (Sawyer et al., 1988; Karst et al., 2003). Une faible dose infectieuse (Graham et al., 1994) et une très grande diversité de souches (Ando et al., 2000) augmentent le risque d'infection.

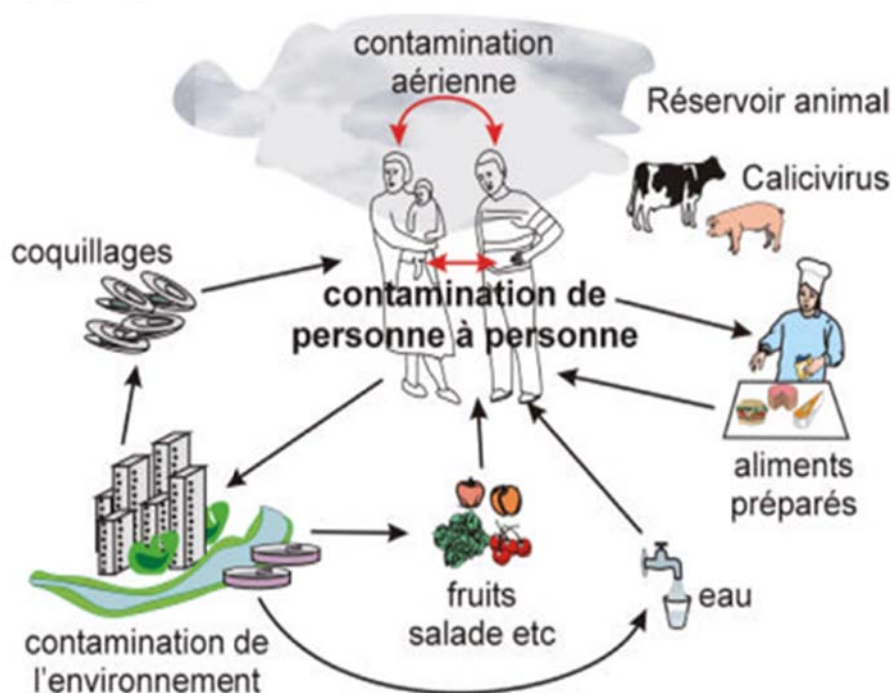


Figure 7 : Voies de transmission des calicivirus entériques humains (Pothier P., CHU Dijon)

Les calicivirus sont caractérisés par leur stabilité dans l'environnement (Rzesutka et al., 2004) et leur relative résistance à l'inactivation (Duizer et al., 2004a). En l'absence d'un système de culture cellulaire, la stabilité et la résistance des NoV ont été étudiées par corrélation avec les modèles que sont le calicivirus félin ou les particules NoV-like obtenues à partir de la synthèse de la protéine de capsidie en système baculovirus le plus souvent. Ces protéines ont la capacité de s'auto-assembler et de former une capsidie vide, ressemblant au virus d'origine, appelée VLP pour « virus-like particle ». Découvert récemment, le NoV murin offre de nombreuses possibilités comme modèle pour les NoV

humains, étant l'unique membre du genre *Norovirus* qui se multiplie aisément en culture de cellules (Cannon et al., 2006).

6.1 Infections à norovirus chez l'homme

Les NoV sont la cause majeure d'épidémies de gastroentérites non-bactériennes chez l'homme (Green, 2007). Aux Etats-Unis, il est estimé que les NoV provoquent 23 millions de malades et sont responsables d'environ 50 % des cas de toxi-infections d'origine alimentaire pour lesquelles l'agent étiologique est connu (Mead et al., 1999; Widdowson et al., 2005b). Aux Pays-Bas, il a été montré qu'environ 80% des épidémies de gastroentérites rapportées aux services de santé publique étaient dus à des NoV (Koopmans et al., 2004). En Belgique, les NoV humains sont la première cause de toxi-infections alimentaires collectives et devancent les salmonelles (Baert et al., 2009).

La pathologie provoquée par les NoV peut survenir chez les enfants et les adultes. Les symptômes cliniques incluent vomissements, diarrhée (jamais de diarrhée contenant du sang n'a été décrite), fièvre, crampes abdominales, nausée, myalgie, maux de tête (Green, 2007). Les infections à NoV sont considérées comme auto-limitantes, avec une durée de 24 à 48 heures (Rockx et al., 2002). La période d'incubation est courte et dure de 24 à 48 heures après exposition (Kageyama et al., 2004).

Les personnes présentant ces symptômes ne consultent généralement pas le médecin, sauf s'ils sont plus sévères, ou pour les enfants, les personnes âgées, immunodéprimées ou les patients ayant une pathologie sous-jacente et pour lesquels de la fluidothérapie ou d'autres traitements de soutien sont nécessaires (Lopman et al., 2003; Goller et al., 2004; Widdowson et al., 2005b; Mattner et al., 2006; Okada et al., 2006). Certains rapports de cas de NoV humains relatent des pathologies plus sévères, avec des symptômes ressemblant à de la coagulation intravasculaire disséminée ou une encéphalite (Brown et al., 2002; Ito et al., 2006).

Au niveau microscopique, les biopsies de l'intestin grêle prélevées lors d'infections expérimentales de volontaires humains avec la souche prototype Norwalk (GI), ou le virus Hawaii (GII), ont montré une muqueuse intacte avec élargissement des villosités et raccourcissement des microvillosités (Schreiber et al., 1974). Ces lésions disparaissent en deux semaines (Agus et al., 1973).

Les épidémies à NoV sont généralement présentes dans des communautés où les contacts entre personnes sont importants, comme dans les écoles, les camps de vacances, les restaurants, les maisons de repos, les hôpitaux ou les bateaux de croisière, les NoV possédant un taux d'attaque secondaire élevé (Caul, 1996).

Une fréquence supérieure d'épidémies pendant les mois d'hiver est à l'origine de l'appellation « maladie des vomissements d'hiver », mais des cas d'infections à NoV au printemps ont été décrits (Lindell et al., 2005). De nombreuses denrées alimentaires ont été associées aux infections à NoV, par exemple les fruits, salades, les pâtisseries, les coquillages (huîtres et moules) (Le Guyader et al., 2004; Widdowson et al., 2005b). Ces derniers présentent la particularité d'accumuler les virus dans leur

système digestif vu leur mode d'alimentation par filtration. Cela se produit lorsque les mollusques sont élevés dans des zones où l'eau est contaminée (par exemple suite à des modifications des courants lorsqu'une station d'épuration est proche). Un point particulier concerne les huîtres pour lesquelles la présence de récepteurs dans leur tissus, similaires à ceux capables de fixer les NoV chez l'homme, a été démontrée (Le Guyader et al., 2006). La cuisson de coquillages contaminés s'est montrée peu efficace pour éliminer la contamination par les NoV (McDonnell et al., 1997).

Les virus sont excrétés dans les matières fécales, déjà pendant la période d'incubation, et se retrouvent également dans le vomi. L'excrétion des NoV dans les matières fécales peut durer jusqu'à trois semaines après la disparition des symptômes (Rockx et al., 2002), et a été détectée encore plus longtemps (plus de 40 jours) chez de jeunes enfants (< 6 mois) (Murata et al., 2007). Les individus immunodéprimés peuvent avoir une diarrhée persistante et excréter le virus pendant des années (Green, 2007).

6.2 Infections à norovirus chez les animaux

Pour le NoV bovin Newbury2, les principaux signes cliniques rapportés chez des veaux gnotobiotés infectés expérimentalement sont une entérite non-hémorragique, une diarrhée légère, de l'anorexie transitoire et de la malabsorption. La diarrhée est plus sévère chez les veaux de trois mois que chez les nouveaux nés. Ce virus semble être moins virulent que le calicivirus Newbury1 (Woode et al., 1978; Bridger et al., 1984; Hall et al., 1984). Habituellement, l'excrétion virale apparaît peu de temps avant ou durant la manifestation des premiers signes cliniques. Par ME, l'excrétion virale a été notée sur une courte période de temps (Bridger et al., 1984). Une plus longue période d'excrétion a été constatée en utilisant la RT-PCR, technique plus sensible pour la détection des NoV (Rabenau et al., 2003; Han et al., 2005). Les lésions histopathologiques constatées chez les veaux infectés avec le virus Newbury2 et le virus Jena consistent en une atrophie des villosités, une hyperplasie des cryptes et un œdème de la sous-muqueuse du petit intestin proximal (Woode et al., 1978; Bridger et al., 1984; Gunther et al., 1987).

Les NoV porcins ont été exclusivement détectés dans des échantillons fécaux de porcs adultes ne présentant pas de signe clinique (Wang et al., 2005), mais aucune étude *in vivo* n'a été réalisée jusqu'à ce jour. L'impact réel des NoV porcins dans la problématique des diarrhées chez le porc reste à élucider.

L'infection par le NoV murin est asymptomatique chez les souris d'élevage consanguines ou non ; en revanche, les souris déficientes pour les gènes RAG2 (gène activateur de recombinaison 2) et STAT1 (transmetteur et activation de la transcription 1) succomberont à l'infection par ce virus. Les souris montrent des signes cliniques d'encéphalite, d'angéite dans les vaisseaux cérébraux, de pneumonie et d'hépatite (Karst et al., 2003). L'ARN du NoV murin 1 a été détecté dans la rate, les nœuds lymphatiques mésentériques et le jéjunum de souris infectées expérimentalement, cinq

semaines post-inoculation (Hsu et al., 2005). Plus récemment, des lignées de souris immunodéficientes de différents génotypes ont été infectées avec le NoV murin 1 démontrant une infection généralisée et des signes d'inflammation dans différents tissus (poumons, foie, cavités péritonéale et pleurale) (Ward et al., 2006).

Chez les souris immunocompétentes, les modifications histopathologiques sont les seuls signes de l'infection par le NoV murin 1 (Mumphrey et al., 2007). De ce fait, il est admis que la maladie n'apparaît que chez les souris déficientes pour certains composants de l'immunité innée (Karst et al., 2003). Cependant, les NoV murins 2, 3 et 4 ont été isolés récemment dans différentes colonies de souris de laboratoire en Amérique du Nord (Hsu et al., 2006). Ces souches montrent un profil de pathogénicité différent du NoV murin 1 chez des souris immunocompétentes infectées expérimentalement. Alors qu'une infection transitoire est observée avec le NoV murin 1, les trois nouvelles souches montrent une excrétion fécale plus longue (huit semaines comparé à une semaine) et des signes d'infection chronique. Cette persistance pourrait être associée avec la réplication continue du virus, processus couramment observé avec l'infection chronique par le calicivirus félin (Wardley et al., 1977). Le même processus pourrait être suggéré pour les NoV humains et animaux, avec comme conséquence que les porteurs asymptomatiques pourraient contribuer à la dissémination du virus et l'apparition d'épidémie.

Peu de NoV animaux provoquent des signes cliniques importants. En fait, de tels signes cliniques ont seulement été constatés chez les animaux immunodéprimés. Les NoV porcins ont été détectés chez des animaux asymptomatiques. Chez les bovins, les NoV peuvent être considérés comme des pathogènes bénins qui pourraient faciliter ou compliquer une gastroentérite due à un autre agent, particulièrement chez les nouveau-nés. Seuls les NoV murins causent des modifications histopathologiques sévères chez leurs hôtes.

7. Immunité et sensibilité aux norovirus

L'étude de l'immunité provoquée par l'infection à NoV peut être divisée en 2 périodes : l'époque ancienne avec la dominance des études faites lors d'épidémies naturelles ou par infections expérimentales de volontaires humains, et l'époque moderne coïncidant avec la possibilité de produire des pseudoparticules (VLP), et par conséquent des antisérums hyperimmuns (Matsui et al., 2000). Il faut garder à l'esprit que l'étude de la réponse immunitaire suite à une infection à NoV est difficile vu l'impossibilité de multiplier les NoV humains en culture de cellule classique.

De l'époque ancienne, 3 principaux constats ressortent : une immunité à court terme semble être conférée dans les 6 à 14 semaines suivant l'exposition initiale au virus de Norwalk ; les relations immunologiques sont complexes entre les différentes souches ; une immunité à long terme ne semble pas être conférée après une seule exposition à la souche prototype, virus de Norwalk. Ce dernier point est confirmé par plusieurs études démontrant que le taux d'anticorps (Ac) dans le sérum n'était pas

nécessairement corrélé avec la résistance aux infections, en particulier chez les enfants (Green, 2007) ; et également par le fait que des volontaires ont pu être réinfectés avec la même souche de NoV 27 à 48 mois après le challenge initial (Matsui et al., 2000). Le rôle des Ac dans la prévention et la résistance à l'infection ne semblait pas clair.

Les études plus récentes montrent que la résistance aux infections à NoV est multifactorielle, impliquant des facteurs génétiques particuliers (Lindesmith et al., 2003). L'attachement des VLP du virus de Norwalk à la surface des cellules épithéliales de la jonction gastroduodénale et dans la salive se produit uniquement chez les individus sécréteurs (exprimant des antigènes de groupes sanguins dans leur salive et leur épithélium de surface intestinal) (Marionneau et al., 2002). La relation entre le groupe sanguin ABO d'une personne dite sécrétrice et la possibilité de développer une infection à NoV a été démontrée (Lindesmith et al., 2003). Le risque d'être infecté par le virus de Norwalk pour les personnes sécrétrices présentant le phénotype O est largement supérieur à celui des personnes sécrétrices de phénotype B (Hutson et al., 2002). Les antigènes ABH de l'intestin constitueraient donc un facteur important dans la pathologie due au virus de Norwalk, les VLP utilisant les antigènes H type 1 et/ou 3/4 comme ligands sur les cellules épithéliales gastro-intestinales des individus sécréteurs (Marionneau et al., 2002). De plus, les différentes souches de NoV pourraient reconnaître des groupes d'antigènes ABH différents sur les récepteurs épithéliaux de l'intestin (Hutson et al., 2002; Lindesmith et al., 2003). Ces résultats, obtenus avec des VLP, ont été complétés par une étude démontrant les différences de propriétés d'attachement aux antigènes ABH des diverses souches de NoV provenant de selles de malades (Harrington et al., 2004). Cette étude a prouvé pour la première fois qu'un ou plusieurs composants des matières fécales humaines pouvait promouvoir et augmenter l'attachement des NoV aux antigènes ABH. D'autres études ont montré qu'une poche de fixation dans le sous-domaine P2 était responsable de l'attachement aux antigènes de groupes ABH (Tan et al., 2003). Par mutagenèse dirigée, certains acides aminés essentiels dans la reconnaissance de ces antigènes ont été identifiés (Tan et al., 2004).

Il est à remarquer que des VLP correspondant à certaines souches de NoV ne se lient pas aux récepteurs ABH testés (Huang et al., 2005), suggérant qu'il existe d'autres mécanismes impliqués dans l'attachement des NoV. Néanmoins, la liaison des NoV aux hydrates de carbones permet d'avancer une explication à l'observation que des individus sans Ac préexistant ne prédit pas nécessairement d'une sensibilité à l'infection par un NoV. Ces individus ne posséderaient simplement pas les récepteurs à NoV.

8. Epidémiologie

Les études épidémiologiques ont à plusieurs reprises montré que les NoV étaient très répandus et que l'infection était fréquente chez l'homme tout comme dans les espèces bovine, porcine ou

murine. Cependant, l'épidémiologie n'est pas bien comprise et peu d'études ont été menées sur les infections animales à NoV.

Les études de séroprévalence chez l'homme ont montré parfois plus de 90% de séropositivité dans certaines régions, indiquant que les NoV humains sont très répandus dans le monde (Lopman et al., 2002). Il est reconnu qu'un grand nombre de génotypes différents co-circulent dans la population humaine mais que certains génotypes de NoV ont tendance à être prédominants. Depuis une dizaine d'années, le génotype GII.4 est celui retrouvé majoritairement dans le monde (Lopman et al., 2004; Bull et al., 2006; Phan et al., 2006; Johansen et al., 2008) avec des sub-génotypes différents qui se succèdent (Lindesmith et al., 2008).

Aux Pays-Bas, 31,6% des échantillons poolés de matières fécales de veaux provenant de fermes pour l'élevage et 4,2% sur des matières fécales individuelles de vaches laitières étaient positives pour les NoV du GIII proches du virus Newbury2 (van der Poel et al., 2003). Au Royaume-Uni, des NoV ont été détectés dans 11% des cas de diarrhées virales bovines testés (Milnes et al., 2007). Aux Etats-Unis, des niveaux de prévalence différents d'excrétion de calicivirus dans les matières fécales ont été trouvés en fonction de l'Etat dans lequel les mesures ont été faites : 72% des veaux de boucherie en Ohio (Smiley et al., 2003), 80% au Michigan et 25% au Wisconsin (Wise et al., 2004). En Allemagne, 9% des échantillons de diarrhée étaient positifs pour le virus Jena alors que 99% des sérums prélevés chez les vaches laitières étaient positifs pour le même virus (Deng et al., 2003). Cela prouve que les NoV bovins sont présents à un niveau élevé dans différents pays (Mauroy et al., 2007; Mauroy et al., 2009). Les NoV de génogroupe II ont été détectés chez des porcs au Japon (Sugieda et al., 1998), aux Pays-Bas (van der Poel et al., 2000), aux Etats-Unis (Wang et al., 2005) et récemment en Hongrie (Reuter et al., 2007) et en Belgique (Mauroy et al., 2008). La fréquence de détection de ces NoV porcins était peu élevée : 0,35% au Japon et 2% aux Pays-Bas. Aucune circulation de NoV porcins n'a pu être mise en évidence au Venezuela en utilisant la RT-PCR (Martinez et al., 2006). La séroprévalence pour le NoV porcins était de 97% aux Etats-Unis et 36% au Japon (Farkas et al., 2005).

Une séroprévalence de 22,1% a été mesurée sur des souris de laboratoire en Amérique du Nord, faisant du NoV murin le virus le plus prévalent infectant ces animaux (Hsu et al., 2005).

Le premier NoV chez un lion a été détecté au zoo de Pistoia en Italie chez un lionceau de quatre semaines qui était mort d'entérite hémorragique sévère ; il n'a pas pu être démontré si ce virus était responsable de la maladie entérique (Martella et al., 2007). Des NoV ont également été détectés chez un chiot atteint de gastroentérite (Martella et al., 2008) et dans des matières fécales de moutons (Wolf et al., 2009). Actuellement, il n'y a pas de donnée de prévalence disponible pour ces virus, vu qu'il s'agit des premières détections de NoV dans ces espèces animales.

9. Diagnostic

La microscopie électronique, les tests immunologiques et la RT-PCR sont utilisés pour le diagnostic des NoV (Lopman et al., 2002). Un problème majeur dans l'utilisation des méthodes immunologiques et moléculaires est la grande diversité génétique et la haute variabilité antigénique des NoV. Cela est bien connu et décrit pour les NoV humains (Zheng et al., 2006). La diversité des NoV animaux est aussi décrite, tant génétique (Smiley et al., 2003) qu'antigénique (Oliver et al., 2006b; Wang et al., 2007) mais est moindre comparée aux NoV humains, comme le montre le nombre de génotypes décrits à l'intérieur de chaque génogroupe (Zheng et al., 2006). Cela pourrait être dû à un biais de détection et le développement de méthodes de diagnostic capables de détecter un large panel de NoV humains et animaux est nécessaire. Cela est freiné par l'absence de possibilité de multiplication en culture de cellules des NoV (Duizer et al., 2004b), excepté pour les NoV murins. Récemment, un système complexe de culture de cellules en trois dimensions a permis la multiplication de NoV humains des GI et II (Straub et al., 2007), ouvrant peut-être une nouvelle ère dans les outils de diagnostic pour les NoV. Malheureusement les tentatives de reproduction de cette technique dans différents laboratoires restent infructueuses. La capacité des NoV murins à se multiplier en culture de cellules permet leur utilisation comme modèle pour des études de persistance et d'inactivation des NoV humains dans différentes matrices alimentaires (Baert et al., 2008a; Baert et al., 2008b; Baert et al., 2008c; Baert et al., 2008d).

Les premières générations de tests comme les radio-immunoassays (IA), les western-blot ou les enzyme-IA utilisaient des réactifs provenant d'humains préalablement infectés par les NoV. Le clonage de NoV a permis la production de nouveaux réactifs (comme les VLP) et le séquençage complet de certaines souches. Les méthodes de nouvelles générations sont alors apparues, comme la RT-PCR, pour le diagnostic des infections à NoV.

9.1 Microscopie électronique

La microscopie électronique (ME) a été un outil fondamental pour la découverte des NoV, mais cette technique reste relativement peu sensible car un haut niveau de charge virale est nécessaire pour leur identification ($>10^6$ particules virales par gramme de matières fécales) (Atmar et al., 2001). De plus, des personnes hautement qualifiées sont requises pour détecter les NoV dans les matières fécales de manière fiable. Quelques variantes de cette technique existent, comme l'IME (immuno-ME) (Kapikian, 2000), ou l'IME en phase solide (Dastjerdi et al., 1999) qui peuvent aussi être utilisées. Elles sont basées sur la réaction antigène-anticorps visualisée par ME en coloration inverse.

9.2 ELISA

L'expression de la protéine de capsid des NoV en système baculovirus permet la large production de VLP, utiles comme antigènes pour les IA. L'ELISA est le plus fréquemment employé parmi les IA, utilisant un sérum hyperimmun produit par immunisation d'animaux. Ces tests sont hautement sensibles comparés à la ME, mais leur utilisation comme outil diagnostique est limité par leur faible spécificité (Jiang et al., 2000). En effet, ils sont basés sur la détection d'antigènes de NoV et peuvent être entravés par la diversité génétique des NoV. Les ELISA sont utiles et pratiques vu leur rapidité et simplicité pour le screening de larges nombres d'échantillons. Pour les NoV bovins et porcins, des ELISA de détection d'antigènes ou d'anticorps ont été décrits (Farkas et al., 2005; Han et al., 2005; Cheetham et al., 2006; Oliver et al., 2007b; Mauroy et al., 2009). Les NoV bovins (GIII) sont divisés en deux sérotypes, correspondant aux deux génotypes distincts représentés par les virus Jena et Newbury2 (Oliver et al., 2006b). Les anticorps dirigés contre les NoV murins peuvent être détectés par ELISA (Mumphrey et al., 2007) ou immunofluorescence (Hsu et al., 2006).

Quatre épitopes communs sont décrits parmi les membres du genre *Norovirus* : un premier au sein du GI (Hale et al., 2000), un second au sein du GII (Li et al., 2009), un troisième entre les NoV de GII et GIII (Oliver et al., 2006b) et le quatrième entre les NoV de GI et GIII (Batten et al., 2006). Ces découvertes pourraient conduire au développement de test ELISA détectant les NoV avec un large spectre de reconnaissance.

9.3 RT-PCR

La RT-PCR fut développée après le séquençage du génome complet de plusieurs NoV (Jiang et al., 1993; Lambden et al., 1993). La diversité génétique parmi les NoV rend impossible le développement d'une paire d'amorces universelles capables de détecter tous les NoV, mais certaines paires d'amorces sont capables de détecter les principales souches de NoV circulant (Le Guyader et al., 1996a; Vinje et al., 1996; Richards et al., 2004; Jothikumar et al., 2005). Une mise à jour constante des amorces est donc nécessaire.

Le gène codant pour la polymérase virale est hautement conservé parmi les NoV et beaucoup d'amorces furent choisies dans cette région (Le Guyader et al., 1996b; Vinje et al., 1996; van der Poel et al., 2003; Wang et al., 2006). De plus, l'analyse de plus d'une région du génome viral est souhaitable et importante pour la détection d'éventuels recombinants. Par séquençage des produits de PCR, des informations sur les relations phylogéniques peuvent être obtenues et les recombinants potentiels détectés.

Certains NoV animaux peuvent être détectés par RT-PCR en utilisant des amorces prévues pour détecter les NoV humains. Cela a permis la détection de NoV porcins (Sugieda et al., 1998), et bovins (Dastjerdi et al., 1999; Liu et al., 1999; van der Poel et al., 2000). Souvent, une première mise

en évidence de NoV dans une espèce animale a été permise de cette façon et par la suite, des méthodes spécifiques ont été développées car plus sensibles. Elles utilisent des amorces dessinées spécifiquement pour les NoV animaux. Par exemple, des amorces spécifiques pour la détection des NoV porcins (Wang et al., 2005) ou bovins (Deng et al., 2003; van der Poel et al., 2003) ont été décrites.

La sensibilité de la RT-PCR peut être diminuée par de la présence d'inhibiteurs dans l'échantillon (Wilson, 1997). L'utilisation d'un contrôle interne est fortement recommandée pour valider les résultats négatifs et quelques-uns ont été décrits pour la détection des NoV porcins (Cheetham et al., 2006; Wang et al., 2006) et bovins (Smiley et al., 2003; Scipioni et al., 2008a; Scipioni et al., 2008c). La RT-PCR reste la méthode de choix pour le diagnostic des NoV car elle est la plus sensible des méthodes utilisée en routine. Elle est de plus en plus remplacée dans sa version classique par la RT-PCR en temps réel, encore plus sensible et plus rapide. Les deux technologies ont été décrites (SYBR Green et sondes TaqMan) et mises au point pour les NoV humains (Jothikumar et al., 2005; Trujillo et al., 2006). Elles peuvent aussi être utilisées pour la détection des NoV animaux, et certaines études récentes les décrivent pour la détection de NoV porcins (Cheetham et al., 2006), bovins (Scipioni et al., 2008a; Scipioni et al., 2008c) et ovins (Wolf et al., 2009) entre autres. La RT-PCR TaqMan présente l'avantage de donner, en un seul test, la confirmation du résultat et permet une quantification de la charge virale si un standard est testé en parallèle (Jothikumar et al., 1995; Scipioni et al., 2008a). Cette dernière application est d'un grand intérêt vu l'impossibilité de multiplier facilement les NoV en culture de cellules.

10. Risque zoonotique

La détection de NoV dans les matières fécales d'animaux (bovins et porcs, et plus récemment lion, chien et mouton), avec ou sans signe clinique associé de gastroentérite, est fréquente (Ando et al., 2000; van der Poel et al., 2000; Deng et al., 2003; Martella et al., 2007; Martella et al., 2008; Wolf et al., 2009). L'analyse moléculaire a montré que les souches de NoV animaux et humains étaient très proches, particulièrement les NoV porcins inclus dans le même génogroupe (GII) que des NoV humains (Sugieda et al., 1998; Oliver et al., 2003; Wang et al., 2005). De plus, la répllication d'un NoV humain de GI a été montrée chez des porcs gnotobiotiques (Cheetham et al., 2006).

Soutenant l'hypothèse que les animaux pourraient agir comme réservoir des NoV humains, une prévalence élevée en Ac dirigés contre les NoV humains a été trouvée chez des porcs au Venezuela. Etonnamment, une séroprévalence supérieure a été observée pour le GI par rapport au GII (Farkas et al., 2005), alors que tous les NoV détectés dans l'espèce porcine à ce jour appartiennent au GII. Ces résultats pourraient être expliqués par l'infection des porcs avec des NoV humains GI ou par la circulation d'un hypothétique NoV non encore découvert chez les porcs.

Bien qu'un réservoir animal ou une transmission zoonotique pourrait exister, la distance génétique (Oliver et al., 2003) et la différence entre les récepteurs (Hutson et al., 2003; Farkas et al., 2005) ne soutiennent pas ces hypothèses. De plus, l'absence d'évidence d'une même souche de NoV circulant chez l'homme et dans une espèce animale suggère une absence de risque pour la santé humaine (Oliver et al., 2003). La détection récente de séquences génétiques proches des NoV humains GII.4 dans les espèces porcine et bovine au Canada pourrait modifier l'estimation de ce risque dans le futur (Mattison et al., 2007).

Même si les NoV animaux n'ont pas été détectés chez l'homme, l'infection par des NoV proches des NoV bovins de GIII a été suggérée par la présence d'Ac contre les NoV bovins GIII.2 chez des vétérinaires aux Pays-Bas (Widdowson et al., 2005a). L'existence d'épitopes communs entre les NoV humains et bovins (Batten et al., 2006; Oliver et al., 2006b) pourrait expliquer ces résultats. À côté de cela, les NoV bovins ne semblent pas représenter un risque pour la santé publique car ils forment un génogroupe distinct des NoV humains (Oliver et al., 2003; Han et al., 2004).

Jusqu'à ce jour, les NoV recombinants décrits sont une combinaison de NoV appartenant au même génogroupe et issus de la même espèce : bovine (Han et al., 2004; Oliver et al., 2004), porcine (Wang et al., 2005) et humaine (Jiang et al., 1999; Vinje et al., 2000; Katayama et al., 2002). Récemment un NoV recombinant intergénogroupes I et II a été décrit (Nayak et al., 2008). Sachant que les mollusques bivalves, de par leur mode d'alimentation par filtration, concentrent les NoV éventuellement présents dans l'eau au niveau de leur système digestif et que des épidémies associées à la consommation de fruits de mer sont fréquentes (spécialement dans les pays où ils sont largement consommés, et aussi parce qu'ils sont souvent mangés crus) (Lees, 2000), sachant aussi qu'une co-infection naturelle a été décrite chez l'homme avec des NoV GI et GII (Chan et al., 2006) et que la présence simultanée de NoV humains et animaux dans des mollusques a été montrée (Costantini et al., 2006), il est primordial de considérer comme une problématique majeure le risque de co-infection de l'homme par des NoV humains et animaux, pouvant conduire à la formation d'un recombinant et à l'émergence d'une nouvelle souche de NoV.

Certains calicivirus animaux sont capables de franchir la barrière d'espèce et d'utiliser l'homme comme un hôte alternatif (Smith et al., 1998a). L'infection de l'homme par un sérotype du virus Snow Mountain du lion de mer a été décrit (Smith et al., 1998a) et des Ac dirigés contre les vesivirus ont été détectés chez des bovins et des chevaux (Kurth et al., 2006a; Kurth et al., 2006b).

Toutes ces données suggèrent que les conditions adéquates pourraient être rencontrées pour permettre l'émergence de souches recombinantes et/ou de transmission inter-espèce de NoV génétiquement compatibles.

2.

Objectifs

1. Objectifs généraux

Les NoV, appartenant à la famille des *Caliciviridae*, sont une cause majeure d'épidémies et de cas sporadiques de gastroentérites hautement contagieuses chez l'homme. Leur transmission emprunte la voie fécale-orale et ils sont à l'origine de la plupart des toxi-infections humaines d'origine alimentaire, en particulier dues à la consommation de mollusques bivalves. Les NoV se sont révélés la première cause de toxi-infection d'origine alimentaire en Belgique en 2007, devant les salmonelles.

Des virus proches ont été détectés dans diverses espèces animales, dont l'espèce bovine. Ces découvertes ont soulevé d'importantes questions sur une éventuelle transmission zoonotique et l'existence d'un réservoir animal des NoV. La caractérisation moléculaire des souches bovines de NoV, nommément le virus Newbury2 et le virus Jena, a révélé qu'ils étaient génétiquement proches et associés aux NoV humains. L'étude des souches de NoV circulant chez l'homme et les espèces animales est intéressante dans le but de comprendre l'éventuel passage inter-espèces et d'apporter certaines réponses concernant les voies de transmission des NoV.

Pour leur étude, un problème majeur réside dans l'incapacité à multiplier facilement les NoV en culture de cellules. La RT-PCR, vu la composition en ARN du génome des NoV, est devenue la méthode de choix pour leur détection, à la fois dans les échantillons de matières fécales, les denrées alimentaires et les prélèvements effectués dans l'environnement. Il est important de disposer de méthodes à la fois sensibles et permettant également la détection d'un large panel de NoV. La quantification est possible par l'utilisation des techniques de RT-PCR en temps réel. Elle est primordiale pour, non seulement déterminer le niveau de contamination d'un prélèvement, mais également pour étudier et caractériser la pathogénie de l'infection à NoV chez l'homme et les animaux.

Ce travail pionnier a ouvert la voie à l'étude d'un nouveau genre viral au laboratoire de virologie, celui des *Norovirus*. Cette thèse s'inscrit dans le cadre général de l'étude des voies de transmission des NoV par une approche moléculaire des NoV présents dans les espèces humaine et bovine.

2. Objectifs spécifiques

La mise en évidence des NoV est un préalable à leur étude. L'objectif de départ a consisté en la mise au point de méthodes rapides et sensibles de détection, et par la suite de quantification. La détection des NoV s'est focalisée dans des échantillons de matières fécales humaines et bovines. D'abord, des méthodes moléculaires de détection par RT-PCR classique ont été mises au point. Elles furent remplacées par la RT-PCR en temps réel (méthodes « SYBR Green » et « TaqMan »). Le but était de pouvoir détecter simultanément les NoV humains et bovins (pour tester l'hypothèse de la

transmission inter-espèces), et également de disposer d'un outil permettant de quantifier la charge de NoV présente dans les prélèvements. Une attention particulière a été donnée à la présence d'inhibiteurs de la réaction de RT-PCR. La construction d'un contrôle interne et son utilisation ont permis de s'affranchir des résultats faussement négatifs dus à une inhibition de la réaction. Une RT-PCR en temps réel fut d'abord développée avec l'agent intercalant SYBR Green. Une seconde RT-PCR en temps réel, utilisant la technologie des sondes TaqMan, fut ensuite développée afin de pouvoir quantifier la charge virale.

A partir de la détection des premiers NoV, leur séquence génomique a pu être étudiée, afin d'apporter des réponses aux questions importantes qui se posaient sur les voies de transmission des NoV, leur catégorie d'hôte et leur évolution. Pour étudier les voies de transmission des NoV par la proximité génétique des souches humaines et bovines, une banque de matières fécales humaines et bovines a été constituée. Afin de caractériser les NoV humains et bovins, les séquences génomiques issues des gènes de la polymérase virale et de la protéine de capsid des NoV ont été analysées et comparées. La relation entre les NoV bovins et humains isolés en Belgique, sur une même période, a été réalisée par l'étude phylogénétique comparative des types de NoV bovins et humains détectés. Des informations sur la proximité génétique de ces virus en ont été déduites afin de contribuer à élucider la question d'une transmission zoonotique ou d'un réservoir animal. Des processus de co-infection et de recombinaison naturelle ont pu être mis en évidence par l'analyse moléculaire et génotypique des NoV détectés en Belgique.

Un autre aspect de ce travail s'intéressait au niveau d'évolution des NoV au cours du temps. Afin de l'étudier, le séquençage complet d'une souche de NoV bovin et l'étude de son organisation génomique ont été réalisés. Cela a également permis de définir les relations précises de ce NoV avec les membres connus du genre *Norovirus*.

3.

Section expérimentale

1. Mise au point de méthodes de détection

1.1 Préambule

Les deux techniques mises au point s'inscrivent dans l'objectif général de l'étude des voies de transmission des NoV en permettant la détection simultanée des NoV bovins et humains.

La première étude concerne la mise au point d'une RT-PCR en temps réel utilisant la technologie du SYBR Green. Elle permet la détection d'un large panel de NoV tout en contrôlant la non-inhibition de la réaction. Cette RT-PCR en temps réel permet la détection des NoV humains et bovins simultanément, et, par l'utilisation d'un contrôle interne, prémunit des résultats faux-négatifs dus à l'inhibition de la réaction. La courbe de dissociation permet de distinguer le contrôle interne des NoV. On peut aussi avoir une première information sur l'espèce hôte des NoV. La sensibilité de ce test est supérieure à celle de la RT-PCR conventionnelle et une dilution 10 fois des produits d'extractions montre une efficacité supérieure et une meilleure reproductibilité que l'addition d'albumine de sérum bovin (BSA) pour lever l'inhibition.

La seconde étude concerne la mise au point d'une RT-PCR en temps réel utilisant la technologie TaqMan. Un des points intéressants de cette technique est qu'elle permet la quantification de la charge virale dans un échantillon et qu'elle est capable de détecter les NoV humains des génogroupes I et II, et les NoV bovins, appartenant au génogroupe III. Les inhibiteurs furent enlevés de manière efficace par une dilution 10 fois des extractions de matériel génétique ou ajout de BSA au mélange de RT-PCR.

Ces deux tests ont été validés sur des matières fécales humaines et bovines précédemment testées pour la recherche de NoV par RT-PCR conventionnelle.

A SYBR Green RT-PCR assay in single tube to detect human and bovine noroviruses and control for inhibition

BMC Virology Journal (2008) 5 : 94

Alexandra Scipioni, Axel Mauroy, Dominique Ziant, Claude Saegerman and Etienne Thiry

Methodology

Open Access

A SYBR Green RT-PCR assay in single tube to detect human and bovine noroviruses and control for inhibition

Alexandra Scipioni¹, Axel Mauroy¹, Dominique Ziant¹, Claude Saegerman² and Etienne Thiry*¹

Address: ¹Department of Infectious and Parasitic Diseases, Virology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, Liege, Belgium and ²Department of Infectious and Parasitic Diseases, Epidemiology and Risk Analysis Applied to Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, Liege, Belgium

Email: Alexandra Scipioni - alexandra.scipioni@ulg.ac.be; Axel Mauroy - amauroy@ulg.ac.be; Dominique Ziant - dominique.ziant@ulg.ac.be; Claude Saegerman - claude.saegerman@ulg.ac.be; Etienne Thiry* - etienne.thiry@ulg.ac.be

* Corresponding author

Published: 14 August 2008

Received: 6 May 2008

Virology Journal 2008, 5:94 doi:10.1186/1743-422X-5-94

Accepted: 14 August 2008

This article is available from: <http://www.virologyj.com/content/5/1/94>

© 2008 Scipioni et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Noroviruses are single-stranded RNA viruses belonging to the family *Caliciviridae*. They are a major cause of epidemic and sporadic gastroenteritis in humans and clinical signs and lesions of gastroenteritis were reported in bovines. Due to their genetic proximity, potential zoonotic transmission or animal reservoir can be hypothesized for noroviruses. RT-PCR has become the "gold standard" for the detection of noroviruses in faecal and environmental samples. With such samples, the control for inhibition of the reaction during amplification and detection is crucial to avoid false negative results, which might otherwise not be detected. The aim of the reported method is to detect, with a SYBR Green technology, a broad range of noroviruses with a control for inhibition.

Results: A SYBR Green real-time RT-PCR assay was developed making use of a foreign internal RNA control added in the same tube. This assay is able to detect human and bovine noroviruses belonging to genogroups I, II and III and to distinguish between norovirus and internal control amplicons using melting curve analysis. A 10-fold dilution of samples appears to be the method of choice to remove inhibition. This assay was validated with human and bovine stool samples previously tested for norovirus by conventional RT-PCR.

Conclusion: This SYBR Green real-time RT-PCR assay allows the detection of the most important human and bovine noroviruses in the same assay, and avoids false negative results making use of an internal control. Melting curves allow the discrimination between the internal control and norovirus amplicons. It gives preliminary information about the species of origin. The sensitivity of the developed assay is higher than conventional RT-PCR and a 10-fold dilution of samples showed a better efficiency and reproducibility to remove RT-PCR inhibition than addition of bovine serum albumin.

Background

Norovirus is one of the four genera currently accepted into the family *Caliciviridae*. Other genera in this family include Sapovirus, which causes gastroenteritis in humans, as well as Lagovirus and Vesivirus, neither of which are pathogenic for humans. Noroviruses are small, non-enveloped viruses with a diameter of approximately 27–35 nm. They have a positive-sense, single stranded RNA genome [1]. Norwalk virus, the prototype strain of the genus norovirus, was first described in 1972 in association with an outbreak of gastroenteritis and vomiting involving children and staff at an elementary school in Norwalk, Ohio [2].

Noroviruses are now recognized as a common cause of human infectious gastroenteritis in all age groups, especially in restaurants and institutions such as nursing homes and hospitals [3-5]. They are one of the main causes of foodborne gastroenteritis [6,7]. Furthermore, several animal noroviruses genetically closely related to human noroviruses have been recently discovered [8-10]. Their existence raises important questions about animal reservoirs and potential zoonotic transmission [8]. The diagnostic of human and bovine noroviruses is impaired by the difficulties to replicate it in cell culture [11], although a tridimensional culture system was recently shown to be able to grow human noroviruses [12]. The full-length sequencing of different human norovirus genomes has allowed the development of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) [13,14], which has become the gold standard for norovirus diagnosis [15]. Due to the genetic diversity among noroviruses, it is very difficult to find an appropriate primer pair that is both sensitive and specific for detection of all noroviruses. The most conserved region of the genome is the RNA polymerase gene and several primer pairs have been selected in that region [15], as the one used in this assay [16]. Real-time RT-PCR assays are more and more developed and has become the method of choice for the detection and the characterization of norovirus. Many different real-time RT-PCR assays for norovirus genogroups I and II had been developed [17-19] and co-detection of human and animal noroviruses was described in a multiplex assay [20] or simultaneously [21].

Noroviruses are usually detected in clinical specimens (faeces and vomit) and contaminated food, water or sewage [22-25]. Such samples commonly contain components reported to be (RT-)PCR inhibitors [26,27], leading to a high risk of false negative results or a decrease of the Ct value. A control to adequately detect problems with either RNase contamination or RT-PCR inhibitors is necessary to avoid false-negative responses for samples submitted for diagnosis [28,29]. An internal control is crucial to diagnostic (RT-)PCR assays. It is co-amplified with the

target sequence and a negative result indicates a total (RT-)PCR failure. Also partial decrease of amplification capability can be estimated compared with the decrease of the internal control Ct value (internal control in the sample versus internal control alone).

The aim of this study was the development of a SYBR Green real time RT-PCR method able to detect the most important genogroups of noroviruses circulating in the human and bovine populations. This assay includes an internal RNA control and has been designed and validated for the diagnosis of noroviruses in human and bovine stool samples. Melting curve analysis allows the distinction between the internal control and norovirus amplicons and gives some indication about the species of origin. Moreover, the use of this single tube assay, cheaper than a TaqMan analysis, has the great advantages to detect (RT-)PCR inhibition that may lead to false negative results.

Results

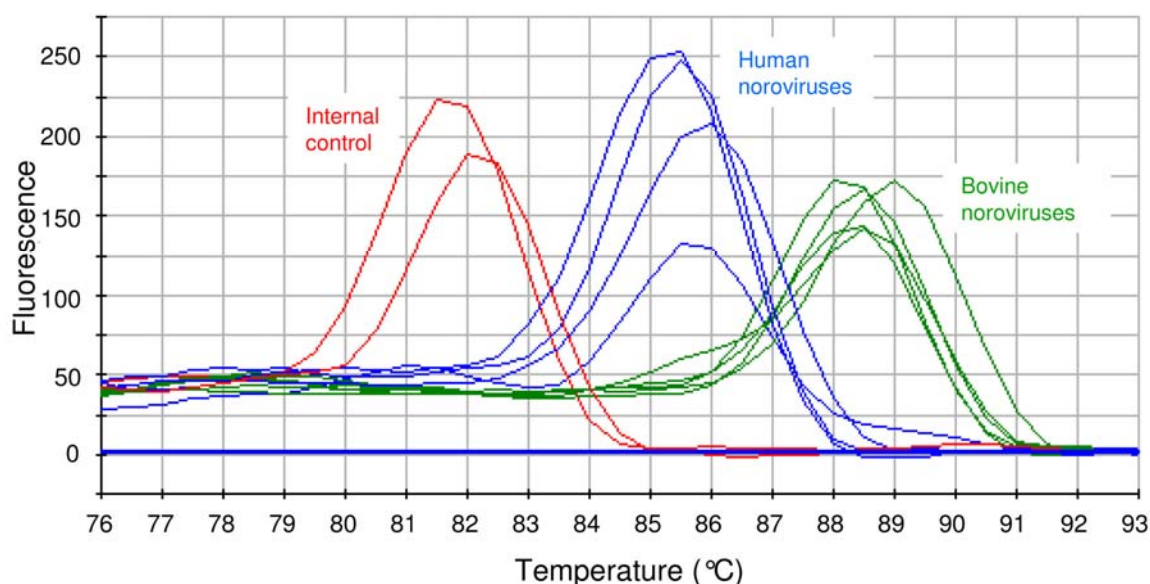
Validation of the SYBR Green real-time RT-PCR assay – control of inhibition

The set up of the internal RNA control had been previously described [21] and the primers used in the SYBR Green real-time RT-PCR had been validated for their specificity by Vennema and collaborators [16].

Serial dilution of the norovirus internal RNA control transcribed *in vitro* demonstrated that 2 μ l of the 10^9 fold dilution contained adequate template to produce a detectable product by melting curve analysis following real-time RT-PCR. This corresponds to a quantity of 1.9×10^{-6} ng of internal RNA control or 5,800 copies [21].

Amplification of the internal RNA control produced amplicons with a melting temperature 3°C lower than norovirus amplicons (Figure 1).

The exact amount of internal control to add in the mix with each RNA extraction from stool samples was determined using the detection limit of the internal control in real-time SYBR Green RT-PCR and checking the non-competitive amplification between the internal control and norovirus RNA. Different amounts of internal RNA control were added with 10-fold serial dilutions of extracted norovirus RNA. At the same time, a serial dilution of extracted norovirus RNA without internal control was tested with the SYBR Green real-time RT-PCR assay (data not shown). The quantity to add to a 25 μ l mix was 3.8×10^{-5} ng of internal RNA control, corresponding to 117,500 copies. The performances of the assay were evaluated using serially diluted internal RNA control (10-fold dilutions) from 5.8×10^6 to 5.8×10^{11} copies and linearity was obtained (Figure 2).

**Figure 1**

Distinction between norovirus amplicons and internal control amplicon allowed by the melt curve analysis. The internal control has a melting temperature around 81.5°C, human norovirus amplicons, around 85.5°C and bovine norovirus amplicons has a melting temperature around 88.5°C. Such differences in temperature are clearly visible on the curve.

Most of the values obtained with the SYBR Green assay were within the 95% limits of agreement (mean of differences \pm 1.96 S.D. of the differences) showing satisfactory agreement (data not shown). For repeatability and reproducibility, the standard errors of measurement were less than 0.291°C and 0.354°C respectively. The mean melting temperatures were significantly lower for the internal control than both human and bovine noroviruses. Moreover the mean melting temperature for human noroviruses was significantly lower than the melting temperature for bovine noroviruses (Wilcoxon rank tests, $P < 0.001$) (Figure 3).

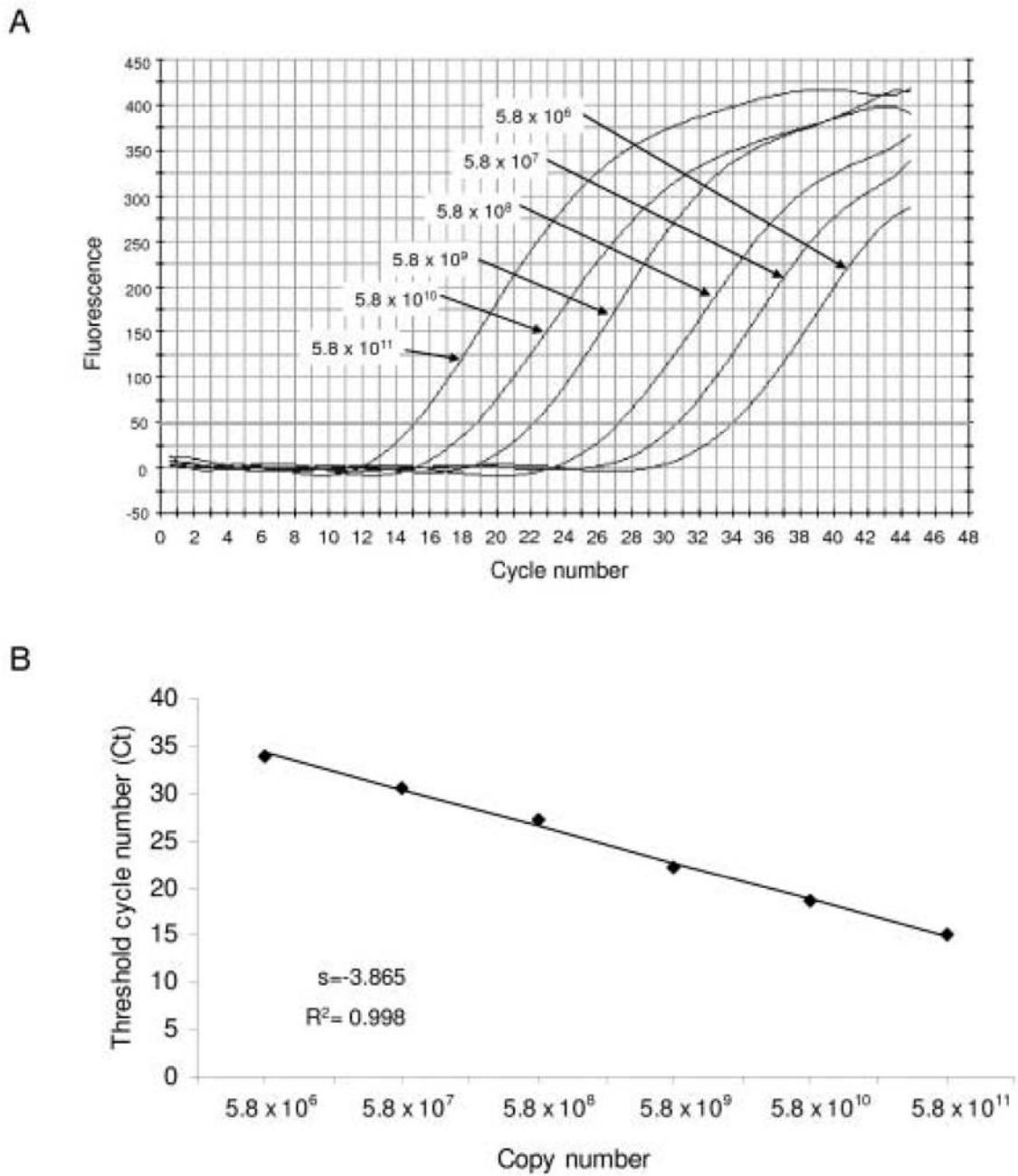
Analysis of human and bovine stool samples

The comparison of the results obtained with the SYBR Green and the conventional RT-PCR assay is shown in table 1. In a first stage, the SYBR Green assay was performed on extracted RNA from stool samples. Three kinds of results were obtained: negative if a peak at 81.5°C was shown in the melting curve, positive if a peak around 85–88°C was shown and inhibition of reaction if there was an absence of these peaks (Figure 1). Samples containing human genogroup I or II noroviruses and bovine genogroup III noroviruses were tested and often showed different melting temperatures. The majority of bovine

norovirus amplicons showed a melting temperature around 3°C higher than the human noroviruses (Figure 3).

The use of the internal control for norovirus real-time RT-PCR diagnosis in 86 stool samples identified inhibition of RT-PCR in 32.6% of stool samples tested in this study (Table 1). Two different methods were used on extracted RNA from samples showing inhibition. One is a 10-fold dilution of the extracted RNA before testing with the SYBR Green assay and the second one is the addition of bovine serum albumin (BSA) in the mix. Among the 28 samples showing inhibition, a 10-fold dilution was active in all samples compared to BSA that failed to remove inhibition from 4 samples.

Considering the SYBR Green assay as the gold standard (Table 1), the relative sensitivity of the conventional RT-PCR used in this study was 92.6% (95% confidence interval (CI) 82.1–97.9). The relative specificity was 100% (CI 91–100) for all techniques. Confirming these results, Kappa value showed a high level of agreement between conventional RT-PCR and the SYBR Green real-time RT-PCR (Kappa value: 0.90; CI 0.81–0.99).

**Figure 2**

Linearity of the SYBR Green assay. (A) Detection of 10-fold serial dilution of a positive human sample by the SYBR Green assay performed from 5.8×10^6 to 5.8×10^{11} molecules. (B) Standard curve of these dilutions, each dot representing the result of amplification for each quantity.

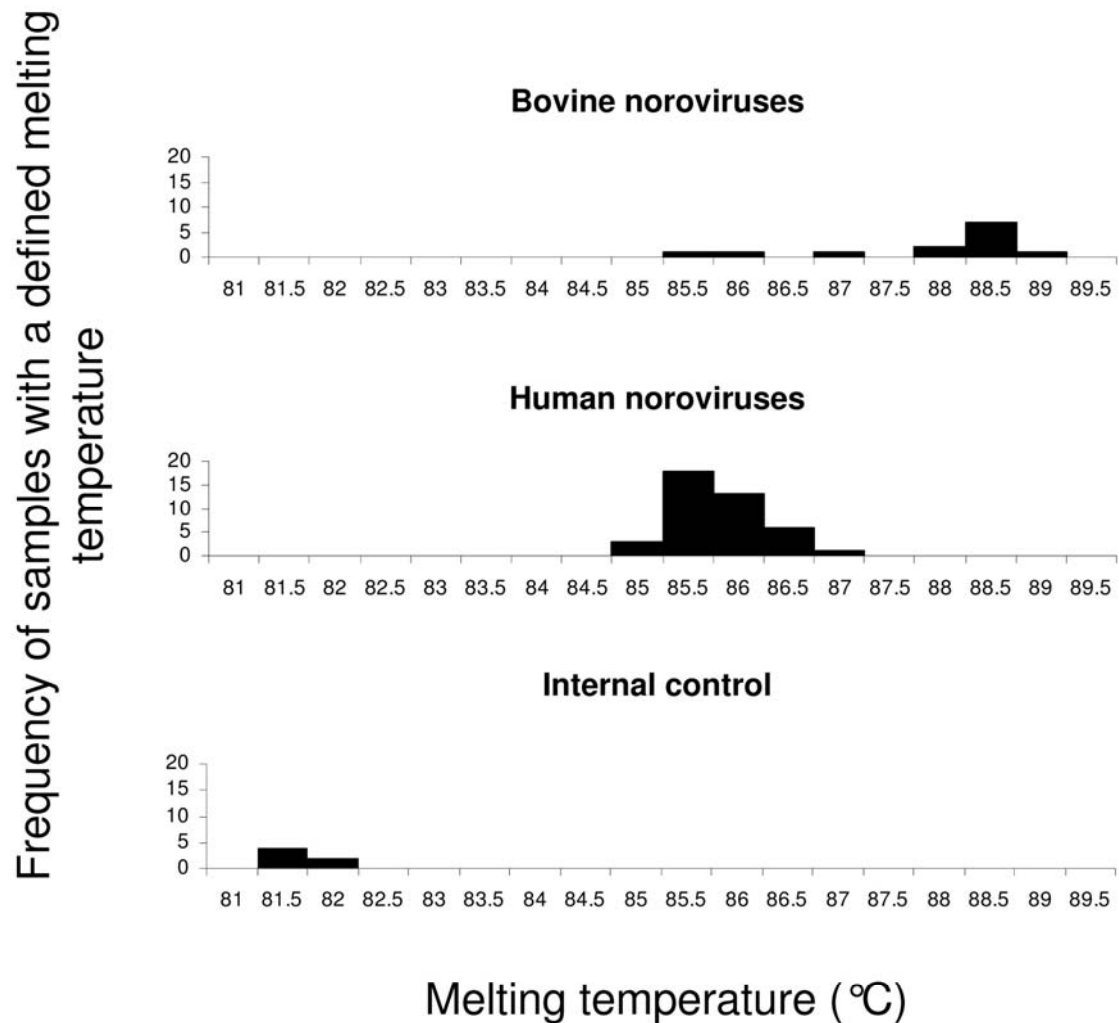


Figure 3
Frequency occurrence of amplicon melting temperature for human noroviruses, bovine noroviruses, and the internal control. The majority of bovine norovirus amplicons has a melting temperature around 88.5°C, about 3°C higher than the human ones. Though some bovine samples shown have a melting temperature similar to the human norovirus ones.

Discussion

In this study we developed a sensitive and broadly reactive real-time SYBR Green RT-PCR assay that interestingly detects human genogroups I and II and bovine genogroup III noroviruses in a single tube, including an internal control. This assay takes into account that samples may contain inhibitors of PCR or RT-PCR [22,23]. The method uses one-step, hot start RT-PCR with thermostable DNA polymerase. The one step protocol simplifies the method and reduces the risk of contamination of RNA. Moreover it is useful for routine diagnosis as there is no post-amplification processing of the product.

The genetic diversity of noroviruses makes though to select a pair of primers capable of detecting all the different norovirus genogroups. The commonly used JV12-13 primer pair has been replaced by JV12Y-13I, which contains degenerated bases to allow the detection of a larger panel of noroviruses [16]. This primer pair is able to detect noroviruses belonging to human genogroups I and II and bovine noroviruses belonging to genogroup III [30]. The variability in the melting temperature between human and bovine noroviruses can be also explained by the genetic diversity among norovirus sequences [31,32], even if the amplicon is located in the polymerase region

Table 1: Comparison of the detection of human and bovine noroviruses by the conventional RT-PCR assay and the SYBR Green assay

		SYBR Green RT-PCR						
		+		-		Inhibition		
Conventional RT-PCR	+	44	50	0	0	6	0	50
	-	1	4	13	32	22	0	36
		45	54	13	32	28	0	86

Normal font: SYBR Green assay on RNA directly; **bold font**: SYBR Green assay modified to remove inhibition using 10-fold dilution of extracted RNA.

highly conserved among noroviruses. Therefore, this assay has the rare advantage to detect norovirus strains irrespectively of their origin (human or bovine). There are few methods described that allow the detection of both human and bovine noroviruses. Compared to the method recently published by Wolf and collaborators [20], our assay has the advantage to detect noroviruses in the same reaction tube and to control for inhibition of the reaction. It is also to detect mixed infection (presence of human and bovine noroviruses in the same sample), by the presence of two distinct peaks.

A common problem with RT-PCR is the presence of (RT)-PCR inhibitors which may cause false negative results. Therefore, to avoid such false negative results, the internal RNA control set up previously [21] was used in this real-time SYBR Green RT-PCR assay. It was synthesized *in vitro* from a foreign DNA template, in order to decrease interference with norovirus amplicons [33,34]. It has the advantages of representing no risk for human or animal health because it does not contain any infectious material, and being stable compared to live control viruses that can evolve and change during their replication. The norovirus amplification is favored compared to the internal control because the RT-PCR of the later results in a larger product. It is an essential property for its function. It means a decrease of the Ct value of the internal control if noroviruses are present in the sample.

With this internal RNA control, inhibition can be detected without the need of additional primer pairs or an additional reaction run for this purpose and the effective identification of samples containing endogenous inhibitors of RT-PCR is allowed. This improvement is crucial for early intervention and control in norovirus outbreaks.

With routine samples used for diagnosis, 36.8% of human samples and 24.1% of bovine samples showed presence of inhibition that can vary a lot among samples and may depend on the type of sample but also on the intrinsic

characteristics of the sample (for example, herbivorous or omnivorous diet). When inhibition was detected in samples, the extracted RNA was tested a second time with the SYBR Green assay, on 10-fold diluted RNA or with BSA added in the RT-PCR mix. Sample dilution is often effective as the inhibitory factors can be diluted out, however, enough quantities of target nucleic acid must be present in order to be detected after dilution [35]. The addition of BSA, that is able to scavenge a variety of inhibitory substances [36], does not have this inconvenience. Our experience in using those two techniques to remove inhibitors led to the conclusion that a 10-fold dilution is more efficient and reproducible than the addition of BSA.

Conclusion

In conclusion, the real-time assay described in this study is an accurate, sensitive, specific and quick method for the detection of a wide range of noroviruses belonging to genogroups I, II and III. At the same time it offers a method to detect samples containing inhibitors, avoiding false negative results by using an internal control. This assay will be applicable to clinical diagnosis in human and animal laboratories, detection of viruses in food or environmental samples. It is the first SYBR Green real-time assay that uses a single primer pair able to detect human and bovine noroviruses simultaneously. A 10-fold dilution of RNA appears to be the method of choice to remove inhibition.

The melting curve analysis gives presumption for the virus origin regarding the host and points out interesting samples to sequence for further studies (bovine norovirus with a melting temperature similar to the human norovirus ones). This property is of utmost importance regarding classification and study of transmission routes of noroviruses. This requires sequencing step in addition to detection. Although neither a zoonotic transmission, nor identification of an animal reservoir of norovirus have been already identified in natural condition, experimental evidence of cross infection was provided with successful inoculation of pigs with human norovirus [8,37]. Moreover bovine noroviruses have been detected in the food chain, in a bivalve mollusc sample which was contaminated with human noroviruses [38]. This increases the risk of crossing the species barrier and the probability of the emergence of recombinant viruses. In that context, a diagnostic assay that has the capacity to detect both human and bovine noroviruses is of high interest.

Methods

Human and animal stool specimens

Fifty seven human and 29 bovine stool samples were tested. Human samples were selected from faeces collected over a 2-year period (2000–2002) by the Medical Microbiological and Virological Laboratory of the Univer-

Virology Journal 2008, 5:94

<http://www.virologyj.com/content/5/1/94>

sity hospital of Liege and from outbreaks in Belgium provided in part by the Institute for Public Health in Brussels and the Virology Laboratory of the St Luc University hospital (2006–2007). Bovine samples were taken from faeces collected by the regional animal diagnostic laboratories "ARSIA" (*Association Régionale de Santé et d'Identification Animales*) in Belgium over a two year period (2002–2003). All bovine and human samples had been tested previously for norovirus by conventional one-step RT-PCR and sequenced for confirmation. The stool specimens were stored at -80°C. All positive samples were used in this study and 36 negative samples were randomly selected.

Processing of stool samples, RNA extraction and conventional RT-PCR

The all procedure was already described [21]. Briefly, stool samples were 10-fold diluted in phosphate-buffered saline and RNA was extracted using the QIAamp viral RNA Mini Kit (Qiagen, Leusden, The Netherlands). A one-step RT-PCR kit, the Access RT-PCR System (Promega, Leiden, The Netherlands), was used with broadly reactive primer pairs, developed for the detection of noroviruses in stool specimens from humans or bovines [21].

Real-time RT-PCR system

The real-time PCR assays were carried out on the iCycler (Biorad, Nazareth, Belgium) using iScript One-step RT-PCR kits for SYBR-Green assay (Biorad, Nazareth, Belgium) and used 2 µl of extracted RNA with 25 µl of master-mix with primers at 300 nM final concentration.

The primer set used was JV12Y-JV13I [16]. The quantity of 117,500 copies of the internal RNA control was added with each sample. The iCycler RT-PCR protocol included the following parameters: reverse transcription for 18 minutes at 48°C, 5 minutes at 95°C, followed by 45 cycles of 10 seconds at 95°C, 20 seconds at 48°C and 45 seconds at 60°C. Data were obtained during the elongation period. After the RT-PCR reaction, melting curve analysis was performed. To remove inhibition, BSA was added at a final concentration of 400 ng/µl in the RT-PCR mix or the extracted RNA was 10-fold diluted. A negative sample was added every 18 samples. All positive samples were confirmed by sequencing RT-PCR products.

Statistical validation

Agreement of the mean melting temperature obtained with the real-time SYBR Green assay (repeatability, 35 duplicates and 10 triplicates, and reproducibility, 33 twice and 5 threefold) was measured according to a method described by Petrie and Watson [39].

Comparison between melting temperatures obtained with the real-time SYBR Green assay in each group

(human noroviruses, bovine noroviruses and internal control) was performed using Wilcoxon rank tests and assuming unequal variance and data not distributed as a normal distribution [40].

All statistical analyses were carried out with Stata/SE [41]. Relative sensitivity and specificity were estimated with 95% confidence intervals assuming a binomial exact distribution. The limit of statistical significance of the conducted tests was defined as $P \leq 0.05$ and the Kappa coefficient was calculated.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AS designed the internal control and the SYBR Green assay and did the real-time analyses. She drafted the manuscript. DZ carried out the conventional RT-PCR analyses of stool samples, and participated in analytical methods. AM was involved in the laboratory analyses and the draft of the manuscript. CS performed the statistical analysis. AS and ET conceived the study. ET is the head of the laboratory. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported in part by SPF "Santé publique, Sécurité de la Chaîne alimentaire et Environnement" (RF6185), by Belgian Science Policy – Science for a Sustainable Development (SSD) (SD/AF/01), by the "Région Wallonne" (415701) and the University of Liège.

The authors thank Miss Pascaline Peeters for technical assistance during her practice training period and the staff of the Virology Laboratory for technical assistance. We thank especially Dr Geneviève Christiaens, Dr Patrick Goubau, Katelijne Dierick and Nadine Botteldoorn for their kind assistance and efficacy to collect samples. We thank Drs Czaplicki, Lomba (Association Régionale de Santé et d'identification animale) and De Mol (Microbiology, Faculty of Medicine, University of Liège) for their assistance in the collection of animal and human samples respectively. We are very grateful to Jennifer Cannon for her careful reading of the manuscript.

References

1. Green KY, Chanock RM, Kapikian AZ: **Human calciviruses**. In *Fields Virology Volume 1*. 4th edition. Edited by: Knipe DM, Howley PM. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001:841-874.
2. Kapikian AZ: **The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective**. *J Infect Dis* 2000, **181**(Suppl 2):S295-S302.
3. Verbelen V, Bodeus M, Garrino MG, Scipioni A, Kabamba B, Daube G, Thiry E, Goubau P: **Hospital outbreak of gastroenteritis due to Norovirus in Belgium**. *Acta Clin Belg* 2004, **59**:30-33.
4. Vinje J, Altena SA, Koopmans MP: **The incidence and genetic variability of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands**. *J Infect Dis* 1997, **176**:1374-1378.
5. Vinje J, Koopmans MP: **Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands**. *J Infect Dis* 1996, **174**:610-615.
6. Green KY: **The role of human calciviruses in epidemic gastroenteritis**. *Arch Virol Suppl* 1997, **13**:153-165.

Virology Journal 2008, 5:94

<http://www.virologyj.com/content/5/1/94>

7. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV: **Food-related illness and death in the United States.** *Emerg Infect Dis* 1999, **5**:607-625.
8. Scipioni A, Mauroy A, Vinje J, Thiry E: **Animal noroviruses.** *Vet J* 2008 in press. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.11.012
9. Sugieda M, Nagaoka H, Kakishima Y, Ohshita T, Nakamura S, Nakajima S: **Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs.** *Arch Virol* 1998, **143**:1215-1221.
10. Woode GN, Bridger JC: **Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves.** *J Med Microbiol* 1978, **11**:441-452.
11. Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, Atmar RL, Koopmans MP, Estes MK: **Laboratory efforts to cultivate noroviruses.** *J Gen Virol* 2004, **85**:79-87.
12. Straub TM, Honer zu Bentrup K, Orosz-Coghlan P, Dohnalkova A, Mayer BK, Bartholomew RA, Valdez CO, Bruckner-Lea CJ, Gerba CP, Abbaszadegan M, Nickerson CA: **In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses.** *Emerg Infect Dis* 2007, **13**:396-403.
13. Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK: **Sequence and genomic organization of Norwalk virus.** *Viol* 1993, **195**:51-61.
14. Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN: **Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus.** *Science* 1993, **259**:516-519.
15. Atmar RL, Estes MK: **Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses.** *Clin Microbiol Rev* 2001, **14**:15-37.
16. Vennema H, de Bruin E, Koopmans M: **Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction.** *J Clin Virol* 2002, **25**:233-235.
17. Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K: **Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR.** *J Clin Microbiol* 2003, **41**:1548-1557.
18. Menton JF, Kearney K, Morgan JG: **Development of a real-time RT-PCR and Reverse Line probe Hybridisation assay for the routine detection and genotyping of Noroviruses in Ireland.** *Viol J* 2007, **4**:86.
19. Nordgren J, Bucardo F, Dienus O, Svensson L, Lindgren PE: **Novel light-upon-extension real-time PCR assays for detection and quantification of genogroup I and II noroviruses in clinical specimens.** *J Clin Microbiol* 2008, **46**:164-170.
20. Wolf S, Williamson WM, Hewitt J, Rivera-Aban M, Lin S, Ball A, Scholes P, Greening GE: **Sensitive Multiplex Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for the Detection of Human and Animal Noroviruses in Clinical and Environmental Samples.** *Appl Environ Microbiol* 2007, **73**:5464-5470.
21. Scipioni A, Bourgot I, Mauroy A, Ziant D, Saegerman C, Daube G, Thiry E: **Detection and quantification of human and bovine noroviruses by a TaqMan RT-PCR assay with a control for inhibition.** *Mol Cell Probes* 2008 in press. doi: 10.1016/j.mcp.2008.02.003
22. Atmar RL, Neill FH, Romalde JL, F LG, 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**:3014-3018.
23. De Leon R, Matsui SM, Baric RS, Herrmann JE, Blacklow NR, Greenberg HB, Sobsey MD: **Detection of Norwalk virus in stool specimens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nonradioactive oligoprobes.** *J Clin Microbiol* 1992, **30**:3151-3157.
24. Le Guyader F, Estes MK, Hardy ME, Neill FH, Green J, Brown DW, Atmar RL: **Evaluation of a degenerate primer for the PCR detection of human caliciviruses.** *Arch Virol* 1996, **141**:2225-2235.
25. Schwab KJ, Neill FH, Fankhauser RL, Daniels NA, Monroe SS, Bergmire-Sweet DA, Estes MK, Atmar RL: **Development of methods to detect "Norwalk-like viruses" (NLVs) and hepatitis A virus in delicatessen foods: application to a food-borne NLV outbreak.** *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**:213-218.
26. Lantz P-G, Matsson M, Wadstrom T, Radstrom P: **Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR.** *J Microbiol Methods* 1997, **28**:159-167.
27. Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, Cabrita J, Megraud F: **Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: Helicobacter pylori model.** *J Clin Microbiol* 1997, **35**:995-998.
28. Kleiboeker SB: **Applications of competitor RNA in diagnostic reverse transcription-PCR.** *J Clin Microbiol* 2003, **41**:2055-2061.
29. Wilson IG: **Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification.** *Appl Environ Microbiol* 1997, **63**:3741-3751.
30. van der Poel WH, Vinje J, van der Heide R, Herrera MI, Vivo A, Koopmans MP: **Norwalk-like calicivirus genes in farm animals.** *Emerg Infect Dis* 2000, **6**:36-41.
31. Helps C, Lait P, Tasker S, Harbour D: **Melting curve analysis of feline calicivirus isolates detected by real-time reverse transcription PCR.** *J Virol Methods* 2002, **106**:241-244.
32. Richards GP, Watson MA, Fankhauser RL, Monroe SS: **Genogroup I and II noroviruses detected in stool samples by real-time reverse transcription-PCR using highly degenerate universal primers.** *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**:7179-7184.
33. Kim K, Park J, Chung Y, Cheon D, Lee IB, Lee S, Yoon J, Cho H, Song C, Lee KH: **Use of internal standard RNA molecules for the RT-PCR amplification of the faeces-borne RNA viruses.** *J Virol Methods* 2002, **104**:107-115.
34. Schwab KJ, Estes MK, Neill FH, Atmar RL: **Use of heat release and an internal RNA standard control in reverse transcription-PCR detection of Norwalk virus from stool samples.** *J Clin Microbiol* 1997, **35**:511-514.
35. Trujillo AA, McCaustland KA, Zheng DP, Hadley LA, Vaughn G, Adams SM, Ando T, Glass RI, Monroe SS: **Use of TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus.** *J Clin Microbiol* 2006, **44**:1405-1412.
36. Kreader CA: **Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein.** *Appl Environ Microbiol* 1996, **62**:1102-1106.
37. Cheetham S, Souza M, Meulia T, Grimes S, Han MG, Saif LJ: **Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs.** *J Virol* 2006, **80**:10372-10381.
38. 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**:1800-1809.
39. Petrie A, Watson P: **Additional techniques.** In *Statistics for veterinary and animal science Volume 14*. 2nd edition. Edited by: Science B. Edinburgh: Blackwell Science; 2006:191-211.
40. Dagnelie P: **Interférence statistique à une et à deux dimensions.** In *Statistique théorique et appliquée Volume 2*. Paris, Bruxelles: De Boeck & Larcier; 1998:659.
41. StataCorp: **Stata Statistical Software.** In *Release 8.0 edition* College Station, TX: Stata Corporation; 2003.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:

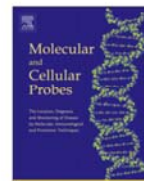
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



Detection and quantification of human and bovine noroviruses by a TaqMan RT-PCR assay with a control for inhibition

Molecular and Cellular Probes (2008) **22**; 215-222

Alexandra Scipioni, Isabelle Bourgot, Axel Mauroy, Dominique Ziant, Claude Saegerman, Georges Daube and Etienne Thiry



Detection and quantification of human and bovine noroviruses by a TaqMan RT-PCR assay with a control for inhibition

Alexandra Scipioni^a, Isabelle Bourgot^a, Axel Mauroy^a, Dominique Ziant^a, Claude Saegerman^b, Georges Daube^c, Etienne Thiry^{a,*}

^a Department of Infectious and Parasitic Diseases, Virology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, B-4000 Liege, Belgium

^b Department of Infectious and Parasitic Diseases, Epidemiology and Risk Analysis Applied to Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, B-4000 Liege, Belgium

^c Department of Food Sciences, Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, B-4000 Liege, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 October 2007

Received in revised form 22 February 2008

Accepted 25 February 2008

Available online 5 March 2008

Keywords:

Norovirus
Detection
Real-time RT-PCR
Inhibitor
Quantification
Zoonosis

ABSTRACT

Noroviruses are single-stranded RNA viruses belonging to the family *Caliciviridae*. They are a major cause of epidemic and sporadic gastroenteritis in humans and calves. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) has become the “gold standard” for detection of noroviruses in faecal and environmental samples. However, false negative results due to co-concentration of RT-PCR inhibitors are a continuous concern. A TaqMan real-time RT-PCR assay making use of a foreign internal RNA control and a RNA standard was developed. Very interestingly, this method is capable of detecting human noroviruses belonging to genogroups I and II, and bovine noroviruses belonging to genogroup III. Inhibitors were removed efficiently by 1/10 dilution of the sample or addition of bovine serum albumin to the RT-PCR mix. This assay was validated with human and bovine stool samples previously tested for norovirus by conventional RT-PCR. The ability to detect norovirus in stool samples that were negative by conventional RT-PCR assay demonstrate the higher sensitivity of the TaqMan assay compared to the conventional RT-PCR assay. This real-time RT-PCR assay allows the detection of both human and bovine noroviruses, avoids false negative results and is able to quantify the level of norovirus contamination.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Caliciviruses are small non-enveloped, positive-sense RNA viruses. This family is divided into four genera. Norwalk virus is the prototype strain of the Norovirus genus. This virus was first described in 1972 in association with an outbreak of gastroenteritis and vomiting involving children and staff at an elementary school in Norwalk, Ohio [1]. Other genera in the *Caliciviridae* family include Sapovirus, which also causes gastroenteritis among both children and adults, and Lagovirus and Vesivirus, neither of which are pathogenic for humans.

In recent years noroviruses have emerged as a common cause of human infectious gastroenteritis in all age groups, especially in restaurants and institutions such as nursing homes and hospitals [2–4]. They are one of the main causes of foodborne gastroenteritis [5,6]. Furthermore, several animal noroviruses genetically closely

related to human noroviruses have been recently discovered [7–9]. The existence of these animal noroviruses raises important questions about potential zoonotic transmission and animal reservoirs [7]. Human and bovine norovirus diagnosis is impaired by the fact that these viruses cannot replicate in cell culture [10] although a tridimensional culture system was recently shown to be able to grow human noroviruses [11]. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) has been developed after full-length sequencing of different human norovirus genomes [12,13]. Many primer pairs used in RT-PCR [14], which has become the gold standard for norovirus diagnosis, have been designed. Due to the genetic diversity among noroviruses, it is very difficult to find an appropriate primer pair that is both sensitive and specific for the detection of all noroviruses. Several primer pairs are located in the most conserved region of the genome, the RNA polymerase gene [14].

Sensitivity of RT-PCR often out competes that of other techniques such as virus identification by electron microscopy and antigen-based ELISA, but false negative results can occur due to the presence of endogenous RNase in samples. Moreover noroviruses have been detected in clinical specimens (faeces and vomit) and contaminated food, water or sewage [15–18]. A number of

* Corresponding author. Department of Infectious and Parasitic Diseases, Virology and Animal Viral Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, Boulevard de Colonster, 20, Bat. B43b, 4000 Liege, Belgium. Tel.: +32 43 664 250; fax: +32 43 664 261.

E-mail address: etienne.thiry@ulg.ac.be (E. Thiry).

commonly encountered components in such samples have been reported to be (RT-) PCR inhibitors [19,20]. Failure to adequately detect problems with either RNase contamination or RT-PCR inhibitors may result in false negative responses for samples submitted for diagnosis [21,22].

In this manuscript, we described the development of a real-time TaqMan RT-PCR assay able to detect and also quantify noroviruses circulating in the human and bovine population, an interesting fact regarding the potential zoonotic risk [7], with the advantage of pointing out samples with inhibition.

2. Materials and methods

2.1. Human and animal stool specimens

Fifty-seven human and twenty-nine bovine stool samples were tested. Human samples were selected from faeces collected over a 2-year period (2000–2002) by the Medical Microbiological and Virological Laboratory of the University hospital of Liège and from outbreaks in Belgium provided in part by the Institute for Public Health in Brussels and the Virology Laboratory of the St Luc University hospital (2006–2007). Bovine samples were taken from faeces collected by the regional animal diagnostic laboratories “ARSIA” (Association Régionale de Santé et d'Identification Animales) in Belgium over a two year period (2002–2003). All bovine and human samples had been tested previously for norovirus by conventional one-step RT-PCR (see Section 2.4) and sequenced for confirmation. The stool specimens were stored at -80°C . All positive samples were used in this study and thirty six negative samples were randomly selected.

2.2. Viruses

Bovine rotavirus strain RF75 and human rotavirus strain WA were provided by the French food safety agency (AFSSA), Maisons-Alfort. Hepatitis A virus is from ATCC collection, ref. VR-1402. The feline calicivirus is from our collection.

2.3. Processing of stool samples and RNA extraction

Stool samples were diluted in phosphate-buffered saline (pH 7.4) to a final concentration of 10%. These suspensions were vortexed and centrifuged at $600 \times g$ for 5 min. $140 \mu\text{l}$ of supernatant

was used for RNA extraction using the QIAamp viral RNA Mini Kit (Qiagen, Leusden, The Netherlands) according to the manufacturer's instructions and the rest of the supernatant was stored at 4°C .

2.4. Conventional RT-PCR

A one-step RT-PCR kit, the Access RT-PCR System (Promega, Leiden, The Netherlands), was used with broadly reactive primer pairs which were developed for the detection of noroviruses in stool specimens from humans or bovines (Table 1). They target the polymerase or capsid protein regions of human and/or bovine noroviruses [4,23,24]. Five μl of extracted RNA was mixed with $1 \mu\text{l}$ of $50 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ primer mix. The solution was heated at 95°C for 2 min, cooled, and $19 \mu\text{l}$ of RT-PCR reaction mixture was added. The RT-PCR reaction was performed in a final volume of $25 \mu\text{l}$, consisting of 0.25 mM MgSO_4 , 0.1 mM deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), 2.5 units of avian myeloblastoma virus (AMV) RT, 2.5 units of Tfl DNA polymerase from *Thermus flavus* and $5 \mu\text{l}$ of AMV/Tfl reaction buffer (Promega, Leiden, The Netherlands). The mixture was incubated for 45 min at 48°C for reverse transcription, followed by 2 min at 94°C for inactivation of AMV RT and denaturation of cDNA and primers. Then, 40 amplification cycles (30 s at 94°C , 1 min at the annealing temperature of the primer pair (Table 1), and 1 min at 68°C) were performed followed by a final extension step at 68°C for 7 min. The amplification products were analysed by 2% agarose gel electrophoresis and visualized with UV after ethidium bromide staining. The sizes of expected fragments are given in Table 1. All positive samples were confirmed by the sequencing of the RT-PCR products. To reduce the risk of contamination, a negative control sample was included every 18 samples. A confirmed positive human or bovine sample was included as positive control.

2.5. Real-time RT-PCR system

The real-time RT-PCR assays were carried out on the iCycler (Biorad, Nazareth, Belgium) using the iScript One-step RT-PCR kit for probes (Biorad, Nazareth, Belgium). Two μl of extracted RNA were added to $25 \mu\text{l}$ of master-mix with primers at 300 nM final concentration and probe at 150 nM final concentration.

In the first tube, a defined amount of the internal RNA control (see Section 3.1) was added with each sample of extracted RNA and primers and probe specific for the internal control (ICF, ICR and

Table 1
Primer sets and probes used in this study

Name	Sequence (5'–3')	Annealing temperature	Size	References
Norovirus internal RNA control set up				
uSA	GTATGGCAATTGTTTCA	46°C	491 bp	This study
ISA	ATCAGCATAAAATACGCTA			
JV12-uSA	ATACCACTATGATGCAGATTAGTATGGCAATTGTTTCA	48°C	534 bp	This study
JV13-ISA	TCATCATCACCATAGAAAGAGATCAGCATAAATATACGCTA			
Conventional RT-PCR detection of human and/or animal noroviruses				
JV12	ATACCACTATGATGCAGATTA	48°C	327 bp	[4]
JV13	TCATCATCACCATAGAAAGAG			
CBECU-F	AGTTAYTTTTCTTYTAYGGBA	55°C	532 bp	[23]
CBECU-R	AGTGTCTCTGTCAGTCATCTTCAT			
CCV3	GGCTTCCAGATTTTCTGATTG	60°C	407 bp	[24]
CCV4	GGCAGCTCGAAACAAAATG			
Taqman real-time RT-PCR				
ICF	GATACACCTGAAACAAAGCATCCTAAA	48°C	119 bp	This study
ICR	CCTTTGTCAAACCTCGACTTCAATTT			
ProbeIC	TTTTTCGTAATGCCTTGCTTCAGGACCA	120 bp		This study
SciS1	TGGGATTCAACACAACAAAGAGC			
SciR1	CACCACGCTAGGAGAAAGAAGG			
ProbeSci1	CTGCCACTACCTGAGCCAAATGTGGTTC			

ProbeIC) (Table 1). In the second tube, the TaqMan assay used the primers SciS1 and R1 and ProbeSci1 (Table 1) designed based on a norovirus strain detected in Belgium (H384) (Fig. 1). Defined dilutions of the RNA standard were tested in duplicate concomitantly with samples. The icycler RT-PCR protocol included the following parameters: reverse transcription for 13 min at 48 °C, 5 min at 95 °C, followed by 45 cycles of 10 s at 95 °C, 20 s at 48 °C and 20 s at 60 °C. To remove inhibition, bovine serum albumin (BSA) was added at a final concentration of 400 ng/μl in the RT-PCR mix or the extracted RNA was diluted 1/10.

2.6. Construction of the internal RNA control

Initially this internal control was designed to be used in conventional RT-PCR where it could be detected in the same tube with the same primer pair as noroviruses. To avoid competitive inhibition between the internal RNA control and the target viral genome, a part of the genome of *Staphylococcus aureus* was used as a foreign DNA source. Total genomic DNA of *S. aureus* was extracted and a 491 bp fragment of the *S. aureus* nuclease gene was amplified by PCR with primers uSA and ISA (Table 1). Amplified PCR products were directly cloned into a TA-cloning vector system (Promega, Leiden, The Netherlands) according to the manufacturer's instruction and the selected plasmid was then used as a template for the generation of a mutant PCR product. Primers JV12-uSA and JV13-ISA (Table 1) were used to graft the norovirus primers to the *S. aureus* fragment (Fig. 2A). Two and a half units of Taq DNA polymerase (Promega, Leiden, The Netherlands) was used with a 1 × PCR buffer (Promega), 0.1 mM dNTPs, 1.25 mM MgCl₂ and each oligonucleotide primer (final concentration of 1 μM) to make a final reaction volume of 50 μl. Thermocycling conditions were 95 °C for 5 min, followed by 40 amplification cycles, 30 s at 95 °C, 30 s at 61 °C and one minute at 72 °C, followed by a final extension step at 72 °C for 5 min. After cloning of the amplified PCR products (TA-cloning system, Promega, Leiden, The Netherlands), clone pInoSA was selected (Fig. 2) based on sequencing of the insert.

The linearised DNA clone pInoSA was used as the template for *in vitro* transcription by using the MEGAscript kit (Ambion, Huntingdon, United Kingdom) according to the instruction of the manufacturer. After overnight incubation at 37 °C, the DNA template was removed by digestion with DNase treatment with TURBO DNase-free™ kit (Ambion, Huntingdon, United-Kingdom). RNA was then purified with phenol:chloroform and the pellet was resuspended in nuclease-free water. After dilution, the concentrations were calculated by measuring the absorbance at 260 nm with a NanoDrop® ND1000 (NanoDrop Technologies). The RNA samples were stored at –80 °C until use.

2.7. Construction of the RNA standard for norovirus quantification

To quantify the level of norovirus contamination, the RNA standard was built using a positive human stool sample from our database, strain H384. The PCR product of 326 bp flanked by the primers JV12/JV13 [4] was directly cloned into the TA-cloning vector system (Promega, Leiden, The Netherlands) according to the instruction of the manufacturer. The clone StNoro (for standard norovirus) was confirmed to be in the correct orientation by restriction enzyme digestion of plasmids.

The linearised DNA clone StNoro was used as the template for *in vitro* transcription following exactly the same procedure as described for the internal control. RNA concentration determination and storage procedure have been previously described.

2.8. Statistical validation

Using the TaqMan assay, agreement of the viral load was established (repeatability, 53 duplicates and 5 triplicates, and reproducibility, 30 twice and 9 threefold) according to a method described by Petrie and Watson [25].

All the statistical analyses were carried out with Stata/SE [26]. The relative sensitivity and specificity were estimated with ninety-five percent confidence intervals assuming a binomial exact distribution. The limit of statistical significance of the conducted tests was defined as $P \leq 0.05$. The Kappa coefficient was calculated.

3. Results

3.1. Validation of the TaqMan RT-PCR assay for the control of inhibition

Following DNase treatment and RNA purification, the norovirus internal RNA control produced *in vitro* was detected by denaturing agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining (Fig. 2B). A classical PCR done to detect DNA contamination did not produce any detectable product from the undiluted RNA transcribed *in vitro*. The amount of the internal RNA control template obtained after *in vitro* transcription was 940 ng/μl.

The primers ICF and ICR (Table 1) were validated for their specificity, and failed to amplify noroviruses of the 3 genotypes, hepatitis A virus, rotavirus strains WA and RF75, and feline calicivirus. Linearity was obtained using a 10 fold dilution series of internal RNA control (from 10⁵ to 10¹¹ fold dilution, corresponding to 5.8 × 10⁷ to 5.8 × 10¹ genome copies respectively) (Fig. 3).

NC001959_GI	TGGGACTCAA	CACAAAATAG	ACAAATTATG	ACAGAACTCT	TCTCCATTAT	GTCGCGCCTT	ACGGCCTCAC	CAGAATTGGC	CGAGGTTGTG	GCCCAAGATT
U07611_GII	TGGGACTCAA	CACAGCAGAG	AGCCGTAATA	GCTGCAGCCC	TAGAGATCAT	GGTCAAATTC	TCCCCAGAGC	CACACTTGGC	CCAGGTAGTT	GCAGAAGACC
AF097917_GIII	TGGGACAGCA	CTCAACAGAG	AGAGATCATG	CGCCATAGCC	TTGATATCAT	GACCAAGCTT	ACTGCAGAGC	CTGAGCTCGC	CCGCGTTGTT	GCGGAAGACT
B309	TGGGACAGCA	CCCAGCAGAG	AGAGATCATG	CGCCAGAGCC	TTGATATCAT	GACCAAGCTC	ACTGCAGAGC	CTGAGCTCGC	CCGCGTTGTC	GCGGAGGACT
H384	TGGGATTCAA	CACAACAAAG	AGCCGTGTTG	GCAGCAGCCC	TAGAAATCAT	GGTTAAATTC	TCCTCAGAAC	CACATTTGGC	TCAGGTAGTC	GCAGAAGACC
SciS1	tgggattcaa	cacaacaag	agc							
Sci1							gaac	cacatttggc	tcaggtagtc	gcag
SciR1										cc
NC001959_GI	TGCTAGCACC	ATCTGAGATG								
U07611_GII	TTCTTTCCCC	CAGTGTGATG								
AF097917_GIII	TGCTTAAGCC	CTCACACCTT								
B309	TGCTGAAGCC	CTCGCACCTT								
H384	TTCTTTCTCC	TAGCGTGGTG								
SciS1										
Sci1										
SciR1	ttctttctcc	tagegtggtg								

Fig. 1. Nucleotide sequence alignment of 3 prototype strains of noroviruses (Norwalk, Hawaii and Newbury2) with their access number in GenBank, human norovirus strain H384 and bovine norovirus strain B309 (two strains detected in Belgium) and primers SciR1 and S1, and probe Sci1. The human strain H384 was used to design the primers and probe Sci1.

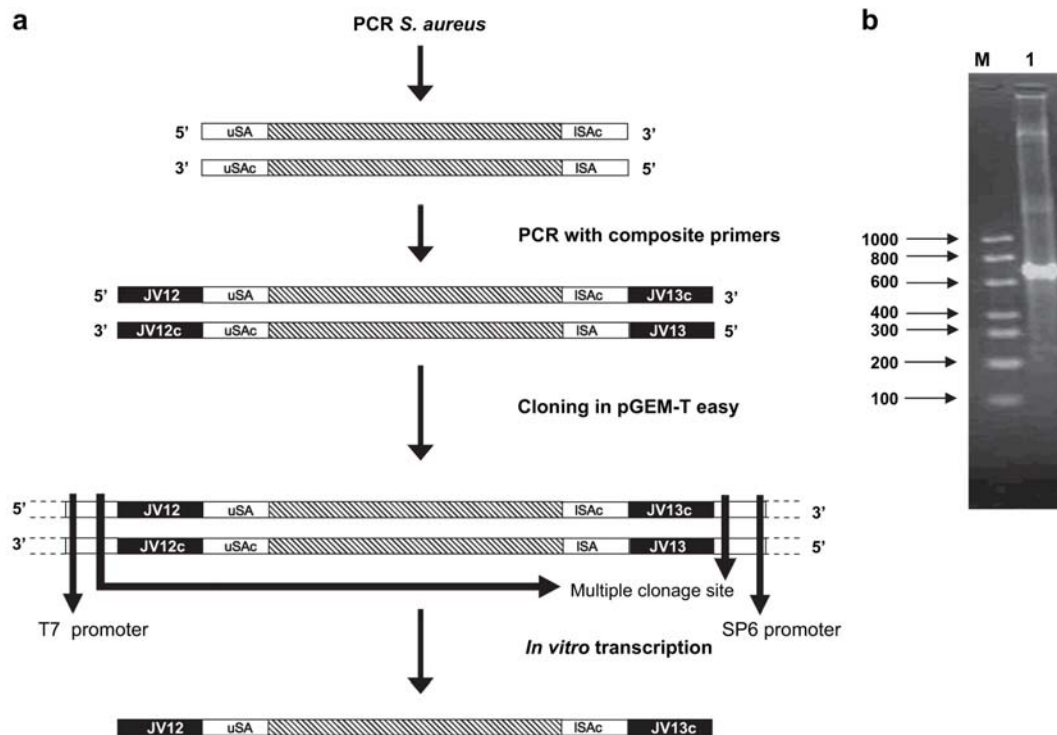


Fig. 2. Preparation of *in vitro*-transcribed RNA from *Staphylococcus aureus* containing norovirus primer sequences. (a) Schematic representation of synthesis steps showing position of oligonucleotide primer sequences. (b) Denaturing agarose gel electrophoresis of approximately 1 mg of *in vitro*-transcribed RNA (lane 1) with ethidium bromide staining. Lane M: RNA molecular size marker.

Serial dilution of the norovirus internal RNA control transcribed *in vitro* demonstrated that 2 μ l of the 10^{11} -fold dilution contained adequate template to produce a reliable signal in real-time RT-PCR. This corresponds to a quantity of 1.9×10^{-8} ng of internal RNA control or 58 copies.

3.2. Validation of TaqMan assay for detection and quantification of noroviruses

The standard RNA was diluted in a hundred-fold dilution series ranging from undiluted to 10^{-10} and tested by classical RT-PCR and with the real-time TaqMan assay. Dilutions 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} and 10^{-10} were kept at -80°C and were tested in duplicate in each run in the TaqMan real-time assay. Quantities used for each dilution corresponded to 2.1×10^3 , 2.1×10^5 , 2.1×10^7 to 2.1×10^9 copy numbers of single stranded RNA (Fig. 4).

This real-time RT-PCR met two important objectives: it detected positive samples and quantified the norovirus viral load. Newly designed primers and probes (SciF1, SciR1 and probeSci1 (Table 1)) were validated on human and bovine stool samples which had been previously confirmed positive by conventional RT-PCR and sequencing. The analysis of dilution series showed that the TaqMan assay has the capacity to detect a quantity 10–100 times lower than the conventional RT-PCR. The specificity of the assay was tested against human WA and bovine RF75 rotaviruses, feline calicivirus and hepatitis A virus. No cross reactivity was observed. Linearity was obtained with each run of sample, using the 100-fold dilution series of RNA standard (from 10^4 to 10^{10} fold dilution) (Fig. 4).

Most of the values obtained with the TaqMan assay are within the 95% limits of the agreement (mean of differences ± 1.96 S.D. of the differences) showing satisfactory agreement. For repeatability and reproducibility, the standard error of measurement was less

than 2.13 and 5.46 copies of norovirus RNA per reaction tube respectively (data not shown). The limit of detection of norovirus RNA was 52 copies per reaction tube (90% of positive replicates) using a cut-off Ct value of 40. This corresponds to at least to 7.8×10^4 copies of norovirus RNA per g of stool sample.

3.3. Analysis of human and bovine stool samples

This method was able to detect the most important genogroups of human noroviruses (genogroups I and II) and genogroup III containing the bovine noroviruses. A comparison of the results obtained by conventional RT-PCR with the TaqMan real-time assay is shown in Table 2.

The use of the internal control for norovirus real-time RT-PCR diagnosis in 86 stool samples identified inhibition of RT-PCR in 15.2% of stool samples tested in this study. Two different strategies to resolve inhibition were compared: addition of BSA or 1/10 dilution of the extracted RNA. They both gave similar results.

The quantification results for human and bovine positive stool samples are given in Table 3.

Considering TaqMan assay as the gold standard (Table 2), the relative sensitivity of conventional RT-PCR was 91% (95% confidence interval (CI) 80–97). The relative specificity was 100% (95% CI: 91–100). Confirming these results, Kappa values showed a high level of agreement between the conventional RT-PCR and TaqMan real-time RT-PCR (0.88).

4. Discussion and conclusions

In this study we developed a sensitive and broadly reactive TaqMan real-time RT-PCR assay which has the unique features of detection and quantification of human genogroups I and II and

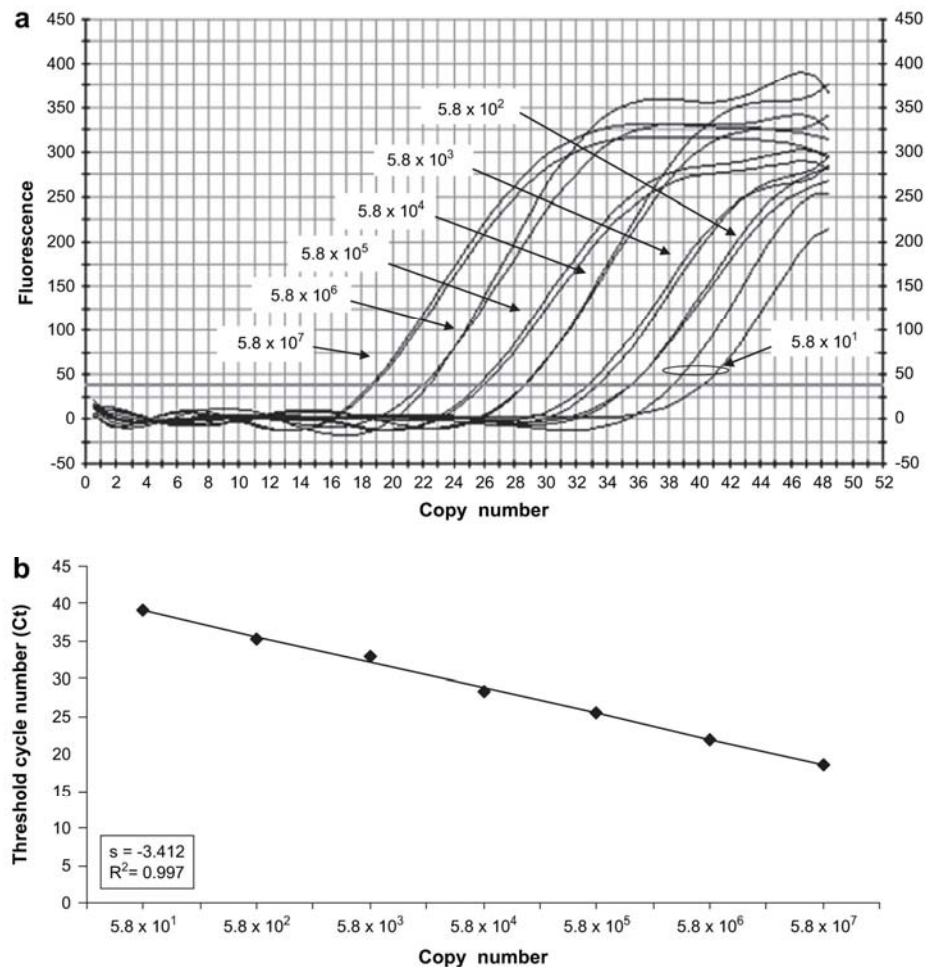


Fig. 3. (a) Detection of 10-fold serial dilution of the internal RNA control by the TaqMan assay performed in duplicate from 5.8×10^1 to 5.8×10^7 . (b) Standard curve of these dilutions, each dot representing the result of duplicate amplification of each dilution. The coefficient of determination (R^2) and the slope (s) of the regression curve are indicated.

bovine genogroup III noroviruses with the same set of primers and probe. Other advantages of this assay are its ability to detect inhibitors of PCR or RT-PCR that may be present in stool [15,16] and to estimate the viral load of norovirus in the sample. The method uses a one-step, hot start, RT-PCR with thermostable DNA polymerase. The one step protocol simplifies the method and reduces the risk of contamination of RNA; moreover it is useful for routine diagnosis as there is no post-amplification processing of the product.

The genetic diversity of noroviruses makes it difficult to select a pair of primers capable of detecting all the different norovirus genogroups. The primer pair SciS1 and R1 and probe Sci1 were designed based on the sequence of norovirus strain H384 (genogroup II), in a conserved region. When tested with other human and bovine norovirus strains, viruses belonging to genogroups I, II and III have been detected. Therefore, this assay has the rare advantage of detection of norovirus strains irrespectively of their origin (human or bovine). This method is the second described that allows the detection of both human and bovine noroviruses. Compared to the method recently published by Wolf and collaborators [27], our assay has the added advantages of detection of (RT)-PCR inhibitors, the use of only one set of primers and probe for the TaqMan assay to detect human and bovine noroviruses, and the ability to quantify the contamination level.

As norovirus cannot be grown in cell culture, real-time RT-PCR using a RNA standard is the only option to quantify the viral load. In this study, the majority of positive human samples contain from 10^7 to 10^{10} copies of norovirus per gram of stool sample as estimated by the TaqMan assay (Table 3). This value is higher than those previously estimated by electron microscopy (EM) [28]. This may be due to an underestimation in EM or because the TaqMan assay is also able to detect all viral genomes, even those unpackaged in the viral capsid, whereas EM only detects full viral particles. The estimated copy number of norovirus per gram of stool sample seems lower in bovine than in human stool samples. Two hypotheses are relevant to explain that observation. First, a lower specificity of the primers and probe to genogroup III norovirus could lead to a reduced signal in the TaqMan assay. Second, this may be a specific aspect of norovirus physiopathology in bovine causing a lower level of excretion in bovine than in human. There are no available data about the quantification of bovine norovirus excretion level in bovine species. Souza and collaborators [29] showed experimental infection of gnotobiotic calves with a human norovirus and yielded an average of 7.7×10^3 GE (genome equivalent)/ml to 2×10^5 GE/ml in stool samples. Our observations with bovine noroviruses, keeping in mind that these data were obtained with another genogroup of noroviruses, are 10 times higher, from

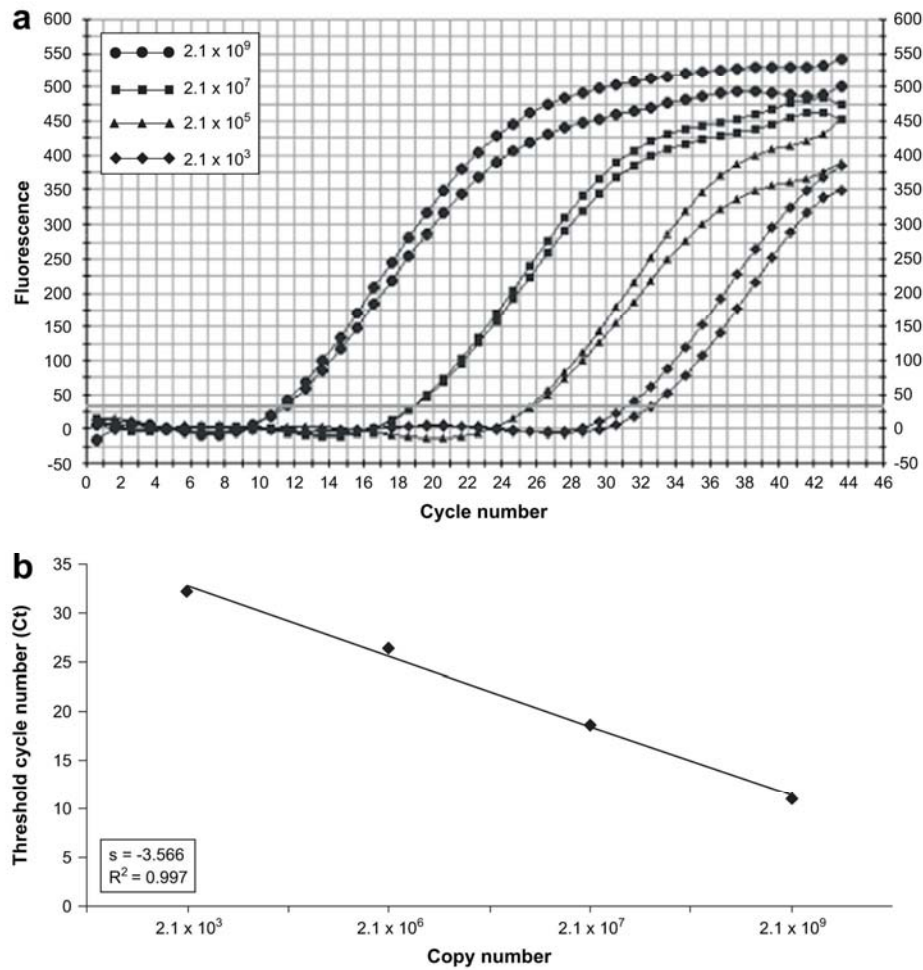


Fig. 4. TaqMan assay with the quantification RNA standard. (a) Amplification of 2.1×10^2 , 2.1×10^4 , 2.1×10^6 , 2.1×10^8 copies of RNA standard used in parallel with each TaqMan assay. (b) Relationship between copy numbers of RNA standard, on a log10 scale, and the threshold cycle. The coefficient of determination (R^2) and the slope (s) of the regression curve are indicated.

10^4 to 10^6 genome copies/gram of stool sample. However, in both studies, at low copy numbers, quantification is less reliable, so they only represent an estimation of the excretion level.

A common problem with RT-PCR is the presence of (RT)-PCR inhibitors which may cause false negative results. Therefore, to avoid such false negative results, an internal control was set up to be used in another tube with the norovirus assay. It was synthesized *in vitro* using a foreign DNA template in order to decrease interference with norovirus amplicons [30,31]. Indeed, in another study this was very interesting because the detection was done with the same primer pair (JV12–JV13) in the same tube (data not shown). It has the advantage of representing no risk for human or animal health because it does not contain any infectious material. With this internal RNA control, inhibitors of RT-PCR can effectively be identified in samples which could be responsible for false-negative results. This improvement is crucial for early intervention and control of norovirus outbreaks.

With routine diagnostic samples tested, 15.8% of human and 13.8% of bovine samples showed presence of inhibitors. Their occurrence can vary markedly among samples and may depend on the type of sample but also on the intrinsic characteristic of sample (for example, herbivorous or omnivorous diet). When inhibition

was detected in the samples used in this study, a 1/10 dilution of the extracted RNA or addition of BSA in the RT-PCR mix were tested and compared. Sample dilution is often effective as the inhibitory factors can be diluted out, however, the target nucleic acid must be in sufficient quantities in order to be detected after dilution. BSA does not have this disadvantage [32].

Out of the samples tested, the TaqMan assay showed a higher sensitivity compared to the conventional RT-PCR. In fact, five bovine samples were only detected with the TaqMan assay and were confirmed by sequencing.

In conclusion, the new serial real-time assay described in this study is an accurate, sensitive, specific and rapid method for the

Table 2
Comparison of the detection of human and bovine noroviruses by the TaqMan real-time RT-PCR and the conventional RT-PCR assay

		TaqMan assay		TOTAL
		+	-	
Conventional RT-PCR	+	50	0	50
	-	5	31	36
TOTAL		55	31	86

Table 3
Quantification results of human and bovine Norovirus positive samples analysed using the TaqMan real-time assay

	Name	Year of detection	Quantification (genome copies/g feces)	
Human	GI	H501	2003	1.51×10^6
		GII	H523	2003
	ISP55		2006	1.03×10^5
	UCL6		2006	1.04×10^5
	H425		2002	1.37×10^5
	H325		2002	2.10×10^5
	H217		2002	2.29×10^6
	H252		2002	2.91×10^6
	H7		2002	3.39×10^6
	H472		2002	8.23×10^6
	ISP58		2006	1.14×10^7
	H366		2002	1.27×10^7
	H329		2002	3.30×10^7
	ISP57		2006	3.42×10^7
	ISP477		2007	4.75×10^7
	UCL1		2007	5.61×10^7
	ISP56		2006	6.29×10^7
	H496		2003	6.46×10^7
	CrH1		2006	6.74×10^7
	H492		2003	9.84×10^7
	H556		2003	1.26×10^7
	H494		2003	1.39×10^8
	H514		2003	2.60×10^8
	H497		2003	2.62×10^8
	ISP59		2006	8.03×10^8
	H302		2002	1.60×10^9
	UCL3		2007	1.76×10^9
	UCL2		2007	2.72×10^9
	H367		2002	3.42×10^9
	CrH3		2006	3.81×10^9
	CrH2		2006	7.36×10^9
	ISP472		2007	8.00×10^9
	H361		2002	1.25×10^{10}
	ISP473		2007	1.53×10^{10}
	UCL4		2006	2.35×10^{10}
	ISP474		2007	4.15×10^{10}
H11	2002	5.69×10^{10}		
ISP475	2007	6.54×10^{10}		
H10	2002	9.02×10^{10}		
H493	2003	3.92×10^{11}		
H384	2002	3.56×10^{15}		
Bovine	GIII	B200	2003	7.06×10^4
		B214	2003	8.20×10^4
		B309	2003	1.08×10^5
		B305	2003	1.64×10^5
		B250	2003	1.90×10^5
		B52 b	2002	3.99×10^5
		B123	2002	4.95×10^5
		B307	2003	5.98×10^5
		B37	2002	1.08×10^6
		B143	2002	1.83×10^6
		B242	2003	2.88×10^6
		B128	2002	3.00×10^6
		B102	2002	4.35×10^6
		B199	2003	5.95×10^6

detection of a wide range of noroviruses belonging to genogroups I, II and III. This real-time assay offers a method to detect samples containing inhibitors and avoiding false negative results by using an internal control. This assay will be applicable for clinical diagnosis in human and animal laboratories, for detection of viruses in food or environmental samples, or as a research tool to better understand the pathogenesis of norovirus. This TaqMan real-time assay uses a single primer pair and a single probe capable of detecting and quantifying human and bovine noroviruses simultaneously. For special applications, specific probes for human and bovine noroviruses could be an interesting improvement. Nevertheless classification and study of transmission routes of noroviruses require sequencing in addition to detection. Moreover

bovine noroviruses have already been detected in the food chain in a bivalve mollusc sample which was contaminated with human noroviruses [33]. This increases the risk of crossing the species barrier and the emergence of recombinant viruses and points out a real need to detect not only human but also bovine (and other animal) noroviruses.

Acknowledgements

This work was supported in part by SPF "Santé publique, Sécurité de la Chaîne alimentaire et Environnement" (RF6185), by Belgian Science Policy – Science for a Sustainable Development (SSD) (SD/AF/01), by the "Région Wallonne" (415701) and the University of Liège.

The authors thank Miss Pascaline Peeters for technical assistance during her practice training period and the staff of the Virology Laboratory for technical assistance. We thank especially Dr Geneviève Christiaens, Dr Patrick Goubau, Katelijne Dierick and Nadine Botteldoorn for their kind assistance and efficacy to collect samples. We thank Drs Czaplicki, Lomba (Association Régionale de Santé et d'Identification Animale), Goubau (Virology, St Luc University Hospital, Catholic University of Louvain) and De Mol (Microbiology, Faculty of Medicine, University of Liège) for their assistance in the collection of animal and human samples respectively.

We are very grateful to Jennifer Cannon for her careful reading of the manuscript.

References

- [1] Kapikian AZ. The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective. *J Infect Dis* 2000;181(Suppl 2):S295–302.
- [2] Verbeelen V, Bodeus M, Garrino MG, Scipioni A, Kabamba B, Daube G, et al. Hospital outbreak of gastroenteritis due to Norovirus in Belgium. *Acta Clin Belg* 2004;59:30–3.
- [3] Vinje J, Altena SA, Koopmans MP. The incidence and genetic variability of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *J Infect Dis* 1997;176:1374–8.
- [4] Vinje J, Koopmans MP. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J Infect Dis* 1996;174:610–5.
- [5] Green KY. The role of human caliciviruses in epidemic gastroenteritis. *Arch Virol Suppl* 1997;13:153–65.
- [6] Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, et al. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999;5:607–25.
- [7] Scipioni A, Mauroy A, Thiry E. Animal noroviruses. *Vet J* 2008;. doi:10.1016/j.tvjl.2007.11.012.
- [8] Sugieda M, Nagaoka H, Kakishima Y, Ohshita T, Nakamura S, Nakajima S. Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *Arch Virol* 1998;143:1215–21.
- [9] Woode GN, Bridger JC. Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. *J Med Microbiol* 1978;11:441–52.
- [10] Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, Atmar RL, Koopmans MP, Estes MK. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J Gen Virol* 2004;85:79–87.
- [11] Straub TM, Honer zu Bentrup K, Orosz-Coghlan P, Dohnalkova A, Mayer BK, Bartholomew RA, et al. In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerg Infect Dis* 2007;13:396–403.
- [12] Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* 1993;195:51–61.
- [13] Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN. Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science* 1993;259:516–9.
- [14] Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:15–37.
- [15] Atmar RL, Neill FH, Romalde JL, Le Guyader F, Woodley CM, Metcalf TG, et al. Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:3014–8.
- [16] De Leon R, Matsui SM, Baric RS, Herrmann JE, Blacklow NR, Greenberg HB, et al. Detection of Norwalk virus in stool specimens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nonradioactive oligoprobes. *J Clin Microbiol* 1992;30(12):3151–7.
- [17] Le Guyader F, Neill FH, Estes MK, Monroe SS, Ando T, Atmar RL. Detection and analysis of a small round-structured virus strain in oysters implicated in an outbreak of acute gastroenteritis. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:4268–72.
- [18] Schwab KJ, Neill FH, Fankhauser RL, Daniels NA, Monroe SS, Bergmire-Sweat DA, et al. Development of methods to detect "Norwalk-like viruses"

- (NLVs) and hepatitis A virus in delicatessen foods: application to a food-borne NLV outbreak. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:213–8.
- [19] Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, et al. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol* 1997;35(4):995–8.
- [20] Lantz P-G, Matsson M, Wadstrom T, Radstrom P. Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR. *J Microbiol Methods* 1997;28(3):159–67.
- [21] Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 1997;63(10):3741–51.
- [22] Kleiboeker SB. Applications of competitor RNA in diagnostic reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2003;41(5):2055–61.
- [23] Smiley JR, Hoet AE, Traven M, Tsunemitsu H, Saif LJ. Reverse transcription-PCR assays for detection of bovine enteric caliciviruses (BEC) and analysis of the genetic relationships among BEC and human caliciviruses. *J Clin Microbiol* 2003;41:3089–99.
- [24] van der Poel WH, van der Heide H, Verschoor F, Gelderblom H, Vinje J, Koopmans MP. Epidemiology of Norwalk-like virus infections in cattle in The Netherlands. *Vet Microbiol* 2003;92:297–309.
- [25] Petrie A, Watson P. Additional techniques. In: *Statistics for veterinary and animal science*. Edinburgh: Blackwell Science; 2006. p. 191–211.
- [26] StataCorp. *Stata Statistical Software*. College Station, TX: Stata Corporation; 2003.
- [27] Wolf S, Williamson WM, Hewitt J, Rivera-Aban M, Lin S, Ball A, et al. Sensitive multiplex real-time reverse transcription-PCR assay for the detection of human and animal noroviruses in clinical and environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 2007;73(17):5464–70.
- [28] Kapikian AZ, Chanock RM. Norwalk group viruses. In: Fields BN, Knipe DM, Chanock RM, Hirsch MS, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, editors. *Virology*. New-York: Norwalk group viruses; 1990. p. 671–93.
- [29] Souza M, Azevedo MS, Jung K, Cheetham S, Saif LJ. Pathogenesis and immune responses in gnotobiotic calves after infection with human norovirus (HuNoV) genogroup II.4-HS66 strain. *J Virol* 2007;82:1777–86.
- [30] Kim K, Park J, Chung Y, Cheon D, Lee IB, Lee S, et al. Use of internal standard RNA molecules for the RT-PCR amplification of the faeces-borne RNA viruses. *J Virol Methods* 2002;104:107–15.
- [31] Schwab KJ, Estes MK, Neill FH, Atmar RL. Use of heat release and an internal RNA standard control in reverse transcription-PCR detection of Norwalk virus from stool samples. *J Clin Microbiol* 1997;35:511–4.
- [32] Trujillo AA, McCaustland KA, Zheng DP, Hadley LA, Vaughn G, Adams SM, et al. Use of TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus. *J Clin Microbiol* 2006;44(4):1405–12.
- [33] 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(3):1800–9.

2. Norovirus bovins et humains en Belgique

2.1 Préambule

Les NoV sont une cause majeure d'épidémies de gastroentérites non-bactérienne et sont impliqués dans de nombreuses épidémies d'origine alimentaire. Au départ, leur spectre d'hôte semblait limité à l'homme, mais des virus proches furent détectés dans les espèces porcine et bovine et plus récemment chez un félin, des ovins et un chien, alimentant la discussion concernant une éventuelle transmission zoonotique. Afin d'investiguer la situation au niveau belge, des échantillons de matières fécales humaines et bovines furent testés par RT-PCR. Des NoV appartenant à différents génotypes des GI et GII chez l'homme, et du GIII furent détectés chez les bovins. Les analyses génotypiques permirent l'identification d'une co-infection et de deux recombinaisons naturels, tous révélant une classification différente par l'analyse de proximité génétique basée sur le gène de la polymérase et celle basée sur le gène de la protéine de capsid. Afin d'étudier l'évolution des NoV, le séquençage complet de la souche bovine Bo/B309/2003/BE a été réalisé et comparé à la souche originale Newbury2 (découverte dans les années '80) ainsi qu'à des séquences partielles de NoV bovins détectés en 2007 en Belgique.

Les résultats de cette étude appuient l'hypothèse que les NoV bovins constituent un groupe distinct de virus dans le genre *Norovirus* et ne semblent pas représenter un risque pour la santé humaine.

Detection of contemporaneous human and bovine noroviruses in Belgium

Submitted for publication

Alexandra Scipioni¹, Axel Mauroy¹, Elisabeth Mathijs^{1,2}, Dominique Ziant¹, Georges Daube² and Etienne Thiry¹

¹ *Department of Infectious and Parasitic Diseases, Virology and Animal Viral Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, 20 Boulevard de Colonster B43b, 4000 Liège, Belgium*

² *Department of Food Sciences, Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, 20 Boulevard de Colonster B43b, 4000 Liège, Belgium*

ABSTRACT

Noroviruses are a major cause of acute nonbacterial gastroenteritis in humans and have been involved in numerous foodborne outbreaks. They had been thought to be limited to humans but closely related viruses were detected in stool samples from cattle and pigs and recently in feline, canine and ovine species, sparking discussions about the potential for zoonotic transmission of these viruses. In order to investigate the situation in Belgium, stool samples from contemporaneous cattle and humans were screened by RT-PCR. Noroviruses were detected, belonging to different genotypes in the genogroups I and II in human, and genogroup III in bovine. Phylogenetic analyses allowed the identification of one co-infection and two recombinants. The bovine strain Bo/B309/2003/BE was fully sequenced and compared to the original Newbury2 strain (1980s) and a strain detected in 2007 in Belgium. The results of this study support the hypothesis that bovine noroviruses still constitute a different lineage in the genus *Norovirus* and currently do not seem to pose any risk to public health.

Nucleotide sequence data reported are available in the GenBank database under the accession numbers AY375537 to AY375540, AY375542 to AY375547, AY678466 to AY678476, AY686479 to AY686497, AY766301, EU794857 to EU794884, EU794887 to EU794898, EU794901 to EU794903, EU794905 to EU794907 and FJ409625.

INTRODUCTION

Noroviruses (NoVs) belong to the family *Caliciviridae* (Mayo, 2002). They have emerged as a common cause of infectious gastroenteritis in all age groups in humans, especially in restaurants and institutions such as nursing homes and hospitals (Lopman, Brown, and Koopmans, 2002; Tsang et al., 2008; Verbelen et al., 2004) and are the main cause of foodborne gastroenteritis (Widdowson et al., 2005). In the 1980s and the 1990s they were described in bovine and porcine species, respectively (Bridger, Hall, and Brown, 1984; Dastjerdi et al., 1999; Liu et al., 1999; Sugieda et al., 1998). These findings raise important questions about the host range of NoVs, moreover, they were recently identified in feline, canine and ovine species (Martella et al., 2007; Martella et al., 2008; Wolf et al., 2009).

Genetically, the genus *Norovirus* is divided into genetic clusters called genogroups (G). Up to date, at least five genogroups are described: GI and GII involving the majority of human viruses; GIII, the bovine NoVs; GIV, at least two human NoVs (strains Alphatron and Fort Lauderdale) and GV, the murine NoVs (Hutson, Atmar, and Estes, 2004). The porcine NoVs fall within the GII (Sugieda and Nakajima, 2002), feline and canine NoVs within the GIV (Martella et al., 2007; Martella et al., 2008) and ovine within GIII (Wolf et al., 2009). Each of these genogroups comprises genetically and antigenically diverse strains. A recent study indicates that NoV GI and GII include at least 8 and 17 genotypes respectively based on the entire capsid gene sequences (Zheng et al., 2006).

Some NoV genotypes cocirculate predominantly in the general population, causing sporadic cases and outbreaks. RNA viruses evolve rapidly due to

antigenic drift, immune pressure or recombination, a phenomenon already described in the genus *Norovirus* (Bull, Tanaka, and White, 2007). The Hypothetical mechanisms behind the periodic emergence of epidemic strains range from a large-scale person to person (eventually foodborne) transmission of a single “new” strain to an introduction from a non-human reservoir. The later hypothesis can be substantiated by the detection of partial human NoV sequences in stool samples from cattle and pigs in Canada (Mattison et al., 2007). The accumulation of NoV nucleotide sequences is therefore crucial to study the phylogenetic and molecular relationships of animal and human NoVs. Moreover, hypothetical recombinant strains could be detected through a divergent clustering by analyzing different part of the NoV genome.

A major problem with human and bovine NoVs is that they cannot be grown easily in cell culture (Straub et al., 2007). The use of RT-PCR has allowed the detection of NoVs in clinical specimens (feces and vomit) and contaminated food, water or sewage (Johansen et al., 2008; Le Guyader et al., 2004). Real-time RT-PCR assays were also developed to detect a broad range of NoVs (Scipioni et al., 2008a; Scipioni et al., 2008c).

Two prototypes of the GIII NoVs, the Jena and Newbury2 viruses, were detected in feces from newborn calves with diarrhea in Germany and United Kingdom, respectively (Dastjerdi et al., 1999; Dastjerdi, Snodgrass, and Bridger, 2000; Liu et al., 1999). Although bovine NoVs appear to form a genetically distinct stable lineage, they are close enough to human NoVs to suggest possible interspecies transmission in specific conditions (Scipioni et al., 2008b).

The aim of this work was to detect and to genetically characterize NoVs in fecal samples

from both contemporaneous humans and cattle using RT-PCR assays with different sets of primers. Sequences from different regions of the NoV genome were determined to investigate the genetic variation of these strains and to allow comparison with prototype strains of the different NoV genogroups and genotypes. Moreover, the complete sequence of a bovine NoV strain was determined to study the evolution of this virus since the 1980s.

MATERIALS AND METHODS

Fecal specimens

Stool specimens from cattle were collected by the regional animal diagnostic laboratories of “ARSIA” (Association Régionale de Santé et d’Identification Animales), in Belgium over a two year period (2002 – 2003), samples of all age groups from cattle were collected (317 samples) and two samples detected in 2007 were added. In the same period, 603 human samples were collected from the medical microbiology and virology service of the University hospital of Liege, Sart-Tilman. Other human samples from outbreaks were provided by the Institute for Public Health in Brussels and the Virology Laboratory of the St Luc University hospital for the period 2006-2007. They were all stored at 4°C before analysis and then at -80°C.

Molecular detection of NoVs by RT-PCR

The whole procedure had already been described previously (Scipioni et al., 2008a). Briefly 10% suspensions of stool sample in phosphate-buffered saline were centrifuged. The supernatant was used for RNA extraction with the QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen, Leusden, The Netherlands). RT-PCR was conducted with the Access RT-PCR system kit (Promega, Leiden, The Netherlands), with primers shown in Table 1.

RT-PCR for long fragments

All long fragments were obtained using a separate RT protocol with the SuperscriptIII reverse transcriptase (Invitrogen, Merelbeke, Belgium) following the instructions of the manufacturer and a consecutive PCR with different High fidelity polymerases: Phusion (Westburg, Leusden, The Netherlands), iProof (Biorad, Nazareth, Belgium) or Platinum (Invitrogen, Merelbeke, Belgium) following the instructions of the manufacturer. They were obtained combining a forward primer located in the polymerase region and a reverse primer in the capsid coding region. To obtain the 3’end part of the genome (around 3,500 nucleotides), the strategy described by Dingle and collaborators was used, with a TVN-linker primer to do the reverse transcription (Dingle, 2004).

Sequencing and molecular analyses

The short RT-PCR products of expected size (Table 1) were excised from 2% agarose gel and purified using a Qiaquick gel extraction kit (Qiagen, Leusden, The Netherlands) following instructions of the manufacturer. Purified RT-PCR products were sequenced in both directions with the same primers as for RT-PCR, using an automated sequencer (Megabase autosequencer) or in GIGA facilities, to confirm the result and avoid false positive result due to aspecific amplification. For long fragments, cloning in Topo zero blunt (Invitrogen, Merelbeke, Belgium) with Top10 bacteria was done, following instructions of the manufacturer, and at least three clones were sequenced. The consensus sequence was determined.

Table 1: Primer pairs used to detect NoVs in human and bovine stool samples

Name	Sequence	Annealing temperature	Size of amplicons	References
JV12	ATACCACTATGATGCAGATTA	50°C	327 bp	(Vinje and Koopmans, 1996)
JV13	TCATCATCACCATAGAAAGAG			
CNV GIF	GATGATGGCGTCTAAGGACG	55°C	312 bp	This study
CNV GIR	CCAACCCARCCATTRTACAT			
CNV GIIF	ATGAAGATGGCGTCGAATGACG	55°C	305 bp	This study
CNV GIIR	CCWCCWGCATAHCCATTRTACAT			
CCV3	GGCTTTCCAGATTTTTCCGATTG	60°C	387 bp	(van der Poel et al., 2003)
CCV4	GGCAGCTCGGAAACAAAATG			
CBECU-F	AGTTAYTTTTCCTTYTAYGGBGA	50°C	532 bp	(Smiley et al., 2003)
CBECU-R	AGTGTCTCTGTCAGTCATCTTCAT			

Figure 2

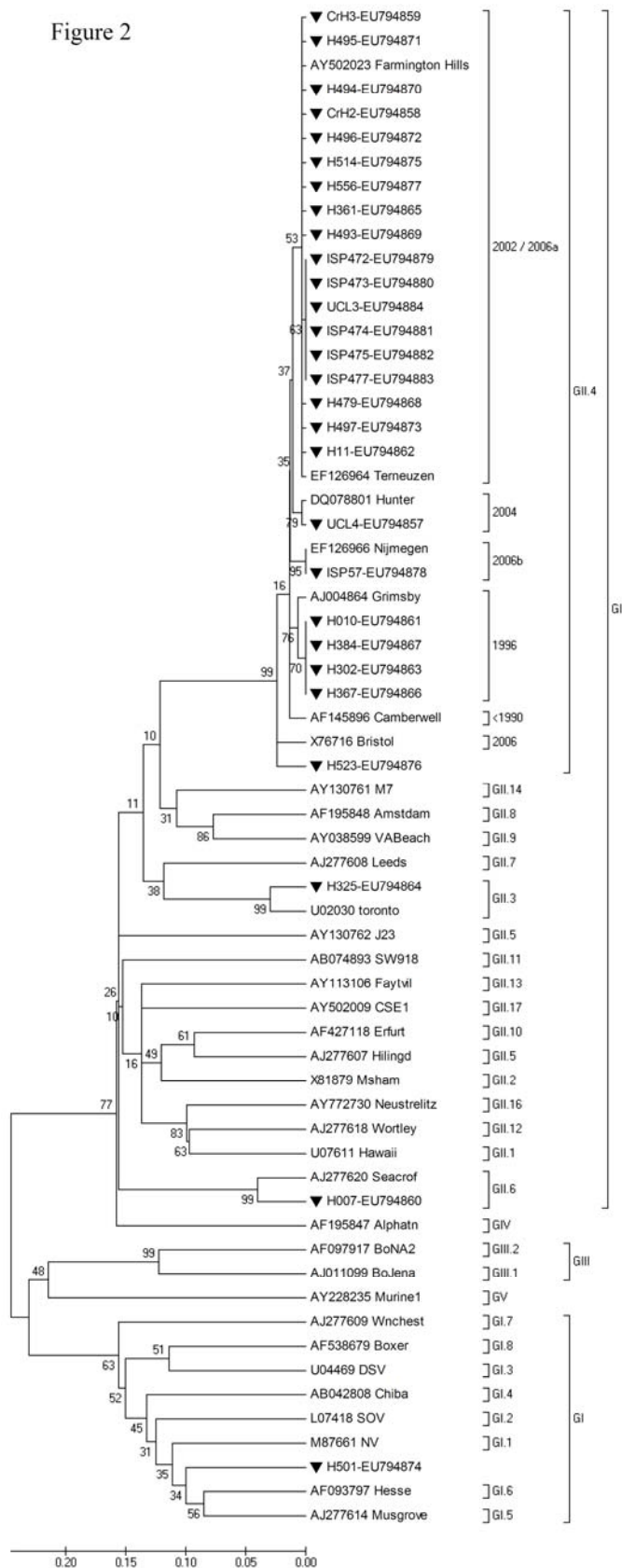


Fig. 2: Phylogenetic analysis of human norovirus strains detected in Belgium (capsid region). The dendrogram was generated by neighbor joining using MEGA program after multiple alignments with ClustalW for 199 bp of the partial capsid sequences obtained after amplification with CNV GI and II primer pairs. It shows genetic relationships between the Belgian human sequences (named H followed by a number; ▼, strains from this work) and data available from Genbank database (accession number given) for representative members of human and animal *Norovirus* genus.

sequences. Partial NoV sequences belonging to GI.2, GI.5, GII.2, GII.3, GII.4 (1996-2002-2004-2006-2006a-2006b), GII.6, GII.b were detected. The predominance of GII.4 NoVs was noticed since 88.6% (31/35) of positive samples contained this genotype. The strains identified in this study belong to different sub-genotypes and clusters that were co-circulating in 2002-2003 and 2006.

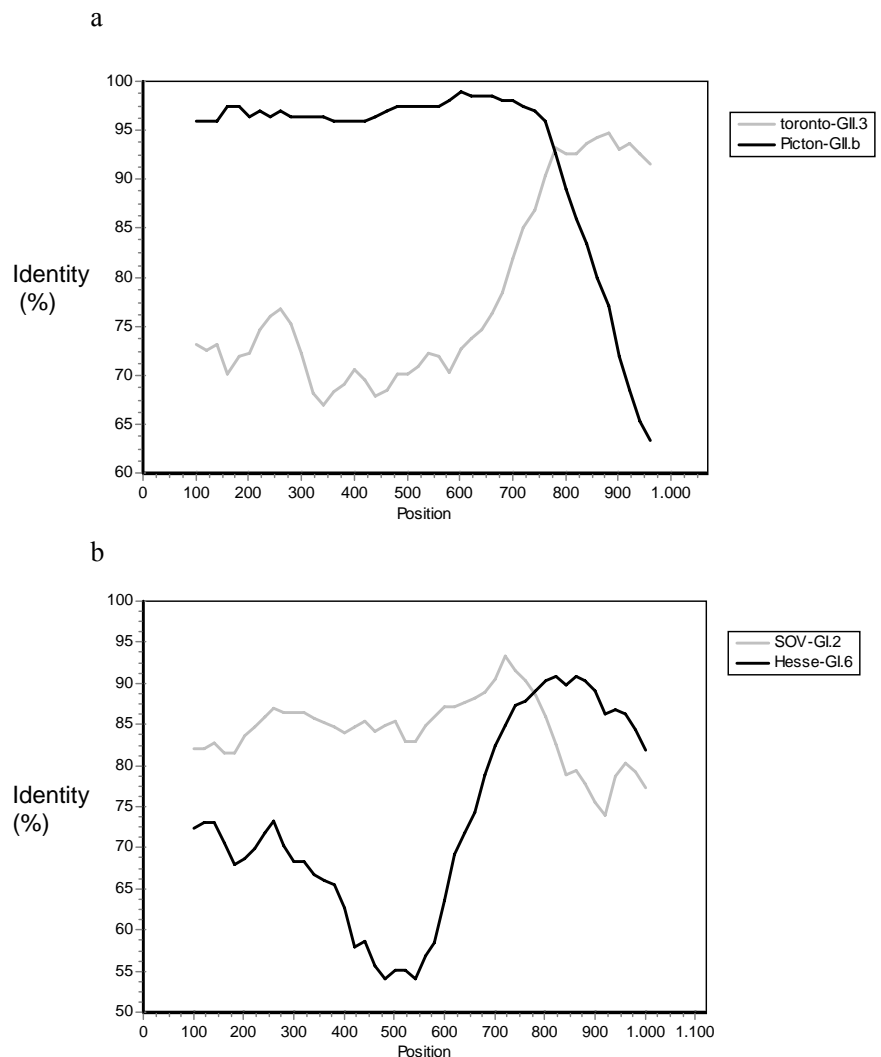
Some strains showed a different genotyping depending on the investigated part of the genome (Table 2). The sequencing of a 1.1 kb product beginning in the polymerase coding region and ending in the capsid coding region (covering the recombination hot spot identified in NoVs (Bull et al., 2005)) revealed that H007 is in fact a co-infection of a GII.2 and a GII.6 NoVs. Strains H325 and H501 are natural recombinants, closely related to the previously described ones: the French strain VannesL169 (access in GenBank AY773210) for H325 and the Japanese strain Hiroshima 48 (access in GenBank AB354289) for H501. A Simplot analysis identified the recombination event between GII.3 (in the polymerase region) and GII.b (in the capsid region) for sample H325 (Fig. 3(a)) and between the GI.2 (in the polymerase region) and the GI.8 (in the capsid region) NoVs for sample H501 (Fig. 3(b)). For both viruses, the recombination point is located at the junction of the ORF1/ORF2.

Bovine noroviruses Six samples from cattle showed RT-PCR products of the expected size using JV12-JV13 primers, eight using CBECUF-R primers and ten using CCV3-CCV4 primers (Table 1). In 2007, two bovine strains, named BV15 and BV24, were detected and a 3 kb product including the 3' end of their genome was sequenced.

Phylogenetic studies using partial RNA polymerase (Fig. 4(a)) and partial capsid (Fig. 4(b)) coding regions showed that the detected bovine NoVs are distinct from representatives of GI and GII NoV and also from NoVs associated with Belgian clinical cases at the different years of sampling. They all are closely related and cluster in the GIII. No evidence of recombination was identified in bovine NoVs.

Fig. 3: Similarity plot of 1.1 kb sequences starting in the RNA polymerase gene and ending in the capsid gene of NoV GI and GII recombinants. The vertical axis indicates the nucleotide sequence identities between the query strain and the two putative parental reference strains (black and grey lines), expressed as a percentage. The horizontal axis indicates the nucleotide positions and the vertical line indicates the beginning of the ORF2. The window size was 200 bp with a step of 20 bp. (a) The query sequence is H325. (b) The query sequence is H501

Figure 3



Sequence identity on amino acid between these strains and Newbury2 agent are in a range from 95.9% to 99.6%. This classified them, following Zheng criteria (Zheng et al., 2006), in the same cluster despite that a variability similar to the one observed for human NoVs is expected.

The highest identities between bovine and human NoVs were observed in the polymerase gene sequences, but identities between the bovine GIII and GI and II NoVs were comparable to those seen between human GI and II NoVs.

Full sequence of the bovine NoV strain B309

The bovine strain B309 was fully sequenced and analyzed. BLAST analyses showed its proximity with the Newbury2 agent (89.7% identity). Looking at the amino acid sequence of the capsid (ORF2), aligned with the two prototype strains of the GIII NoVs, strain B309 has 89.4% nucleotide and 98.4% amino acid identity with the Newbury2 strain, 63.6% nucleotide and 69.2% amino acid identity with the Jena strain.

The genome organization of B309 strain is similar to that of the UK reference strain Newbury2, showing the same differences and similarities to Jena virus (Oliver et al., 2003). Alignment of the capsid sequences (Fig. 5) showed the presence of the LAGNA motif in the S domain of the capsid protein, as for the other members of the genus *Norovirus*. This motif is absent in the *Vesivirus*, *Lagovirus* and *Sapovirus* genera (Oliver et al., 2003). Modifications of amino acids are in the P

domain of the capsid, only one is located in the S domain for the BV15 strain.

For the evolutionary aspect of bovine strains, the strains detected in 2002-2003 and also in 2007 were compared together and with the original Newbury2 agent. The amino acid sequence similarities of the entire capsid protein between the Newbury2 (1980s) and the B309 (year 2003) strains or the BV15 (year 2007) were calculated and are of 98.4% and 96% respectively.

DISCUSSION

Contemporaneous human and bovine NoVs were detected in Belgium and their clustering following genetic sequences showed that human NoVs cluster with GI and GII representatives, while bovine NoVs cluster with the GIII. These results are in favor of a NoV species specificity rather than a zoonotic transmission or an animal reservoir. The identification of recombinant strains evidences the natural phenomenon of

	NoV genogroup	Belgian strain	Prototype strain	Genotype based on	
				Polymerase	Capsid
Recombinants	I	H501	Hiroshima 48	GI.2	GI.6
	II	H325	Vannes L169	GII.b	GII.3
Co-infection	II	H007	Melksham-GII.2 Seacrof-GII.6	GII.2	GII.6

Table 2: Recombinant strains and co-infection

recombination in the genus *Norovirus*. The complete sequencing of the bovine strain B309 showed that bovine NoVs revealed only limited evolution compared to the other genogroups GI and GII (Lindesmith et al., 2008). The complete nucleotide sequence of B309 aligned with the Newbury2 strain exhibited 89.7% identity; divergence in nucleotide and amino acid sequences based on the capsid region (ORF2) is of 10.6% and 1.6 % respectively, in an interval longer than 20 years.

Fifteen and thirty five samples were confirmed positive by sequencing for bovine and human NoV respectively. The NoV prevalences were not calculated because of the lack of data (no access to the confidential data). Nevertheless, historically this is the first identification of NoV in human (January 2002) and bovine (April 2002) species in Belgium.

The choice of primer pairs used in this study was at first deliberately a primer pair designed to detect human NoVs (JV12-JV13 – Table 1), with the objective to find, in bovines, caliciviruses closely related to human NoVs. Additional primer pairs were used to increase the chance of bovine NoV detection. They were also chosen to obtain sequences located in different regions of the NoV genome (polymerase and capsid coding region) in order to identify recombinant strains (Bull et al., 2005). All primer pairs used were not able to give a product for each positive sample. This might be due to the genetic diversity of these viruses. Some aspecific amplifications were also noticed.

In humans, NoVs were detected in very young or elderly persons, who are more susceptible to infection and for whom consequences can be more severe, leading to hospitalization (data not shown). The genotype II.4 is recognized as the human predominant genotype worldwide (Buesa et al., 2008; Kageyama et al., 2004; Lopman et al., 2004), and data from this study go in the same way with 88.6% of GII.4 among the human detected

NoV strains. The capsid-based genotype assignment of the GII.4 strains was consistent with that based on the partial RNA polymerase sequences. The predominant GII.4 variants are related to the 2002 Farmington Hill and the 2006 Terneuzen strains; this result is in agreement with the year of detection. “Old” strains were still circulating in 2002 and 2003, close to 1996 strains (Valencia and Grimsby). The reason why

predominant strains are occasionally replaced by emerging ones is unknown. However, it can be suspected that the new ones might be more virulent or more environmentally stable than the previous ones, or are able to escape the immune response by a different phenotype of the capsid (due to point mutations or recombination).

Two **natural recombinants** were detected, one intra-genogroup GI, one intra-genogroup GII. The majority of the previously identified recombinants show a recombination hot spot located at the junction of the ORF1 and 2 (Bull et al., 2005), which could correspond to the observed results in this study (Fig. 3). A multiple infection was detected in another sample, H007, and several clones were sequenced. Indeed, recombination could occur with a high probability in case of multiple infections. No recombinant strain was detected among the 67 clones sequenced. The proportions of the different genotypes were: 71.6% for GII.2 and 28.4% for GII.6. This can be due to a different efficiency in virus replication, a different level or time of infection, or a different RT-PCR and/or cloning reaction efficiencies but none of those could be pointed out. This stresses the need to sequence long fragments and multiple clones to discriminate between co-infection, and the presence of recombinant viruses.

Phylogenetical trees showed that **bovine NoVs** detected in this study are closely related to each other and cluster within the GIII.2. This observation supports the idea that bovine NoVs are specific of this species (Oliver et al., 2003). Genogroup III.1 bovine NoV was not detected in this study, although they have been found in border countries (Liu et al., 1999; Oliver et al., 2007), so it might be present in Belgium but missed by our sample collection or by the set of primers used. This study confirms the predominance of GIII.2 strains as already reported in other studies (Oliver et al., 2003; Park et al., 2007; van der Poel et al., 2003; Wise et al., 2004). The full sequence of B309 detected in 2003 is still very close to the 1980s sequence of the Newbury2 strain (89.7% identity). In the capsid region, the P

Figure 4

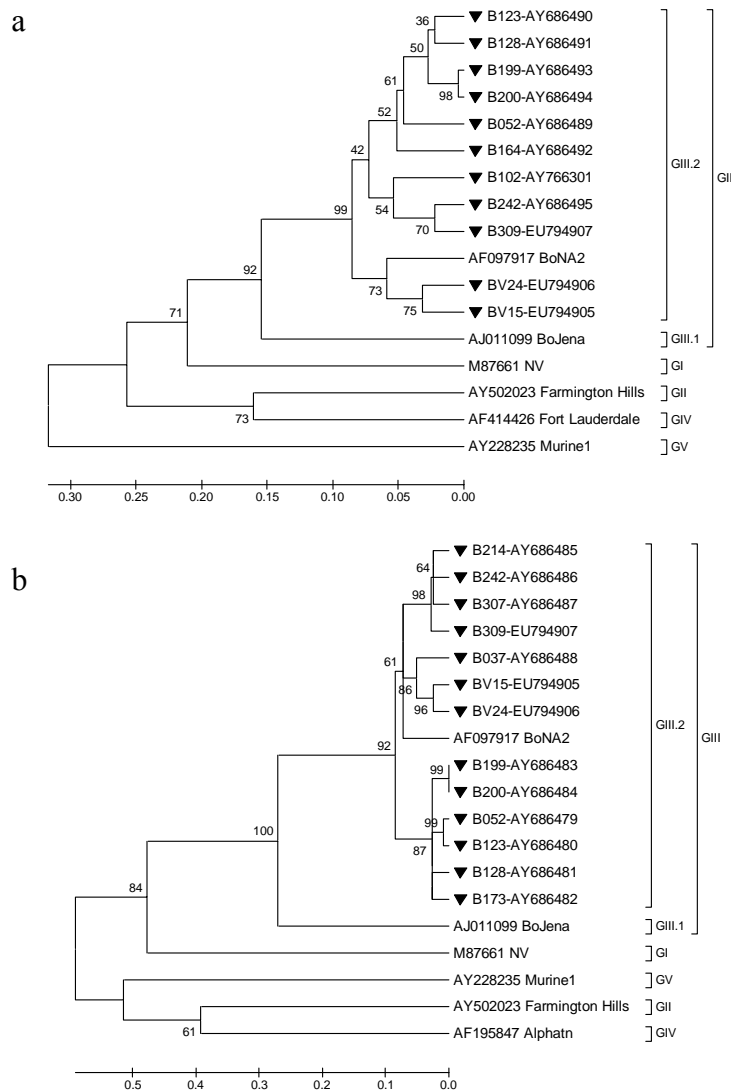


Fig.4: Phylogenetic analysis of bovine strains detected in Belgium (polymerase and capsid region). (a) The dendrogram was generated by neighbor joining using MEGA program after multiple alignments with ClustalW for 130 bp of the partial capsid sequences obtained after amplification with CBECU-F and R primers. (b) The dendrogram was generated by neighbor joining using MEGA program after multiple alignments with ClustalW for 315 bp of the partial capsid sequences obtained after amplification with CCV-3 and 4 primers. It shows genetic relationships between the Belgian bovine sequences (named B followed by a number; ▼, strains from this work) and data available from Genbank database (accession number given) for representative members of human and animal *Norovirus* genus.

domain, the external one, exhibits the highest difference while the S domain, internal one, is very well conserved (Fig. 5).

There is no indication of NoV sequences in cattle that are more closely related to human GI or GII strains than to previously detected bovine

sequences. There is no evidence of strains circulating in both human and cattle or cross-contamination. This suggests that the bovine NoVs identified in the present study are not a risk to human health. Nevertheless, the possibility of a potential zoonotic infection or a cattle reservoir for human infection cannot be excluded, because of the close relationship with human NoV sequences and the proximity of human population and animal breeding in a country like Belgium. Furthermore, on one hand, pigs could be experimentally infected with human GII NoV (Cheetham et al., 2006) and, on the other hand, an intergenogroup recombinant was described (Nayak et al., 2008). This highlights the risk of recombination between human and animal NoVs, leading to new NoV strains that could infect both human and animal. Another situation in favor of intergenogroup recombination is the simultaneous detection of human and animal NoVs in shellfish (Costantini et al., 2006).

All these considerations added to the fact that genetic distances between animal and human NoVs are similar to the distances between the GI and GII strains (Vinje, Altena, and Koopmans, 1997) raise important questions about their host range. Whether occasional cross species infectivity events occur between cattle and human requires more sequence data on the NoVs circulating in cattle throughout the world. If bovines are a reservoir, the prevalence of NoVs should be determined in both healthy and diseased cattle.

Therefore, it can be advised to continue the study of NoVs in animal and human and to develop methods for the detection of such interspecies transmission at an early stage (Scipioni et al., 2008a; Scipioni et al., 2008c). These aspects should be studied through collaborative research between public and animal health.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by SPF “Santé publique, Sécurité de la Chaîne alimentaire et Environnement” (S6068, RF6185), by Belgian Science Policy - Science for a Sustainable Development (SSD) (SD/AF/01), by the “Région Wallonne” (415701) and the University of Liège. The authors thank a lot Dr Jan Vinjé (CDC, Atlanta) for his precious advices for the full sequencing of the bovine strain. We thank the staff of the Food Microbiology Service for DNA sequencing and the staff of the Virology Service for technical assistance, especially Christine Thys. We

Figure 5

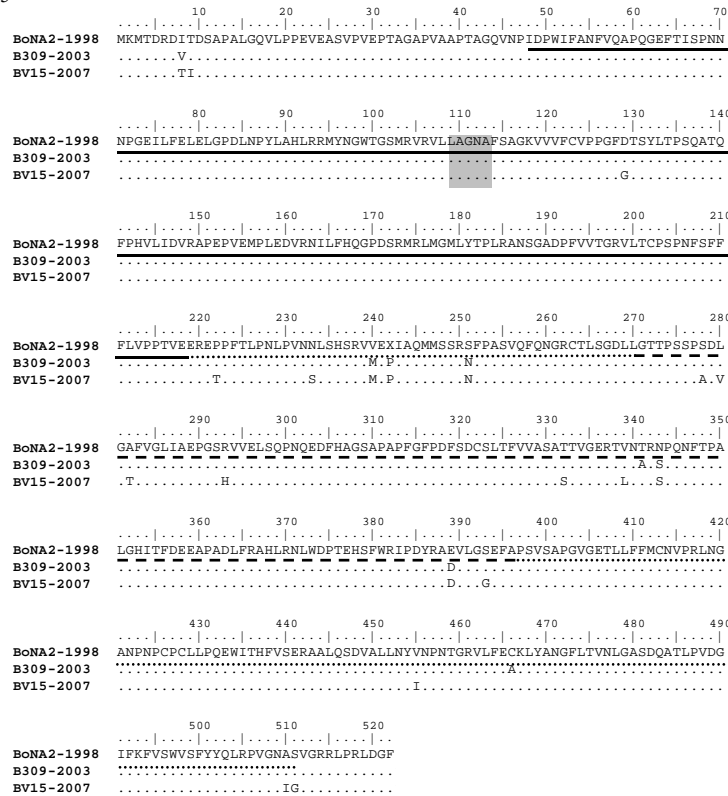


Fig. 5: Multiple amino acid sequence alignment of the capsid proteins of the Newbury2 (year 1980s), B309 (year 2003) and BV15 (2007) strains. The conserved LAGNA motif located at the 3- and 5-fold axes of symmetry is shown in grey. The solid line represents the S domain, the dotted lines represent the P1 domain and the dashed line represents the P2 domain.

thank Prof. De Mol, Prof. Goubau, Drs Christiaens, Dierick and Botteldoorn for their kind assistance and efficiency to collect human samples. We thank Drs Czaplicki, Lomba and Quinet (Association Régionale de Santé et d'Identification Animale) for their assistance in the collection of animal samples.

REFERENCES

Bridger, J. C., Hall, G. A., and Brown, J. F. (1984). Characterization of a calici-like virus (Newbury agent) found in association with astrovirus in bovine diarrhea. *Infect.Immun.* **43**, 133-138.

Buesa, J., Montava, R., Abu-Mallouh, R., Fos, M., Ribes, J. M., Bartolome, R., Vanaclocha, H., Torner, N., and Dominguez, A. (2008). Sequential evolution of genotype GII.4 norovirus variants causing gastroenteritis outbreaks from 2001 to 2006 in Eastern Spain. *J Med Virol* **80**(7), 1288-95.

Bull, R. A., Hansman, G. S., Clancy, L. E., Tanaka, M. M., Rawlinson, W. D., and White, P. A. (2005). Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg Infect Dis* **11**(7), 1079-85.

Bull, R. A., Tanaka, M. M., and White, P. A. (2007). Norovirus recombination. *J Gen Virol* **88**(Pt 12), 3347-59.

Cheetham, S., Souza, M., Meulia, T., Grimes, S., Han, M. G., and Saif, L. J. (2006). Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs. *Journal of Virology* **80**(21), 10372-81.

Costantini, V., Loisy, F., Joens, L., Le Guyader, F. S., and Saif, L. J. (2006). Human and animal enteric caliciviruses in oysters from different coastal regions of the United States. *Appl Environ Microbiol* **72**(3), 1800-9.

Dastjerdi, A. M., Green, J., Gallimore, C. I., Brown, D. W., and Bridger, J. C. (1999). The bovine Newbury agent-2 is genetically more closely related to human SRSVs than to animal caliciviruses. *Virology* **254**(1), 1-5.

Dastjerdi, A. M., Snodgrass, D. R., and Bridger, J. C. (2000). Characterisation of the bovine enteric calici-like virus, Newbury agent 1. *FEMS Microbiol.Lett.* **192**.

Dingle, K. E. (2004). Mutation in a Lordsdale norovirus epidemic strain as a potential indicator of transmission routes. *J Clin Microbiol* **42**(9), 3950-7.

Hutson, A. M., Atmar, R. L., and Estes, M. K. (2004). Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends Microbiol* **12**(6), 279-87.

Johansen, K., Mannerqvist, K., Allard, A., Andersson, Y., Burman, L. G., Dillner, L., Hedlund, K. O., Jonsson, K., Kumlin, U., Leitner, T., Lysen, M., Thorhagen, M., Tiveljung-Lindell, A., Wahlstrom, C., Zwegyberg-Wirgart, B., and Widell, A. (2008). Norovirus strains belonging to the GII.4 genotype dominate as a cause of nosocomial outbreaks of viral gastroenteritis in Sweden 1997–2005. Arrival of new variants is associated with large nation-wide epidemics. *J Clin Virol* **42**(2), 129-34.

Kageyama, T., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F. B., Kojima, S., Takai, R., Oka, T., Takeda, N., and Katayama, K. (2004). Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan. *J Clin Microbiol* **42**(7), 2988-95.

Le Guyader, F. S., Mittelholzer, C., Haugarreau, L., Hedlund, K. O., Alsterlund, R., Pommepuy, M., and Svensson, L. (2004). Detection of noroviruses in raspberries associated with a gastroenteritis outbreak. *Int J Food Microbiol* **97**(2), 179-86.

Lindsmith, L. C., Donaldson, E. F., Lobue, A. D., Cannon, J. L., Zheng, D. P., Vinje, J., and Baric, R. S. (2008). Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med* **5**(2), e31.

- Liu, B. L., Lambden, P. R., Gunther, H., Otto, P., Elschner, M., and Clarke, I. N. (1999). Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. *J Virol* **73**(1), 819-25.
- Lopman, B., Vennema, H., Kohli, E., Pothier, P., Sanchez, A., Negrodo, A., Buesa, J., Schreier, E., Reacher, M., Brown, D., Gray, J., Iturriza, M., Gallimore, C., Bottiger, B., Hedlund, K. O., Torven, M., von, B. C., Maunula, L., Poljsak-Prijatelj, M., Zimsek, J., Reuter, G., Szucs, G., Melegh, B., Svennson, L., van, D. Y., and Koopmans, M. (2004). Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet*. **363**, 682-688.
- Lopman, B. A., Brown, D. W., and Koopmans, M. (2002). Human caliciviruses in Europe. *J Clin Virol* **24**(3), 137-60.
- Martella, V., Campolo, M., Lorusso, E., Cavicchio, P., Camero, M., Bellacicco, A. L., Decaro, N., Elia, G., Greco, G., Corrente, M., Desario, C., Arista, S., Banyai, K., Koopmans, M., and Buonavoglia, C. (2007). Norovirus in captive lion cub (*Panthera leo*). *Emerg Infect Dis* **13**(7), 1071-3.
- Martella, V., Lorusso, E., Decaro, N., Elia, G., Radogna, A., D'Abramo, M., Desario, C., Cavalli, A., Corrente, M., Camero, M., Germinario, C. A., Banyai, K., Di Martino, B., Marsilio, F., Carmichael, L. E., and Buonavoglia, C. (2008). Detection and molecular characterization of a canine norovirus. *Emerg Infect Dis* **14**(8), 1306-8.
- Mattison, K., Shukla, D., Cook, A., Pollari, F., Friendship, R., Kelton, D., Bidawid, S., and Farber, J. M. (2007). Human noroviruses in swine and cattle. *Emerging Infectious Disease* **in press**.
- Mayo, M. A. (2002). A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch Virol* **147**(8), 1655-63.
- Nayak, M. K., Balasubramanian, G., Sahoo, G. C., Bhattacharya, R., Vinje, J., Kobayashi, N., Sarkar, M. C., Bhattacharya, M. K., and Krishnan, T. (2008). Detection of a novel intergenogroup recombinant Norovirus from Kolkata, India. *Virology* **377**(1), 117-23.
- Oliver, S. L., Dastjerdi, A. M., Wong, S., El-Attar, L., Gallimore, C., Brown, D. W., Green, J., and Bridger, J. C. (2003). Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans. *J.Virol.* **77**, 2789-2798.
- Oliver, S. L., Wood, E., Asobayire, E., Wathes, D. C., Brickell, J. S., Elschner, M., Otto, P., Lambden, P. R., Clarke, I. N., and Bridger, J. C. (2007). Serotype 1 and 2 bovine noroviruses are endemic in cattle in the United kingdom and Germany. *J Clin Microbiol* **45**(9), 3050-2.
- Park, S. I., Jeong, C., Kim, H. H., Park, S. H., Park, S. J., Hyun, B. H., Yang, D. K., Kim, S. K., Kang, M. I., and Cho, K. O. (2007). Molecular epidemiology of bovine noroviruses in South Korea. *Vet Microbiol* **124**(1-2), 125-33.
- Scipioni, A., Bourgot, I., Mauroy, A., Ziant, D., Saegerman, C., Daube, G., and Thiry, E. (2008a). Detection and quantification of human and bovine noroviruses by a TaqMan RT-PCR assay with a control for inhibition. *Mol Cell Probes* **22**(4), 215-22.
- Scipioni, A., Mauroy, A., Vinje, J., and Thiry, E. (2008b). Animal noroviruses. *Vet J* **178**(1), 32-45.
- Scipioni, A., Mauroy, A., Ziant, D., Saegerman, C., and Thiry, E. (2008c). A SYBR Green RT-PCR assay in single tube to detect human and bovine noroviruses and control for inhibition. *Virol J* **5**, 94.
- Smiley, J. R., Hoet, A. E., Traven, M., Tsunemitsu, H., and Saif, L. J. (2003). Reverse transcription-PCR assays for detection of bovine enteric caliciviruses (BEC) and analysis of the genetic relationships among BEC and human caliciviruses. *J.Clin.Microbiol.* **41**, 3089-3099.
- Straub, T. M., Honer zu Bentrup, K., Orosz-Coghlan, P., Dohnalkova, A., Mayer, B. K., Bartholomew, R. A., Valdez, C. O., Bruckner-Lea, C. J., Gerba, C. P., Abbaszadegan, M., and Nickerson, C. A. (2007). In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerging Infectious Disease* **13**(3), 396-403.
- Sugieda, M., Nagaoka, H., Kakishima, Y., Ohshita, T., Nakamura, S., and Nakajima, S. (1998). Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *Arch Virol* **143**(6), 1215-21.
- Sugieda, M., and Nakajima, S. (2002). Viruses detected in the caecum contents of healthy pigs representing a new genetic cluster in genogroup II of the genus "Norwalk-like viruses". *Virus Res* **87**(2), 165-72.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**(8), 1596-9.
- Tsang, O. T., Wong, A. T., Chow, C. B., Yung, R. W., Lim, W. W., and Liu, S. H. (2008). Clinical characteristics of nosocomial norovirus outbreaks in Hong Kong. *J Hosp Infect* **69**(2), 135-40.
- van der Poel, W. H., van der Heide, H., Verschoor, F., Gelderblom, H., Vinje, J., and Koopmans, M. P. (2003). Epidemiology of Norwalk-like virus infections in cattle in The Netherlands. *Vet.Microbiol.* **92**, 297-309.
- Verbelen, V., Bodeus, M., Garrino, M. G., Scipioni, A., Kabamba, B., Daube, G., Thiry, E., and Goubau, P. (2004). Hospital outbreak of gastroenteritis due to Norovirus in Belgium. *Acta Clin Belg* **59**(1), 30-3.
- Vinje, J., Altena, S. A., and Koopmans, M. P. (1997). The incidence and genetic variability of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *J.Infect.Dis.* **176**, 1374-1378.
- Vinje, J., and Koopmans, M. P. (1996). Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J.Infect.Dis.* **174**, 610-615.
- Widdowson, M. A., Sulka, A., Bulens, S. N., Beard, R. S., Chaves, S. S., Hammond, R., Salehi, E. D., Swanson, E., Totaro, J., Woron, R., Mead, P. S.,

- Bresee, J. S., Monroe, S. S., and Glass, R. I. (2005). Norovirus and foodborne disease, United States, 1991-2000. *Emerg Infect Dis* **11**(1), 95-102.
- Wise, A. G., Monroe, S. S., Hanson, L. E., Grooms, D. L., Sockett, D., and Maes, R. K. (2004). Molecular characterization of noroviruses detected in diarrheic stools of Michigan and Wisconsin dairy calves: circulation of two distinct subgroups. *Virus Res* **100**(2), 165-77.
- Wolf, S., Williamson, W., Hewitt, J., Lin, S., Rivera-Aban, M., Ball, A., Scholes, P., Savill, M., and Greening, G. E. (2009). Molecular detection of norovirus in sheep and pigs in New Zealand farms. *Vet Microbiol* **133**(1-2), 184-9.
- Zheng, D. P., Ando, T., Fankhauser, R. L., Beard, R. S., Glass, R. I., and Monroe, S. S. (2006). Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* **346**(2), 312-23.

4.

Discussion

Les NoV, méconnus jusqu'il y a peu, sont devenus au cours de la dernière décennie un sujet d'importance croissante de par leur identification de plus en plus fréquente dans des épidémies d'origine alimentaire, leur rapidité de transmission entre les individus et le risque zoonotique potentiel qu'ils représentent (Koopmans et al., 2004; Widdowson et al., 2005a; Mattison et al., 2007).

Ce travail s'est développé selon deux axes de recherche :

- l'amélioration de la détection des NoV humains et bovins ;
- la compréhension des voies de transmission des NoV par l'étude phylogénétique des NoV humains et bovins.

Pionnier dans l'étude des NoV au laboratoire, ce travail s'est attelé dans un premier temps à la mise au point et l'optimisation de méthodes de détection, avec une orientation « zoonose » pour la détection des NoV bovins et humains. Tout d'abord, des RT-PCR classiques ont été développées. Les techniques de PCR ont énormément progressé ces dernières années, surtout par l'arrivée de la PCR en temps réel. Celle-ci a révolutionné le monde du diagnostic, et la PCR classique est rapidement devenue obsolète. Nous nous sommes donc tournés vers la PCR en temps réel. Une première approche a consisté en l'utilisation de l'agent intercalant SYBR Green avec un contrôle interne pour s'affranchir des résultats faux négatifs. Ensuite, une amélioration a été apportée par l'utilisation de la technologie des sondes TaqMan, confirmant directement le résultat positif et apportant un moyen de quantification par l'utilisation d'un standard. Ces deux méthodes font l'objet de la première partie de cette discussion.

L'étude des voies de transmission des NoV et de l'évolution des souches présentes dans les espèces humaines et bovines, notamment celles détectées en Belgique, ont fait l'objet de la seconde partie de ce travail. Cela a permis de mettre en évidence des NoV chez l'homme et les bovins en Belgique, de détecter une co-infection et deux recombinaisons naturels, et par l'étude phylogénétique de ces virus, d'appuyer l'hypothèse que les NoV bovins ne représentent pas actuellement un risque pour la santé humaine. Les résultats sont discutés dans la seconde partie de la discussion et sont suivis d'une réflexion plus approfondie sur le risque zoonotique que représentent les NoV.

1. Mise au point de méthodes de détection

Les RT-PCR permettant la détection des NoV ont été développées dès le clonage du virus de Norwalk, et ce, pour des échantillons cliniques, environnementaux ou dans les aliments (Le Guyader et al., 1996b; Vinje et al., 2003). Les tests RT-PCR sont très utilisés dans les laboratoires de recherche et de diagnostic. Le séquençage est quant à lui réservé aux études épidémiologiques, pour identifier, par exemple, la source d'une épidémie, ou lier des épidémies entre elles (Parashar et al., 1998). Il est également indispensable pour l'étude de l'évolution des NoV (Zheng et al., 2006).

Par la suite, la RT-PCR en temps réel a amélioré la détection en rendant possible la quantification, et par une rapidité et sensibilité supérieures (Espy et al., 2006).

Les deux méthodes en temps réel développées dans ce travail utilisent une RT-PCR en une étape, avec une polymérase « hot-start » et thermostable. Le protocole en une étape simplifie la procédure et diminue le risque de contamination de l'ARN ; de plus, cela représente un grand intérêt pour le diagnostic en routine car il n'y a pas de manipulation à effectuer après l'amplification.

A ce jour, aucune paire d'amorces définie dans la région de la polymérase ou de la capsid ne permet de détecter l'ensemble des NoV et vu leur variabilité génétique (Phan et al., 2007), il semble peu probable que cela soit possible. Pour les deux techniques développées lors de ce travail, un plus grand nombre d'échantillons appartenant à différents géotypes et génogroupes de NoV devraient être testés pour déterminer leur capacité effective à détecter de multiples géotypes. Lors du screening de la banque d'échantillons disponible, ces deux méthodes ont été capables de détecter plusieurs géotypes parmi les NoV de GI, II et III, s'étendant sur une période de 1996 à 2008 pour les NoV humains.

Une limitation bien connue des (RT-)PCR est la présence d'inhibiteurs qui peuvent être à l'origine de résultats faux-négatifs. Pour s'en prémunir, un contrôle interne a été conçu et est utilisé en parallèle à la réaction pour valider sa non-inhibition. Il a été synthétisé *in vitro* à partir d'un ARN différent afin d'éviter l'interférence potentielle avec les amplicons NoV (Schwab et al., 1997; Kim et al., 2002). Avec ce contrôle interne, les réactions de RT-PCR inhibées peuvent être détectées efficacement. L'identification de ces échantillons, et donc la diminution de résultats faussement négatifs, est cruciale pour l'intervention et un contrôle rapides des épidémies à NoV.

Le taux d'inhibition était différent lors de l'utilisation des deux méthodes : plus élevé pour la RT-PCR SYBR Green (36,8% des échantillons humains et 24,1% des bovins) que pour la RT-PCR TaqMan (15,8% des échantillons humains et 13,8% des échantillons humains). La présence d'inhibiteurs peut varier fortement entre les échantillons, et peut être fonction de leur nature mais aussi de propriétés intrinsèques de l'échantillon (par exemple, le régime carnivore ou herbivore) ce qui expliquerait la différence entre échantillons humains et bovins (Wilde et al., 1990; Kreader, 1996). De plus, les agents intercalants tel le SYBR Green sont connus pour interférer avec l'action des polymérases (Nath et al., 2000), ce qui peut expliquer la différence entre les deux méthodes. Pour lever l'inhibition, les deux techniques que sont la dilution 10x du produit d'extraction ou l'ajout de BSA au mélange de RT-PCR (Kreader, 1996) ont été comparées. La dilution des extractions est souvent efficace pour lever l'inhibition, le facteur inhibiteur étant dilué. L'inconvénient est que le matériel génétique viral présent est aussi dilué et doit par conséquent être présent en quantité suffisamment élevée au départ. L'ajout de BSA ne présente pas cet inconvénient (Kreader, 1996). Ces deux techniques n'ont pas présenté la même efficacité en fonction de la méthode, SYBR Green ou TaqMan, laissant penser qu'il est préférable de tester les moyens de lever les inhibitions pour chaque type de RT-PCR différente afin de choisir la meilleure option.

Le SYBR Green, un agent intercalant, présente l'avantage de permettre l'adaptation relativement facilement et rapidement d'une PCR classique en une PCR en temps réel, ce qui en fait

une première option d'intérêt. La méthode développée ici est réalisée en un seul tube, ce qui est avantageux pour réduire le nombre de manipulations et les risques de contamination. Elle permet la détection d'une éventuelle inhibition sans nécessiter une paire d'amorces différente, ni une réaction supplémentaire. Par l'utilisation de la paire d'amorces dégénérées JV12Y-JV13I, le panel de NoV détectés est augmenté (Vennema et al., 2002). L'amplification du contrôle interne n'interfère pas avec la sensibilité de la réaction ; de plus, les NoV sont favorisés par rapport au contrôle interne car le fragment amplifié pour ce dernier est plus long que celui des NoV. Cette real-time SYBR Green est efficace, sensible, spécifique et rapide pour la détection de NoV appartenant aux génogroupes I, II et III.

La variabilité constatée dans les températures de dissociation entre NoV humains et bovins peut être expliquée par la diversité de séquences existant entre les NoV (Helps et al., 2002; Richards et al., 2004). En effet, cette méthode peut détecter les infections mixtes (présence de NoV humains et animaux dans le même échantillon) par la présence de deux pics distincts. En effet, les températures de dissociation des NoV humains et bovins sont relativement bien distinctes et l'analyse des courbes de dissociation permet d'obtenir des informations préliminaires sur l'origine du virus (bovine ou humaine). Malgré tout, certains échantillons ont montré des températures de dissociation divergentes des autres NoV appartenant à la même espèce. Ces échantillons ont, pour l'intérêt qu'ils représentaient, fait l'objet d'études plus approfondies par séquençage et se sont révélés appartenant au même génogroupe que les autres NoV bovins. Les séquences amplifiées étaient légèrement différentes des autres NoV bovins mais possédaient une proximité génétique avec les NoV bovins par analyse phylogénétique.

La seconde méthode développée, une RT-PCR TaqMan, est sensible, réagit avec un large panel de NoV, comprenant les NoV humains de GI et GII ainsi que les NoV bovins de GIII, et permet leur quantification (Hohne et al., 2004).

La diversité génétique des NoV rend difficile le choix d'amorces capables de détecter les différents génogroupes du genre *Norovirus* (Richards et al., 2004). La paire d'amorces SciS1 et R1 et la sonde Sci1 ont été sélectionnées dans une région conservée du génome des NoV à partir de la souche de NoV H384 (GII.4) détectée lors de ce travail. Quand cette technique a été testée sur des NoV humains et bovins, des NoV appartenant aux GI, GII et GIII furent détectés. Ce test a donc l'avantage de pouvoir mettre en évidence les NoV indépendamment de leur espèce d'origine (humaine ou bovine). Cette méthode a été la seconde RT-PCR TaqMan décrite permettant la détection à la fois des NoV humains et bovins. Comparée à la méthode publiée par Wolf et collaborateurs (2007), elle présente les avantages de mettre en évidence une éventuelle inhibition de la réaction et de permettre la quantification du niveau de contamination des échantillons. A la différence de la méthode de Wolf et collaborateur (2007), elle n'utilise qu'un seul jeu d'amorces et de sonde détectant à la fois les NoV humains et bovins.

Comme les NoV ne peuvent pas être multipliés en culture de cellules, la RT-PCR avec utilisation d'un standard d'ARN est actuellement la seule option pour quantifier la charge virale. Dans cette étude, la majorité des échantillons humains positifs contenaient de 10^7 à 10^{10} copies de génome de NoV par gramme de matières fécales. Ces valeurs sont supérieures à celles estimées par ME (Kapikian et al., 1990). Cela peut s'expliquer par une sous-estimation en ME ou du fait que la TaqMan est aussi capable de détecter tous les génomes viraux, même ceux qui ne seraient pas encapsidés, alors qu'en ME, seules les particules virales complètes sont détectées.

L'estimation du nombre de copies de génome de NoV dans les matières fécales bovines est inférieure à celle pour les NoV humains. Plusieurs hypothèses pourraient l'expliquer. La première serait une plus faible spécificité des amorces et de la sonde pour les NoV de GIII qui pourrait conduire à un signal diminué de la RT-PCR TaqMan. La seconde est qu'il s'agit dans notre étude d'une estimation du niveau d'excrétion des NoV car la quantification est rapportée à un standard de NoV humain, alors que dans ce cas du NoV bovin est quantifié. Idéalement, un standard constitué à partir d'un NoV bovin devrait être utilisé. La troisième explication possible serait une caractéristique physiopathologique de l'infection des bovins par les NoV, qui seraient excrétés à un niveau inférieur par rapport aux NoV humains. Celle-ci ne peut pas être vérifiée à l'heure actuelle car il n'y a pas de données publiées de quantification de l'excrétion des NoV bovins. Souza et collaborateurs (2007) ont montré que l'infection expérimentale de veaux gnotobiotiques avec un NoV humain conduisait à une excrétion de NoV dans les matières fécales de $7,7 \times 10^3$ génomes équivalents (GE)/ml à 2×10^5 GE/ml. Nos observations montrent un niveau d'excrétion dix fois supérieur, de 10^4 à 10^6 copies de génome/g de matières fécales mais les génogroupes concernés étaient différents. Il s'agit ici d'une approximation de la charge virale. Pour une quantification plus précise, l'inhibition partielle des échantillons pourrait être prise en compte. Un facteur de correction serait calculé pour chaque échantillon à partir des cycles seuil (Ct) mesurés pour l'amplification d'une même quantité de standard ajouté d'une part au produit d'extraction et d'autre part amplifié seul (Meijerink et al., 2001).

Cette RT-PCR TaqMan est une méthode exacte, sensible, spécifique et rapide pour la détection d'un large panel de NoV appartenant au GI, GII et GIII. Elle permet, par l'utilisation d'un contrôle interne, de repérer les échantillons contenant des inhibiteurs et donc, d'empêcher de rendre des résultats faussement négatifs. Ce test pourrait être employé dans les laboratoires de diagnostic humains et animaux et pour la détection des NoV dans les aliments et les échantillons environnementaux. Il peut également être utilisé comme outil de recherche pour étudier et mieux comprendre la pathogenèse des NoV. Néanmoins, la classification des NoV et l'étude de leurs voies de transmission requièrent un séquençage après la détection. De plus, les NoV bovins ont déjà été détectés dans la chaîne alimentaire, plus précisément dans des mollusques bivalves, qui étaient également contaminés par des NoV humains (Costantini et al., 2006). Cela augmente le risque de franchissement de la barrière d'espèce pour ces virus, ainsi que celui de l'émergence de virus recombinants, et met en avant le besoin de détecter non seulement les NoV humains, mais aussi les

NoV bovins (et les autres NoV animaux). Pour déterminer directement l'espèce d'origine des NoV, des sondes spécifiques des NoV humains et bovins pourraient être construites (Wolf et al., 2007).

La RT-PCR TaqMan confirme directement le résultat par l'hybridation avec une sonde spécifique en temps réel. C'est un avantage par rapport à la RT-PCR SYBR Green où la spécificité est vérifiée seulement en fin d'amplification par le tracé de courbes de dissociation (Hohne et al., 2004; Laverick et al., 2004). De plus, la technologie SYBR Green se prête plus difficilement à la quantification car le SYBR Green est un agent intercalant, qui va se fixer aussi bien sur les amplicons de NoV que les amplicons aspécifiques et les dimères d'amorces. Par ailleurs, avec cette technique, il persiste toujours un doute sur l'exactitude du résultat positif. En effet, rien ne certifie que l'amplicon possédant une température de dissociation attendue est bien un NoV. Cette considération est d'autant plus importante que les NoV possèdent un génome variable, impliquant que la température de dissociation attendue n'est pas unique mais est située dans un intervalle, comme cela a été montré pour le calicivirus félin, possédant le même type de génome (Helps et al., 2002).

Ces deux méthodes sont à utiliser dans des contextes différents : la RT-PCR TaqMan sera plus adéquate pour le diagnostic de routine (matières fécales, aliments, prélèvements dans l'environnement) et également, grâce à sa capacité à pouvoir quantifier les NoV, très utile pour des études de pathogénicité, d'excrétion virale et plus largement d'évaluation du risque. La RT-PCR SYBR Green sera plutôt utilisée pour les analyses dans le cadre des études d'évolution virale ou des voies de transmission car, entre autres, elle permet le séquençage d'un fragment de taille compatible avec une première analyse phylogénétique. Elle présente l'avantage d'un coût moindre par rapport à la RT-PCR TaqMan.

2. Norovirus bovins et humains en Belgique

Dans le but d'étudier les voies de transmission des NoV, des souches humaines et bovines contemporaines détectées en Belgique ont été analysées. Ce travail relate la première identification de NoV dans l'espèce bovine et, historiquement, la première identification de NoV humains en Belgique. Les prévalences n'ont pas été calculées vu l'absence d'information sur la provenance et les circonstances des prélèvements (due à la confidentialité des données).

Les paires d'amorces utilisées au départ ont été choisies délibérément à partir des amorces destinées à la détection de NoV humains (JV12-JV13) (Vinje et al., 1996), avec pour objectif de détecter dans l'espèce bovine des NoV proches de ceux décrits chez l'homme. D'autres paires d'amorces ont ensuite été utilisées pour augmenter la probabilité de détection des NoV bovins. Elles furent aussi choisies de façon à obtenir des séquences partielles du génome situées dans différentes régions (polymérase et capsid) afin de pouvoir identifier d'éventuels recombinants (Bull et al., 2005). Toutes les paires d'amorces utilisées ne permirent pas l'amplification d'un produit pour

chaque échantillon positif. Cela peut s'expliquer par la diversité génétique des NoV (Phan et al., 2007). Des amplifications aspécifiques ont également été notées.

Chez l'homme, des NoV appartenant aux GI et II ont été détectés chez des enfants ou des personnes âgées, qui sont plus sensibles aux infections et pour qui les conséquences peuvent être plus sévères, jusqu'à une hospitalisation. Le génotype GII.4 est reconnu comme prédominant dans le monde (Kageyama et al., 2004; Lopman et al., 2004; Buesa et al., 2008), ce que confirment les données de cette étude, avec 88,6 % des souches détectées chez l'homme appartenant à ce génogroupe. Les analyses phylogénétiques basées sur les séquences partielles de la protéine de capsid ou de la polymérase ont montré le même regroupement génotypique pour les NoV de GII.4. Les variants GII.4 prédominants sont en relation avec les NoV « 2002-Farmington Hills » (Zheng et al., 2006) et « 2006-Terneuzen » (Siebenga et al., 2007) ce qui correspond aux années durant lesquelles les prélèvements furent réalisés. Des souches plus anciennes étaient encore en circulation en 2002 et 2003, proches des NoV « Valencia » et « Grimsby » de 1996 (Hale et al., 1999; Buesa et al., 2002). La raison pour laquelle des NoV circulants sont parfois remplacés par des souches émergentes n'est pas connue, mais il peut être supposé qu'elles soient plus virulentes, plus stables dans l'environnement, ou capables d'échapper à la réponse immune, par exemple par un phénotype de capsid différent (dû à une mutation ponctuelle ou à une recombinaison) (Gallimore et al., 2007; Siebenga et al., 2007).

Le séquençage de NoV, l'identification de recombinants et l'étude de la recombinaison sont très intéressants, non seulement pour la compréhension de l'évolution des NoV et de leurs voies de transmission, mais également pour le développement de moyens de prévention efficaces. Deux recombinants naturels ont été détectés dans ce travail : un intra-génogroupe I et le second intra-génogroupe II. La majorité des recombinants identifiés antérieurement montrent un point chaud de recombinaison à la jonction entre l'ORF1 et l'ORF2 (Bull et al., 2005), qui peut correspondre aux observations de cette étude. Une infection multiple a aussi été détectée dans un autre échantillon, et plusieurs clones ont été séquencés. En effet, la présence de ces deux virus dans le même prélèvement suggère une possible co-infection de cellules et donc, une éventuelle recombinaison entre ces deux virus. Cependant, aucun recombinant n'a pu être mis en évidence parmi les clones séquencés. La proportion de clones de génotypes différents était de 71,6 % pour le GII.2 et 28,4 % pour le GII.6. Cette différence pourrait être due à une efficacité de multiplication différente de ces deux virus, à un niveau ou à un moment d'infection différent, ou encore à une efficacité de RT-PCR et/ou de clonage différente. Cette co-infection prouve qu'il est nécessaire de réaliser l'amplification et le séquençage de longs fragments chevauchant la jonction de l'ORF1/ORF2 pour pouvoir distinguer une co-infection d'un recombinant. L'idéal serait un séquençage complet afin de couvrir la totalité du génome, d'autres sites potentiels de recombinaison ayant été décrits à l'intérieur des ORF1 (polymérase) (Bull et al., 2007; Waters et al., 2007) et 2 (protéine de capsid) (Rohayem et al., 2005).

Les analyses phylogénétiques montrent que les NoV bovins détectés dans cette étude sont proches entre eux et du prototype du génotype III.2, le virus Newbury2. Cette observation va dans le sens de l'hypothèse selon laquelle les NoV bovins sont spécifiques de cette espèce (Oliver et al., 2003). Aucun NoV bovin de génotype III.1 ne fut détecté, bien que les pays voisins les aient décrits (Liu et al., 1999; Oliver et al., 2007b). Il est logique de penser qu'ils soient présents en Belgique également mais vraisemblablement non détectés par les amorces utilisées dans ce travail ou absents de la banque d'échantillons testés. La prédominance des NoV GIII.2 dans l'espèce bovine a été rapportée dans plusieurs études (Oliver et al., 2003; van der Poel et al., 2003; Wise et al., 2004; Park et al., 2007) et il en va très certainement de même dans notre pays.

Afin d'étudier l'évolution des NoV, la séquence complète de la souche bovine B309 a été alignée avec l'ARN de la souche de référence Newbury2. On peut en déduire qu'en plus de 25 ans, il reste entre ces deux virus 91% minimum d'identité en acides aminés pour les différents ORF. Oliver et collaborateurs (2007a) ont montré qu'entre le virus Newbury2, détecté en 1976, et une souche de 1994, il y avait 95% minimum d'identité en acides aminés. Cela confirme leur hypothèse que les NoV bovins de GIII.2 sont très proches entre eux et possèdent une identité génétique élevée pour des virus à ARN. Cette stabilité apparente simplifierait d'autant la détection des NoV bovins de GIII.2 par RT-PCR.

Aucun NoV circulant à la fois chez l'homme et le bovin n'a été mis en évidence, ni même de séquence de NoV bovin plus proche des NoV humains du GI ou GII que des NoV bovins (GIII) détectés précédemment. Cela suggère que les NoV bovins détectés dans cette étude ne représentent pas un risque pour la santé humaine. Néanmoins, la possibilité d'une infection zoonotique ou d'un réservoir animal ne peut pas être exclue au vu, d'une part de la proximité de séquences entre les NoV humains et animaux et, d'autre part, de la relation étroite et proche entre les populations humaines et les élevages d'animaux.

3. Risque zoonotique

Les NoV sont des agents fréquents d'épidémies de gastroentérites non-bactériennes, et sont également la cause virale la plus courante de toxi-infections d'origine alimentaire (Koopmans et al., 2002). En Belgique, ils devancent même les bactéries et ont été la cause de toxi-infections alimentaires la plus fréquente en 2007 (Baert et al., 2009). Dans les espèces animales, leur impact n'est pas connu, mais ils ont déjà été détectés dans les espèces bovine, porcine, murine, féline, canine et ovine dans différents pays et continents (Woode et al., 1978; Bridger, 1980; Saif et al., 1980; Karst et al., 2003; Martella et al., 2007; Martella et al., 2008; Wolf et al., 2009). Comme les NoV animaux sont proches des NoV humains, on peut supposer que des propriétés semblables sont partagées par ceux-ci. Le NoV murin, le seul pour lequel un système de multiplication en culture de cellules est disponible, est utile

comme modèle homologue pour l'étude *in vitro* et *in vivo* des NoV (Karst et al., 2003; Hsu et al., 2006).

Jusqu'à ce jour, les génomes de quelques NoV animaux ont été complètement séquencés et publiés afin d'étudier et comprendre leur relation avec les NoV responsables de pathologie chez l'homme. Les NoV animaux sont génétiquement proches des souches humaines, surtout les NoV porcins, qui sont classés avec les NoV humains de GII, ceux le plus fréquemment associés à des épidémies chez l'homme (Wang et al., 2007). Un grand intérêt réside dans la possible transmission zoonotique des NoV. De plus, les NoV humains de GII se répliquent chez des porcs et des veaux gnotobiotés infectés de manière expérimentale (Cheetham et al., 2006; Souza et al., 2008), ce qui pourrait apporter deux modèles hétérologues pour l'étude de la pathogénie de l'infection à NoV humains. Il est également intéressant de noter que des séquences de NoV humains ont été détectées dans des matières fécales de porcs et de bovins au Canada (Mattison et al., 2007). Les NoV bovins et porcins pourraient être de bons candidats pour leur utilisation comme modèle animal homologue.

De plus, il faut noter qu'un recombinant intergénogroupes I et II a été décrit (Nayak et al., 2008) ce qui renforce le risque de recombinaison entre un NoV humain et un NoV animal, conduisant à une nouvelle souche de NoV qui pourrait directement infecter l'homme et les animaux. Une autre situation favorable à la recombinaison intergénogroupes est la détection de NoV humains et animaux dans les mêmes mollusques bivalves (Costantini et al., 2006).

L'émergence de tels recombinants et le risque de transmission inter-espèces ont la plus grande probabilité d'apparaître dans les pays où les densités de populations humaine et animale sont élevées et où les conditions d'élevage favorisent les contacts proches entre animaux et humains.

5.

Conclusions et perspectives

Au début de ce travail, peu de développements de méthodes de détection pour les NoV animaux existaient et les hypothèses de réservoir animal ou de transmission zoonotique faisaient leur chemin.

Les NoV sont des agents incontournables dans la problématique des toxi-infections d'origine alimentaire. Il est important de disposer de méthodes rapides et fiables pour leur détection notamment dans le cadre des actions à prendre préventivement. Les techniques doivent être continuellement mises à jour et adaptées aux souches NoV qui évoluent (Phan et al., 2007). Il apparaît important de continuer à développer, dans un souci d'assurance qualité, des méthodes simples de détection des virus. L'utilisation de la RT-PCR en temps réel permet un criblage rapide, sensible et spécifique de la contamination virale des échantillons (Espy et al., 2006). Cependant, si la RT-PCR en temps réel constitue un outil de détection voire de quantification, elle ne permet pas de typer et d'identifier précisément les différentes souches. Il est donc nécessaire, pour l'étude des voies potentielles de transmission, d'obtenir les séquences d'un maximum de NoV.

Une question fondamentale, quelle que soit la souche détectée par RT-PCR dans des échantillons, réside dans la signification du résultat par rapport à l'infectiosité du virus. A l'heure actuelle, il est impossible de répondre à cette question, puisqu'il n'existe pas de système de culture cellulaire aisé pour les NoV humains (Duizer et al., 2004b; Straub et al., 2007). Les tests réalisés avec le NoV murin, pouvant être multiplié en culture de cellules, montrent que le virus inactivé est toujours détecté par RT-PCR et qu'il n'y a pas de corrélation entre la détection en RT-PCR et l'infectiosité du virus (Baert et al., 2008d). Un prétraitement des échantillons à tester, à savoir l'utilisation d'un procédé permettant de détruire les acides nucléiques sans abîmer les capsides, est une piste pour permettre une meilleure approche du danger que représente une contamination (Nuanualsuwan et al., 2002). L'application de la RT-PCR en temps réel à des études épidémiologiques ou chez les volontaires devrait permettre d'accumuler des données concernant le nombre de copies de génome nécessaire pour provoquer une infection. Ces données faciliteraient l'estimation du risque lié à la consommation (FAO/WHO). Il faut également souligner qu'en plus de la charge en virus infectieux, d'autres facteurs peuvent intervenir dans le déclenchement d'une infection. En effet, les personnes immunodéprimées, âgées, et les enfants peuvent constituer une population à risque. Enfin, pour les NoV, la susceptibilité génétique a été démontrée comme étant un critère important dans la survenue des gastro-entérites. Les conditions d'inoculation et la dose infectante sont des facteurs qui doivent également être pris en compte.

Enfin, la transmission de virus entre espèces constitue un danger difficile à estimer mais qui doit être pris en compte. L'environnement, réceptacle de rejets humains et animaux, a certainement un rôle à jouer. Il est donc important de pouvoir évaluer cette contamination. Aucune transmission d'animaux à l'homme n'a été documentée jusqu'à maintenant. Les essais d'inoculation de NoV humains à de jeunes veaux ou porcs gnotobiotiques ont montré une certaine capacité de NoV humains à infecter les animaux, appuyant le potentiel zoonotique des NoV (Cheetham et al., 2006; Souza et al.,

2008). Celui-ci reste néanmoins très controversé. Les coquillages constituent un potentiel véhicule de souches animales et humaines (Costantini et al., 2006), ce qui pourrait aboutir à la contamination humaine par un NoV animal voire par contamination multiple d'un même échantillon de coquillages, et ainsi favoriser la recombinaison et contribuer ainsi à l'émergence de nouvelles souches.

Toutes ces considérations, ajoutées au fait que la distance génétique entre les NoV animaux et humains est similaire à celle séparant les NoV de GI et GII (Vinje et al., 1997), soulèvent des questions importantes sur la spécificité d'hôte des NoV. Si les bovins sont des réservoirs à NoV, la prévalence des NoV devrait être déterminée à la fois sur des animaux en bonne santé et des animaux malades. Pour cela, il est important de continuer à étudier les NoV dans les espèces animales et chez l'homme et de développer des méthodes de détection permettant de mettre en évidence de telles transmissions interspécifiques à un stade précoce, comme le permettent les méthodes développées dans ce travail. Il est important que des recherches en collaboration entre les acteurs de la santé animale et de la santé humaine soient menées afin d'étudier ces aspects de manière concertée.

Les recherches doivent se poursuivre en prenant également en compte l'émergence de nouveaux pathogènes tels que le virus de l'hépatite E et les kobuvirus, notamment le virus Aïchi. La mondialisation facilitant les échanges, il est d'autant plus nécessaire de réaliser de larges études épidémiologiques afin de collecter des données cliniques.

Pour conclure, ce travail donne des outils et des pistes permettant de progresser dans le cadre général de l'analyse de risque liée aux NoV et a initié d'autres thématiques de recherche, notamment l'étude des interactions virus-hôte (NoV dans l'espèce bovine) et l'étude de la recombinaison *in vitro* (NoV murins).

6.

Résumé - Summary

RESUME

Les Norovirus (NoV), appartenant à la famille des *Caliciviridae*, sont une cause majeure d'épidémies et de cas sporadiques de gastroentérites hautement contagieuses chez l'homme. Leur transmission emprunte la voie fécale-orale et ils sont à l'origine d'une part importante des toxoinfections humaines d'origine alimentaire, en particulier dues à la consommation de mollusques bivalves. Ils possèdent un génome constitué d'ARN monocaténaire de polarité positive et sont classés par analyse de proximité génétique en cinq génogroupes, contenant chacun plusieurs génotypes.

Un problème majeur réside dans l'incapacité à multiplier facilement les NoV en culture de cellules. La RT-PCR est devenue la méthode de choix pour leur détection dans les échantillons de matières fécales, les denrées alimentaires et les prélèvements effectués dans l'environnement. Il est important de disposer de techniques à la fois sensibles et permettant également la détection d'un large panel de NoV. La quantification de la charge virale est possible par l'utilisation des techniques de RT-PCR en temps réel et est primordiale non seulement pour déterminer le niveau de contamination d'un prélèvement, mais également pour étudier et caractériser la pathogénie de l'infection à NoV.

Des NoV ont été détectés dans diverses espèces animales, dont l'espèce bovine. Ces découvertes ont soulevé d'importantes questions quant à une éventuelle transmission zoonotique et l'existence d'un réservoir animal pour les NoV. La caractérisation moléculaire des deux prototypes de NoV bovins, nommément le virus Newbury2 et le virus Jena, a révélé qu'ils étaient génétiquement proches et associés aux NoV humains. Parmi les hypothèses évoquées, les animaux pourraient être soit des porteurs passifs de NoV, soit infectés de manière active par ces virus, responsables dès lors d'une zoonose. Caractériser les NoV circulant chez l'homme et les espèces animales est intéressant dans le but d'étudier leurs voies de transmission et l'éventuel passage inter-espèces de ces virus.

Un mécanisme important d'évolution des NoV est la recombinaison, d'un grand intérêt dans l'étude des NoV, générant des modifications du génome viral et aboutissant à la création d'un génome « chimère » à partir de deux génomes parentaux différents. Elle crée ainsi de la variation génétique et par là l'émergence de nouveaux virus. En effet, il est bien documenté que la recombinaison se produit souvent parmi les NoV et contribue à la diversité génétique de ces virus ainsi qu'à l'apparition de nouvelles épidémies. La prévalence des souches de NoV recombinants peut être sous-estimée par le fait que la caractérisation des NoV est habituellement basée sur le séquençage partiel du gène de l'ARN polymérase ARN-dépendante uniquement, alors qu'idéalement il faudrait séquencer différentes parties du génome, dont également la protéine de capsid, pour identifier de tels virus. Il est important de déterminer précisément l'implication exacte de la recombinaison sur l'évolution des NoV afin de comprendre les mécanismes d'évolution des souches et l'avantage sélectif conféré pour certaines d'entre elles. Etudier ce mécanisme permettra de mieux comprendre l'avantage sélectif observé pour certains NoV et aidera à élucider les voies de transmission des NoV.

L'étude de ces deux points (transmission zoonotique et virus recombinants) est primordiale. En effet, le franchissement de la barrière d'espèce affecterait à la fois l'épidémiologie et l'évolution de ces virus, et compliquerait également le développement d'un vaccin ou d'un traitement. Dans certaines espèces animales, comme les chevaux ou les oiseaux, aucun NoV n'a été détecté à ce jour mais ces dernières années, des NoV ont été décrits dans de nombreuses espèces animales (chien, lion, mouton). Cela laisse donc présager d'une gamme d'espèces cibles encore plus étendue.

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude des voies de transmission des NoV avec comme objectif, après la mise au point de méthodes rapides et sensibles de détection et de quantification, d'apporter un éclaircissement aux questions importantes relatives à l'évolution des NoV et à leur catégorie d'hôte.

Dans un premier temps, la RT-PCR conventionnelle a été utilisée afin de détecter les NoV dans les espèces humaine et bovine. Ensuite, une RT-PCR utilisant la technologie SYBR Green a été développée et utilise un contrôle interne constitué d'ARN ajouté au même tube. Ce test est capable de détecter des NoV humains et bovins appartenant aux génogroupes I, II et III et permet de faire la distinction entre les NoV et le contrôle interne par l'analyse des courbes de dissociation. Une dilution 10 fois des échantillons s'est révélée la méthode de choix pour lever les inhibitions.

Afin de pouvoir confirmer directement le résultat et de permettre la quantification des NoV, une RT-PCR en temps réel utilisant la technologie TaqMan a été développée. Elle utilise un contrôle interne d'ARN et un standard d'ARN. De façon très intéressante, cette méthode peut détecter les NoV humains appartenant au génogroupes I, II et bovins du génogroupe III. Les inhibitions furent efficacement levées par une dilution 10 fois de l'échantillon ou l'ajout d'albumine de sérum bovin au mix de RT-PCR.

Ces deux RT-PCR en temps réel ont montré une sensibilité supérieure comparée à la RT-PCR conventionnelle.

Avec pour objectif de comprendre les voies de transmission des NoV, la situation en Belgique a été investiguée et des NoV humains et bovins ont été détectés et analysés par séquençage partiel. Des NoV appartenant à différents génogroupes ont été détectés : I et II chez l'homme et III chez les bovins. Par analyse de la proximité génétique, les NoV bovins se sont révélés de GIII.2 et les NoV humains de différents génotypes, mais majoritairement de GII.4.

Ces analyses ont également permis l'identification d'une co-infection et de deux recombinants naturels, ces derniers étant proches de génotypes différents en fonction de la région du génome analysée (polymérase ou capsid). L'identification de zones privilégiées pour la recombinaison dans la région située à la jonction de l'ORF (open reading frame) 1 et de l'ORF2 confirme l'importance de cette région dans ce mécanisme.

Afin d'étudier l'évolution des NoV bovins, un NoV bovin détecté en Belgique fut séquencé complètement (Bo/B309/2003/BE) et comparé à la souche originale Newbury2 (caractérisée dans les années '80).

D'une part, cette études a permis d'aboutir à la mise au point et la validation d'outils permettant la détection et l'étude les NoV humains et animaux, tant pour leur pathogénie, que leur évolution ou leurs voies de transmission.

D'autre part, basée sur le panel d'échantillons recueillis durant cette étude, l'analyse phylogénétique des NoV détectés va dans le sens des études réalisées dans d'autres pays tendant à montrer que les NoV bovins constituent un groupe de virus distincts, différents des NoV humains. Cela suggère que les NoV bovins ne représentent pas un risque pour la santé humaine. Néanmoins, la possibilité d'une infection zoonotique ou d'un réservoir animal ne peut pas être exclue vu la proximité de séquence entre les NoV humains et animaux et aussi la relation parfois très proche entre certaines populations humaines et les élevages d'animaux.

La détection d'une co-infection et de deux recombinants naturels démontre les possibilités d'évolution des NoV et l'importance d'une analyse complète de leur génome pour leur caractérisation.

Ce travail a été pionnier dans l'étude des NoV au laboratoire et a ouvert la voie à d'autres projets de recherche sur les NoV et à de nouvelles thèses de doctorat, notamment sur l'étude de l'interaction NoV-hôte (NoV dans l'espèce bovine) et l'étude de la recombinaison des NoV *in vitro* (NoV murins).

SUMMARY

Noroviruses (NoV), belonging to the family *Caliciviridae*, are a major cause of epidemic and sporadic cases of highly contagious gastroenteritis in human. Their transmission follows the fecal-oral way and they are a very important cause of human foodborne outbreaks, in particular due to the consumption of bivalve molluscs. Their genome is made of a positive single stranded RNA and they are classified by genetic analysis into 5 genogroups, each of those containing several genotypes.

NoV can not be multiplied in a cell culture system. The RT-PCR became the method of choice for their detection in stool, food and environmental samples. It is important to have sensitive techniques that can also detect a broad range of NoV. The quantification of the viral load is possible using real-time RT-PCR and is important, not only to estimate the contamination level of a sample, but also to study and characterize the pathogenesis of a NoV infection.

NoV were detected in several animal species, among which the bovine species. These discoveries raised important questions about a zoonotic transmission and the existence of an animal reservoir. The molecular characterization of the two prototypes of bovine NoV, namely Newbury2 virus and Jena virus, revealed that they are genetically close and associated with human NoV. Among the possible hypothesis, animals could be either passive carriers of NoV, or infected in an active way by these viruses, consequently responsible of a zoonosis. The characterization of NoV circulating in human and animal species is interesting in the aim of studying their transmission routes and the possible inter-species transmission.

An important mechanism for NoV evolution is recombination, of great interest in NoV study, leading to modifications of the viral genome after exchange of genomic segments. This creates genetic variation and the emergence of new viruses. Indeed, it is well documented that the recombination often occurs among NoV and contributes to the genetic diversity of these viruses as well as to the appearance of new epidemic strains. The prevalence of recombinant strains of NoV could be underestimated by the fact that the characterization of NoV is usually based only on the partial sequencing of the RNA-dependent RNA-polymerase gene only. Whereas ideally various parts of the genome, mainly the RNA-dependent RNA polymerase and the capsid protein, would be sequenced to identify such viruses. It is necessary to determine precisely the role of recombination in the evolution of NoV in order to understand the evolution of strains and selective advantages given to some of those.

The study of these two points (zoonotic transmission and recombinant viruses) is very important. Indeed, the cross of species barrier would affect at the same time the epidemiology and the evolution of these viruses, and would also complicate the capacity to develop a vaccine or a treatment. In other animal species, like horses or birds, no NoV was detected to date but these last years, NoV were described in several animal species (dog, lion, sheep). That lets predict a wider range of target species.

This work enters within the scope of the study of transmission routes of NoV with the objectives, after the development of fast and sensitive methods for detection and quantification, to give an explanation to important matters relating to the evolution of NoV and their host range.

Firstly, the conventional RT-PCR was used in order to detect NoV in human and bovine. Then, a real-time RT-PCR using SYBR Green technology was developed and used an internal control made up of RNA added in the same tube. This test is able to detect human and bovine NoV belonging to the genogroups I, II and III and makes it possible to make the distinction between NoV and the internal control by the analysis of melting curves. A 10-fold dilution of the samples appeared the method of choice to get rid of inhibition.

In order to confirm the result directly and to allow the quantification of NoV, a real-time RT-PCR using TaqMan technology was developed. It uses an internal control of RNA and also a RNA standard. In a very interesting way, this method can detect human NoV belonging to the genogroups I, II and bovine NoV of the genogroup III. Inhibitions were effectively raised by a 10-fold dilution of the sample or the addition of bovine serum albumin in the RT-PCR mix.

These two real-time RT-PCR showed a higher sensitivity compared to the conventional RT-PCR.

With the objective of understanding the transmission routes of NoV, the situation in Belgium was studied and human and bovine NoV were detected and analyzed using partial sequencing. NoV belonging to different genogroups were detected: I and II in human and III in bovine. By analysis of the genetic proximity, bovine NoV are close to GIII.2 and human NoV close to various genotypes, but mainly GII.4.

These analyses allowed the identification of two natural recombinants and a co-infection, the latter showed two different genotypes according to the part of the genome being analyzed (polymerase or capsid). The identification of a hot-spot for recombination at the junction of the ORF (open reading frame) 1 and ORF2 confirms the importance of this part of the genome for this mechanism.

In order to study the evolution of bovine NoV, a strain detected in Belgium was completely sequenced (Bo/B309/2003/BE) and compared with the original strain Newbury2 (detected in the 80s).

On one hand, this study made it possible to set up and validate tools allowing the detection and the study of human and animal NoV regarding their pathogenesis, evolution and transmission routes.

On the other hand, based on the database of samples collected during this study, the phylogenetic analysis of NoV detected and characterized goes into the direction of the studies carried out in other countries tending to show that bovine NoV make a group of distinct viruses, different from human NoV. It suggests that bovine NoV do not represent a risk for the human health. Nevertheless, the hypothesis of a zoonotic infection or an animal reservoir cannot be excluded considering the sequence proximity between human and animal NoV and also the close relationship between the human populations and the animal breedings.

The detection of a co-infection and two natural recombinants shows the evolution opportunities of NoV and the importance of a complete analysis of their genome for characterization.

This work was the first in the field of NoV in the laboratory and has opened the way for other research subjects on NoV and new PhD thesis, especially on the study of NoV-host interaction (NoV in bovine species) and the study of recombination *in vitro* (murine NoV).

Bibliographie

- Adams, W. R. and L. M. Kraft (1963). "Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent." *Science* **141**: 359-60.
- Adler, J. L. and R. Zickl (1969). "Winter vomiting disease." *J Infect Dis* **119**(6): 668-73.
- Agus, S. G., R. Dolin, R. G. Wyatt, A. J. Tousimis and R. S. Northrup (1973). "Acute infectious nonbacterial gastroenteritis: intestinal histopathology. Histologic and enzymatic alterations during illness produced by the Norwalk agent in man." *Ann Intern Med* **79**(1): 18-25.
- Ando, T., J. S. Noel and R. L. Fankhauser (2000). "Genetic classification of "Norwalk-like viruses." *J Infect Dis* **181**(Suppl 2): S336-48.
- Appleton, H. and P. G. Higgins (1975). "Letter: Viruses and gastroenteritis in infants." *Lancet* **1**(7919): 1297.
- Asanaka, M., R. L. Atmar, V. Ruvolo, S. E. Crawford, F. H. Neill and M. K. Estes (2005). "Replication and packaging of Norwalk virus RNA in cultured mammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(29): 10327-32.
- Atmar, R. L., F. H. Neill, J. L. Romalde, L. G. F., C. M. Woodley, T. G. Metcalf, et al. (1995). "Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR." *Appl Environ Microbiol* **61**: 3014-8.
- Atmar, R. L. and M. K. Estes (2001). "Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses." *Clin Microbiol Rev* **14**: 15-37.
- Baert, L., M. Uyttendaele, E. Van Coillie and J. Debevere (2008a). "The reduction of murine norovirus 1, B. fragilis HSP40 infecting phage B40-8 and E. coli after a mild thermal pasteurization process of raspberry puree." *Food Microbiol* **25**(7): 871-4.
- Baert, L., M. Uyttendaele, M. Vermeersch, E. Van Coillie and J. Debevere (2008b). "Survival and transfer of murine norovirus 1, a surrogate for human noroviruses, during the production process of deep-frozen onions and spinach." *J Food Prot* **71**(8): 1590-7.
- Baert, L., I. Vandekinderen, F. Devlieghere, E. Van Coillie, J. Debevere and M. Uyttendaele (2008c). "Inactivation of murine norovirus 1 and Bacteroides fragilis infecting phage B40-8 by the use of sodium hypochlorite and peroxyacetic acid as decontaminating agents for shredded iceberg lettuce." *Commun Agric Appl Biol Sci* **73**(1): 97-101.
- Baert, L., C. E. Wobus, E. Van Coillie, L. B. Thackray, J. Debevere and M. Uyttendaele (2008d). "Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real-time reverse transcription-PCR before and after heat exposure." *Appl Environ Microbiol* **74**(2): 543-6.
- Baert, L., M. Uyttendaele, A. Stals, V. A. N. C. E., K. Dierick, J. Debevere, et al. (2009). "Reported foodborne outbreaks due to noroviruses in Belgium: the link between food and patient investigations in an international context." *Epidemiol Infect* **137**(3): 316-25.
- Batten, C. A., I. N. Clarke, S. L. Kempster, S. L. Oliver, J. C. Bridger and P. R. Lambden (2006). "Characterization of a cross-reactive linear epitope in human genogroup I and bovine genogroup III norovirus capsid proteins." *Virology* **356**(1-2): 179-87.
- Belliot, G., S. V. Sosnovtsev, T. Mitra, C. Hammer, M. Garfield and K. Y. Green (2003). "In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells." *J Virol* **77**(20): 10957-74.
- Bertolotti-Ciarlet, A., S. E. Crawford, A. M. Hutson and M. K. Estes (2003). "The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein." *J Virol* **77**(21): 11603-15.
- Bishop, R., G. P. Davidson, I. H. Holmes and B. J. Ruck (1973). "Virus Particles in Epithelial Cells of Duodenal Mucosa from Children with Acute Non-Bacterial Gastroenteritis." *Lancet* **302**(7841): 1281-3.
- Bridger, J. C. and G. N. Woode (1975). "Neonatal calf diarrhoea: identification of a reovirus-like (rotavirus) agent in faeces by immunofluorescence and immune electron microscopy." *Br Vet J* **131**(5): 528-35.
- Bridger, J. C. (1980). "Detection by electron microscopy of caliciviruses, astroviruses and rotavirus-like particles in the faeces of piglets with diarrhoea." *Vet Rec* **107**(23): 532-3.
- Bridger, J. C., G. A. Hall and J. F. Brown (1984). "Characterization of a calici-like virus (Newbury agent) found in association with astrovirus in bovine diarrhoea." *Infect Immun* **43**: 133-8.
- Bridger, J. C. (1990). Small viruses associated with gastroenteritis in animals. *Viral diarrheas of*

- man and animals. L. J. Saif and K. W. Theil. Boca Raton, Fla, CRC Press: 161–82.
- Brown, D., J. Gray, P. MacDonald, A. Green, D. Morgan, G. Christopher, et al. (2002). "Outbreak of acute gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses among British military personnel--Afghanistan, May 2002." *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **51**: 477-9.
- Buesa, J., B. Collado, P. Lopez-Andujar, R. Abu-Mallouh, J. Rodriguez Diaz, A. Garcia Diaz, et al. (2002). "Molecular epidemiology of caliciviruses causing outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis in Spain." *J Clin Microbiol* **40**(8): 2854-9.
- Buesa, J., R. Montava, R. Abu-Mallouh, M. Fos, J. M. Ribes, R. Bartolome, et al. (2008). "Sequential evolution of genotype GII.4 norovirus variants causing gastroenteritis outbreaks from 2001 to 2006 in Eastern Spain." *J Med Virol* **80**(7): 1288-95.
- Bull, R. A., G. S. Hansman, L. E. Clancy, M. M. Tanaka, W. D. Rawlinson and P. A. White (2005). "Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap." *Emerg Infect Dis* **11**(7): 1079-85.
- Bull, R. A., E. T. Tu, C. J. McIver, W. D. Rawlinson and P. A. White (2006). "Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis." *J Clin Microbiol* **44**(2): 327-33.
- Bull, R. A., M. M. Tanaka and P. A. White (2007). "Norovirus recombination." *J Gen Virol* **88**(12): 3347-59.
- Burroughs, J. N. and F. Brown (1978). "Presence of a covalently linked protein on calicivirus RNA." *J Gen Virol* **41**(2): 443-6.
- Cannon, J. L., E. Papafragkou, G. W. Park, J. Osborne, L. A. Jaykus and J. Vinje (2006). "Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: aA comparison of murine norovirus and feline calicivirus." *J Food Prot* **69**(11): 2761-5.
- Caul, E. O. (1996). "Viral gastroenteritis: small round structured viruses, caliciviruses and astroviruses. Part I. The clinical and diagnostic perspective." *J Clin Pathol* **49**(11): 874-80.
- Chan, M. C., J. J. Sung, R. K. Lam, P. K. Chan, N. L. Lee, R. W. Lai, et al. (2006). "Fecal viral load and norovirus-associated gastroenteritis." *Emerg Infect Dis* **12**(8): 1278-80.
- Cheetham, S., M. Souza, T. Meulia, S. Grimes, M. G. Han and L. J. Saif (2006). "Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs." *J Virol* **80**(21): 10372-81.
- Chen, R., J. D. Neill, J. S. Noel, A. M. Hutson, R. I. Glass, M. K. Estes, et al. (2004). "Inter- and intragenus structural variations in caliciviruses and their functional implications." *J Virol* **78**(12): 6469-79.
- Chiba, S., S. Nakata, K. Numata-Kinoshita and S. Honma (2000). "Sapporo virus: history and recent findings." *J Infect Dis* **181**(Suppl 2): S303-8.
- Costantini, V., F. Loisy, L. Joens, F. S. Le Guyader and L. J. Saif (2006). "Human and animal enteric caliciviruses in oysters from different coastal regions of the United States." *Appl Environ Microbiol* **72**(3): 1800-9.
- Dastjerdi, A. M., J. Green, C. I. Gallimore, D. W. Brown and J. C. Bridger (1999). "The bovine Newbury agent-2 is genetically more closely related to human SRSVs than to animal caliciviruses." *Virology* **254**(1): 1-5.
- Dastjerdi, A. M., D. R. Snodgrass and J. C. Bridger (2000). "Characterisation of the bovine enteric calici-like virus, Newbury agent 1." *FEMS Microbiol Lett* **192**(1): 125-31.
- Daughenbaugh, K. F., C. S. Fraser, J. W. Hershey and M. E. Hardy (2003). "The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment." *EMBO J* **22**(11): 2852-9.
- Daughenbaugh, K. F., C. E. Wobus and M. E. Hardy (2006). "VPg of murine norovirus binds translation initiation factors in infected cells." *Virol J* **3**: 33.
- De Leon, R., S. M. Matsui, R. S. Baric, J. E. Herrmann, N. R. Blacklow, H. B. Greenberg, et al. (1992). "Detection of Norwalk virus in stool specimens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nonradioactive oligoprobes." *J Clin Microbiol* **30**(12): 3151-7.
- Deng, Y., C. A. Batten, B. L. Liu, P. R. Lambden, M. Elschner, H. Gunther, et al. (2003). "Studies of epidemiology and seroprevalence of bovine noroviruses in Germany." *J Clin Microbiol* **41**(6): 2300-5.
- Dingle, K. E. (2004). "Mutation in a Lordsdale norovirus epidemic strain as a potential indicator of transmission routes." *J Clin Microbiol* **42**(9): 3950-7.
- Duizer, E., P. Bijkerk, B. Rockx, A. De Groot, F. Twisk and M. Koopmans (2004a). "Inactivation of caliciviruses." *Appl Environ Microbiol* **70**(8): 4538-43.
- Duizer, E., K. J. Schwab, F. H. Neill, R. L. Atmar, M. P. Koopmans and M. K. Estes (2004b). "Laboratory efforts to cultivate noroviruses." *J Gen Virol* **85**(1): 79-87.

- Dunham, D. M., X. Jiang, T. Berke, A. W. Smith and D. O. Matson (1998). "Genomic mapping of a calicivirus VPg." *Arch Virol* **143**(12): 2421-30.
- Espy, M. J., J. R. Uhl, L. M. Sloan, S. P. Buckwalter, M. F. Jones, E. A. Vetter, et al. (2006). "Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing." *Clin Microbiol Rev* **19**(1): 165-256.
- Ettayebi, K. and M. E. Hardy (2003). "Norwalk virus nonstructural protein p48 forms a complex with the SNARE regulator VAP-A and prevents cell surface expression of vesicular stomatitis virus G protein." *J Virol* **77**(21): 11790-7.
- Fankhauser, R. L., S. S. Monroe, J. S. Noel, C. D. Humphrey, J. S. Bresee, U. D. Parashar, et al. (2002). "Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States." *J Infect Dis* **186**(1): 1-7.
- FAO/WHO (2008). *Viruses in food : scientific advice to support risk management activities. . Microbiological Risk Assessment Series No. 14. Rome: 151pp.*
- Farkas, T., S. Nakajima, M. Sugieda, X. Deng, W. Zhong and X. Jiang (2005). "Seroprevalence of noroviruses in swine." *J Clin Microbiol* **43**(2): 657-61.
- Gallimore, C. I., M. Iturriza-Gomara, J. Xerry, J. Adigwe and J. J. Gray (2007). "Inter-seasonal diversity of norovirus genotypes: emergence and selection of virus variants." *Arch Virol* **152**(7): 1295-303.
- Goller, J. L., A. Dimitriadis, A. Tan, H. Kelly and J. A. Marshall (2004). "Long-term features of norovirus gastroenteritis in the elderly." *J Hosp Infect* **58**(4): 286-91.
- Graham, D. Y., X. Jiang, T. Tanaka, A. R. Opekun, H. P. Madore and M. K. Estes (1994). "Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays." *J Infect Dis* **170**(1): 34-43.
- Granzow, H. and H. Schirrmeyer (1985). "Electron microscopy for direct detection of 32-nm viral particles in faeces of calves with diarrhoea." *Monatsh Veterinarmed* **40**(7): 228-9.
- Green, K. Y. (1997). "The role of human caliciviruses in epidemic gastroenteritis." *Arch Virol Suppl* **13**: 153-65.
- Green, K. Y., T. Ando, M. S. Balayan, T. Berke, I. N. Clarke, M. K. Estes, et al. (2000). "Taxonomy of the caliciviruses." *J Infect Dis* **181**(Suppl 2): S322-S30.
- Green, K. Y., R. M. Chanock and A. Z. Kapikian (2001). *Human caliciviruses. Fields Virology. D. M. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia (USA), Lippincott Williams and Wilkins. 1: 841-74.*
- Green, K. Y. (2007). *Caliciviridae: The Noroviruses. Fields Virology. B. N. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams and Wilkins: 949-79.*
- Gunther, H. and P. Otto (1987). "[Diarrhea in young calves. 7. "Zackenvirus" (Jena agent 117/80)--a new diarrhea pathogen in calves]." *Arch Exp Veterinarmed* **41**(6): 934-8.
- Guo, M., J. F. Evermann and L. J. Saif (2001). "Detection and molecular characterization of cultivable caliciviruses from clinically normal mink and enteric caliciviruses associated with diarrhea in mink." *Arch Virol* **146**(3): 479-93.
- Hale, A. D., S. E. Crawford, M. Ciarlet, J. Green, C. Gallimore, D. W. Brown, et al. (1999). "Expression and self-assembly of Grimsby virus: antigenic distinction from Norwalk and Mexico viruses." *Clin Diagn Lab Immunol* **6**(1): 142-5.
- Hale, A. D., T. N. Tanaka, N. Kitamoto, M. Ciarlet, X. Jiang, N. Takeda, et al. (2000). "Identification of an epitope common to genogroup 1 "norwalk-like viruses"." *J Clin Microbiol* **38**: 1656-60.
- Hall, G. A., J. C. Bridger, B. E. Brooker, K. R. Parsons and E. Ormerod (1984). "Lesions of gnotobiotic calves experimentally infected with a calicivirus-like (Newbury) agent." *Vet Pathol* **21**(2): 208-15.
- Han, M. G., J. R. Smiley, C. Thomas and L. J. Saif (2004). "Genetic recombination between two genotypes of genogroup III bovine noroviruses (BoNVs) and capsid sequence diversity among BoNVs and Nebraska-like bovine enteric caliciviruses." *J Clin Microbiol* **42**: 5214-24.
- Han, M. G., Q. Wang, J. R. Smiley, K. O. Chang and L. J. Saif (2005). "Self-assembly of the recombinant capsid protein of a bovine norovirus (BoNV) into virus-like particles and evaluation of cross-reactivity of BoNV with human noroviruses." *J Clin Microbiol* **43**(2): 778-85.
- Hardy, M. E. (2005). "Norovirus protein structure and function." *FEMS Microbiol Lett* **253**(1): 1-8.
- Harrington, P. R., J. Vinje, C. L. Moe and R. S. Baric (2004). "Norovirus capture with histo-blood group antigens reveals novel virus-ligand interactions." *J Virol* **78**(6): 3035-45.

- Helps, C., P. Lait, S. Tasker and D. Harbour (2002). "Melting curve analysis of feline calicivirus isolates detected by real-time reverse transcription PCR." *J Virol Methods* **106**: 241-4.
- Herbert, T. P., I. Brierley and T. D. Brown (1997). "Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation." *J Gen Virol* **78**(5): 1033-40.
- Hohne, M. and E. Schreier (2004). "Detection and characterization of norovirus outbreaks in Germany: application of a one-tube RT-PCR using a fluorogenic real-time detection system." *J Med Virol* **72**(2): 312-9.
- Hsu, C. C., C. E. Wobus, E. K. Steffen, L. K. Riley and R. S. Livingston (2005). "Development of a microsphere-based serologic multiplexed fluorescent immunoassay and a reverse transcriptase PCR assay to detect murine norovirus 1 infection in mice." *Clin Diagn Lab Immunol* **12**(10): 1145-51.
- Hsu, C. C., L. K. Riley, H. M. Wills and R. S. Livingston (2006). "Persistent infection with and serologic cross-reactivity of three novel murine noroviruses." *Comp Med* **56**(4): 247-51.
- Hsu, C. C., L. K. Riley and R. S. Livingston (2007). "Molecular characterization of three novel murine noroviruses." *Virus Genes* **34**(2): 147-55.
- Huang, P., T. Farkas, W. Zhong, M. Tan, S. Thornton, A. L. Morrow, et al. (2005). "Norovirus and histo-blood group antigens: demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns." *J Virol* **79**(11): 6714-22.
- Hutson, A. M., R. L. Atmar, D. Y. Graham and M. K. Estes (2002). "Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type." *J Infect Dis* **185**: 1335-7.
- Hutson, A. M., R. L. Atmar, D. M. Marcus and M. K. Estes (2003). "Norwalk virus-like particle hemagglutination by binding to h histo-blood group antigens." *J Virol* **77**(1): 405-15.
- Hutson, A. M., R. L. Atmar and M. K. Estes (2004). "Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors." *Trends Microbiol* **12**(6): 279-87.
- Ito, S., S. Takeshita, A. Nezu, Y. Aihara, S. Usuku, Y. Noguchi, et al. (2006). "Norovirus-associated encephalopathy." *Pediatr Infect Dis J* **25**(7): 651-2.
- Jiang, X., M. Wang, K. Wang and M. K. Estes (1993). "Sequence and genomic organization of Norwalk virus." *Virology* **195**(1): 51-61.
- Jiang, X., C. Espul, W. M. Zhong, H. Cuello and D. O. Matson (1999). "Characterization of a novel human calicivirus that may be a naturally occurring recombinant." *Arch Virol* **144**(12): 2377-87.
- Jiang, X., N. Wilton, W. M. Zhong, T. Farkas, P. W. Huang, E. Barrett, et al. (2000). "Diagnosis of human caliciviruses by use of enzyme immunoassays." *J Infect Dis* **181**(Suppl 2): S349-S59.
- Johansen, K., K. Mannerqvist, A. Allard, Y. Andersson, L. G. Burman, L. Dillner, et al. (2008). "Norovirus strains belonging to the GI.4 genotype dominate as a cause of nosocomial outbreaks of viral gastroenteritis in Sweden 1997--2005. Arrival of new variants is associated with large nation-wide epidemics." *J Clin Virol* **42**(2): 129-34.
- Jothikumar, N., P. Khanna, R. Paulmurugan, S. Kamatchiammal and P. Padmanabhan (1995). "A simple device for the concentration and detection of enterovirus, hepatitis E virus and rotavirus from water samples by reverse transcription-polymerase chain reaction." *J Virol Methods* **55**: 401-15.
- Jothikumar, N., J. A. Lowther, K. Henshilwood, D. N. Lees, V. R. Hill and J. Vinje (2005). "Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples." *Appl Environ Microbiol* **71**(4): 1870-5.
- Kageyama, T., M. Shinohara, K. Uchida, S. Fukushi, F. B. Hoshino, S. Kojima, et al. (2004). "Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan." *J Clin Microbiol* **42**(7): 2988-95.
- Kapikian, A. Z., R. G. Wyatt, R. Dolin, T. S. Thornhill, A. R. Kalica and R. M. Chanock (1972). "Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis." *J Virol* **10**(5): 1075-81.
- Kapikian, A. Z. and R. M. Chanock (1990). Norwalk group viruses. *Virology*. B. N. Fields, D. M. Knipe, R. M. Chanock et al. New-York. **1**: 671-93.
- Kapikian, A. Z., M. K. Estes and R. M. Chanock (1996). Norwalk Group of Viruses. *Fields Virology*. B. N. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia, Lippincott - Raven: 783-810.
- Kapikian, A. Z. (2000). "The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective." *J Infect Dis* **181**(Suppl 2): S295-302.

- Karst, S. M., C. E. Wobus, M. Lay, J. Davidson and H. W. t. Virgin (2003). "STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus." *Science* **299**(5612): 1575-8.
- Katayama, K., H. Shirato-Horikoshi, S. Kojima, T. Kageyama, T. Oka, F. Hoshino, et al. (2002). "Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses." *Virology* **299**(2): 225-39.
- Kim, K., J. Park, Y. Chung, D. Cheon, I. B. Lee, S. Lee, et al. (2002). "Use of internal standard RNA molecules for the RT-PCR amplification of the faeces-borne RNA viruses." *J Virol Methods* **104**: 107-15.
- Kleiboeker, S. B. (2003). "Applications of competitor RNA in diagnostic reverse transcription-PCR." *J Clin Microbiol* **41**(5): 2055-61.
- Koopmans, M., v. B. CH, J. Vinje, D. M. D. and S. Monroe (2002). "Foodborne viruses." *FEMS Microbiol Rev* **26**: 187-205.
- Koopmans, M. and E. Duizer (2004). "Foodborne viruses: an emerging problem." *Int J Food Microbiol* **90**(1): 23-41.
- Kreader, C. A. (1996). "Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein." *Appl Environ Microbiol* **62**(3): 1102-6.
- Kurth, A., J. F. Evermann, D. E. Skilling, D. O. Matson and A. W. Smith (2006a). "Prevalence of vesivirus in a laboratory-based set of serum samples obtained from dairy and beef cattle." *Am J Vet Res* **67**(1): 114-9.
- Kurth, A., D. E. Skilling and A. W. Smith (2006b). "Serologic evidence of vesivirus-specific antibodies associated with abortion in horses." *Am J Vet Res* **67**(6): 1033-9.
- Lambden, P. R., E. O. Caul, C. R. Ashley and I. N. Clarke (1993). "Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus." *Science* **259**: 516-9.
- Lambden, P. R., B. Liu and I. N. Clarke (1995). "A conserved sequence motif at the 5' terminus of the Southampton virus genome is characteristic of the Caliciviridae." *Virus Genes* **10**(2): 149-52.
- Lantz, P. G., M. Matsson, T. Wadstrom and P. Radstrom (1997). "Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR." *J Microbiol Methods* **28**(3): 159-67.
- Laverick, M. A., A. P. Wyn-Jones and M. J. Carter (2004). "Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage." *Lett Appl Microbiol* **39**(2): 127-36.
- Le Guyader, F., M. K. Estes, M. E. Hardy, F. H. Neill, J. Green, D. W. Brown, et al. (1996a). "Evaluation of a degenerate primer for the PCR detection of human caliciviruses." *Arch Virol* **141**: 2225-35.
- Le Guyader, F., F. H. Neill, M. K. Estes, S. S. Monroe, T. Ando and R. L. Atmar (1996b). "Detection and analysis of a small round-structured virus strain in oysters implicated in an outbreak of acute gastroenteritis." *Appl Environ Microbiol* **62**: 4268-72.
- Le Guyader, F., F. Loisy, R. L. Atmar, A. M. Hutson, M. K. Estes, N. Ruvoen-Clouet, et al. (2006). "Norwalk virus-specific binding to oyster digestive tissues." *Emerg Infect Dis* **12**(6): 931-6.
- Le Guyader, F. S., C. Mittelholzer, L. Haugarreau, K. O. Hedlund, R. Alsterlund, M. Pommepuy, et al. (2004). "Detection of noroviruses in raspberries associated with a gastroenteritis outbreak." *Int J Food Microbiol* **97**(2): 179-86.
- Lees, D. (2000). "Viruses and bivalve shellfish." *Int J Food Microbiol* **59**(1-2): 81-116.
- Li, X., R. Zhou, Y. Wang, H. Sheng, X. Tian, H. Li, et al. (2009). "Identification and characterization of a native epitope common to norovirus strains GII/4, GII/7 and GII/8." *Virus Res* **140**(1-2): 188-93.
- Lindell, A. T., L. Grillner, L. Svensson and B. Z. Wirgart (2005). "Molecular epidemiology of norovirus infections in Stockholm, Sweden, during the years 2000 to 2003: association of the GGIIb genetic cluster with infection in children." *J Clin Microbiol* **43**(3): 1086-92.
- Lindesmith, L., C. Moe, S. Marionneau, N. Ruvoen, X. Jiang, L. Lindblad, et al. (2003). "Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection." *Nat Med* **9**(5): 548-53.
- Lindesmith, L. C., E. F. Donaldson, A. D. Lobue, J. L. Cannon, D. P. Zheng, J. Vinje, et al. (2008). "Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations." *PLoS Med* **5**(2): e31.
- Liu, B. L., P. R. Lambden, H. Gunther, P. Otto, M. Elschner and I. N. Clarke (1999). "Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses." *J Virol* **73**(1): 819-25.
- Lopman, B., H. Vennema, E. Kohli, P. Pothier, A. Sanchez, A. Negredo, et al. (2004). "Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant." *Lancet* **363**: 682-8.

- Lopman, B. A., D. W. Brown and M. Koopmans (2002). "Human caliciviruses in Europe." *J Clin Virol* **24**(3): 137-60.
- Lopman, B. A., G. K. Adak, M. H. Reacher and D. W. Brown (2003). "Two epidemiologic patterns of norovirus outbreaks: surveillance in England and Wales, 1992-2000." *Emerg Infect Dis* **9**(1): 71-7.
- Madeley, C. R. and B. P. Cosgrove (1976). "Letter: Caliciviruses in man." *Lancet* **1**(7952): 199-200.
- Marionneau, S., N. Ruvoen, B. Le Moullac-Vaidye, M. Clement, A. Cailleau-Thomas, G. Ruiz-Palacois, et al. (2002). "Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals." *Gastroenterology* **122**: 1967-77.
- Martella, V., M. Campolo, E. Lorusso, P. Cavicchio, M. Camero, A. L. Bellacicco, et al. (2007). "Norovirus in captive lion cub (*Panthera leo*)." *Emerg Infect Dis* **13**(7): 1071-3.
- Martella, V., E. Lorusso, N. Decaro, G. Elia, A. Radogna, M. D'Abrahamo, et al. (2008). "Detection and molecular characterization of a canine norovirus." *Emerg Infect Dis* **14**(8): 1306-8.
- Martinez, M. A., A. C. Alcalá, G. Carruyo, L. Botero, F. Liprandi and J. E. Ludert (2006). "Molecular detection of porcine enteric caliciviruses in Venezuelan farms." *Vet Microbiol* **116**(1-3): 77-84.
- Matsui, S. M. and H. B. Greenberg (2000). "Immunity to calicivirus infection." *J Infect Dis* **181**(Suppl 2): S331-5.
- Matthews, R. E. (1979). "Third report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Classification and nomenclature of viruses." *Intervirology* **12**(3-5): 129-296.
- Mattison, K., D. Shukla, A. Cook, F. Pollari, R. Friendship, D. Kelton, et al. (2007). "Human noroviruses in swine and cattle." *Emerg Infect Dis* **13**(8): 1184-8.
- Mattner, F., D. Sohr, A. Heim, P. Gastmeier, H. Vennema and M. Koopmans (2006). "Risk groups for clinical complications of norovirus infections: an outbreak investigation." *Clin Microbiol Infect* **12**(1): 69-74.
- Mauroy, A., A. Scipioni, E. Mathijs and E. Thiry (2007). "Les norovirus bovins, virus entériques méconnus dans l'espèce bovine." *Ann Méd Vét* **151**: 257-68.
- Mauroy, A., A. Scipioni, E. Mathijs, C. Miry, D. Ziant, C. Thys, et al. (2008). "Noroviruses and sapoviruses in pigs in Belgium." *Arch Virol* **153**(10): 1927-31.
- Mauroy, A., A. Scipioni, E. Mathijs, C. Saegerman, J. Mast, J. C. Bridger, et al. (2009). "Epidemiological study of bovine norovirus infection by RT-PCR and a VLP-based antibody ELISA." *Vet Microbiol* (**in press**).
- Mayo, M. A. (2002). "A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV." *Arch Virol* **147**(8): 1655-63.
- McDonnell, S., K. B. Kirkland, W. G. Hlady, C. Aristeguieta, R. S. Hopkins, S. S. Monroe, et al. (1997). "Failure of cooking to prevent shellfish-associated viral gastroenteritis." *Arch Intern Med* **157**: 111-6.
- Mead, P. S., L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, et al. (1999). "Food-related illness and death in the United States." *Emerg Infect Dis* **5**(5): 607-25.
- Meijerink, J., C. Mandigers, L. van de Locht, E. Tonnissen, F. Goodsaid and J. Raemaekers (2001). "A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR." *J Mol Diagn* **3**(2): 55-61.
- Menton, J. F., K. Kearney and J. G. Morgan (2007). "Development of a real-time RT-PCR and Reverse Line probe Hybridisation assay for the routine detection and genotyping of Noroviruses in Ireland." *Virol J* **4**: 86.
- Miller, W. A. and G. Koev (2000). "Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses." *Virology* **273**(1): 1-8.
- Milnes, A. S., S. H. Binns, S. L. Oliver and J. C. Bridger (2007). "Retrospective study of noroviruses in samples of diarrhoea from cattle, using the Veterinary Laboratories Agency's Farmfile database." *Vet Rec* **160**(10): 326-30.
- Monteiro, L., D. Bonnemaïson, A. Vekris, K. G. Petry, J. Bonnet, R. Vidal, et al. (1997). "Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model." *J Clin Microbiol* **35**(4): 995-8.
- Mumphrey, S. M., H. Changotra, T. N. Moore, E. R. Heimann-Nichols, C. E. Wobus, M. J. Reilly, et al. (2007). "Murine norovirus 1 infection is associated with histopathological changes in immunocompetent hosts, but clinical disease is prevented by STAT1-dependent interferon responses." *J Virol* **81**(7): 3251-63.
- Murata, T., N. Katsushima, K. Mizuta, Y. Muraki, S. Hongo and Y. Matsuzaki (2007). "Prolonged norovirus shedding in infants <or=6 months of age with gastroenteritis." *Pediatr Infect Dis J* **26**(1): 46-9.
- Nath, K., J. W. Sarosy, J. Hahn and C. J. Di Como (2000). "Effects of ethidium bromide and SYBR

- Green I on different polymerase chain reaction systems." *J Biochem Biophys Methods* **42**(1-2): 15-29.
- Nayak, M. K., G. Balasubramanian, G. C. Sahoo, R. Bhattacharya, J. Vinje, N. Kobayashi, et al. (2008). "Detection of a novel intergenogroup recombinant Norovirus from Kolkata, India." *Virology* **377**(1): 117-23.
- Nordgren, J., F. Bucardo, O. Dienus, L. Svensson and P. E. Lindgren (2008). "Novel light-upon-extension real-time PCR assays for detection and quantification of genogroup I and II noroviruses in clinical specimens." *J Clin Microbiol* **46**(1): 164-70.
- Nuanualsuwan, S. and D. O. Cliver (2002). "Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses." *J Virol Methods* **104**(2): 217-25.
- Ohlinger, V. H., B. Haas and H. J. Thiel (1993). "Rabbit hemorrhagic disease (RHD): characterization of the causative calicivirus." *Vet Res* **24**(2): 103-16.
- Okada, M., T. Tanaka, M. Oseto, N. Takeda and K. Shinozaki (2006). "Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities." *Arch Virol* **151**(8): 1635-41.
- Oliver, S. L., A. M. Dastjerdi, S. Wong, L. El-Attar, C. Gallimore, D. W. Brown, et al. (2003). "Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans." *J Virol* **77**: 2789-98.
- Oliver, S. L., D. W. Brown, J. Green and J. C. Bridger (2004). "A chimeric bovine enteric calicivirus: evidence for genomic recombination in genogroup III of the Norovirus genus of the Caliciviridae." *Virology* **326**(2): 231-9.
- Oliver, S. L., E. Asobayire, A. M. Dastjerdi and J. C. Bridger (2006a). "Genomic characterization of the unclassified bovine enteric virus Newbury agent-1 (Newbury1) endorses a new genus in the family Caliciviridae." *Virology* **350**(1): 240-50.
- Oliver, S. L., C. A. Batten, Y. Deng, M. Elschner, P. Otto, A. Charpilienne, et al. (2006b). "Genotype 1 and genotype 2 bovine noroviruses are antigenically distinct but share a cross-reactive epitope with human noroviruses." *J Clin Microbiol* **44**(3): 992-8.
- Oliver, S. L., E. Asobayire, A. Charpilienne, J. Cohen and J. C. Bridger (2007a). "Complete genomic characterization and antigenic relatedness of genogroup III, genotype 2 bovine noroviruses." *Arch Virol* **152**(2): 257-72.
- Oliver, S. L., E. Wood, E. Asobayire, D. C. Wathes, J. S. Brickell, M. Elschner, et al. (2007b). "Serotype 1 and 2 bovine noroviruses are endemic in cattle in the United Kingdom and Germany." *J Clin Microbiol* **45**(9): 3050-2.
- Parashar, U. D., L. Dow, R. L. Fankhauser, C. D. Humphrey, J. Miller, T. Ando, et al. (1998). "An outbreak of viral gastroenteritis associated with consumption of sandwiches: implications for the control of transmission by food handlers." *Epidemiol Infect* **121**(3): 615-21.
- Park, S. I., C. Jeong, H. H. Kim, S. H. Park, S. J. Park, B. H. Hyun, et al. (2007). "Molecular epidemiology of bovine noroviruses in South Korea." *Vet Microbiol* **124**(1-2): 125-33.
- Phan, T. G., T. Kuroiwa, K. Kaneshi, Y. Ueda, S. Nakaya, S. Nishimura, et al. (2006). "Changing distribution of norovirus genotypes and genetic analysis of recombinant GIIB among infants and children with diarrhea in Japan." *J Med Virol* **78**(7): 971-8.
- Phan, T. G., K. Kaneshi, Y. Ueda, S. Nakaya, S. Nishimura, A. Yamamoto, et al. (2007). "Genetic heterogeneity, evolution, and recombination in noroviruses." *J Med Virol* **79**(9): 1388-400.
- Prasad, B. V., M. E. Hardy, T. Dokland, J. Bella, M. G. Rossmann and M. K. Estes (1999). "X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid." *Science* **286**(5438): 287-90.
- Rabenau, H. F., M. Sturmer, S. Buxbaum, A. Walczok, W. Preiser and H. W. Doerr (2003). "Laboratory diagnosis of norovirus: which method is the best?" *Intervirology* **46**(4): 232-8.
- Reuter, G., H. Biro and G. Szucs (2007). "Enteric caliciviruses in domestic pigs in Hungary." *Arch Virol* **152**(3): 611-4.
- Richards, G. P., M. A. Watson, R. L. Fankhauser and S. S. Monroe (2004). "Genogroup I and II noroviruses detected in stool samples by real-time reverse transcription-PCR using highly degenerate universal primers." *Appl Environ Microbiol* **70**(12): 7179-84.
- Rockx, B., M. De Wit, H. Vennema, J. Vinje, E. De Bruin, Y. Van Duynhoven, et al. (2002). "Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study." *Clin Infect Dis* **35**(3): 246-53.
- Rohayem, J., J. Munch and A. Rethwilm (2005). "Evidence of recombination in the norovirus capsid gene." *J Virol* **79**(8): 4977-90.
- Rzezutka, A. and N. Cook (2004). "Survival of human enteric viruses in the environment and food." *FEMS Microbiol Rev* **28**(4): 441-53.

- Saif, L. J., E. H. Bohl, K. W. Theil, R. F. Cross and J. A. House (1980). "Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs." *J Clin Microbiol* **12**(1): 105-11.
- Sawyer, L. A., J. J. Murphy, J. E. Kaplan, P. F. Pinsky, D. Chacon, S. Walmsley, et al. (1988). "25- to 30-nm virus particle associated with a hospital outbreak of acute gastroenteritis with evidence for airborne transmission." *Am J Epidemiol* **127**(6): 1261-71.
- Schaffer, F. L., D. W. Ehresmann, M. K. Fretz and M. I. Soergel (1980). "A protein, VPg, covalently linked to 36S calicivirus RNA." *J Gen Virol* **47**(1): 215-20.
- Schreiber, D. S., N. R. Blacklow and J. S. Trier (1974). "The small intestinal lesion induced by Hawaii agent acute infectious nonbacterial gastroenteritis." *J Infect Dis* **129**(6): 705-8.
- Schwab, K. J., M. K. Estes, F. H. Neill and R. L. Atmar (1997). "Use of heat release and an internal RNA standard control in reverse transcription-PCR detection of Norwalk virus from stool samples." *J Clin Microbiol* **35**: 511-4.
- Schwab, K. J., F. H. Neill, R. L. Fankhauser, N. A. Daniels, S. S. Monroe, D. A. Bergmire-Sweat, et al. (2000). "Development of methods to detect "Norwalk-like viruses" (NLVs) and hepatitis A virus in delicatessen foods: application to a food-borne NLV outbreak." *Appl Environ Microbiol* **66**: 213-8.
- Scipioni, A., I. Bourgot, A. Mauroy, D. Ziant, C. Saegerman, G. Daube, et al. (2008a). "Detection and quantification of human and bovine noroviruses by a TaqMan RT-PCR assay with a control for inhibition." *Mol Cell Probes* **22**(4): 215-22.
- Scipioni, A., A. Mauroy, J. Vinje and E. Thiry (2008b). "Animal noroviruses." *Vet J* **178**(1): 32-45.
- Scipioni, A., A. Mauroy, D. Ziant, C. Saegerman and E. Thiry (2008c). "A SYBR Green RT-PCR assay in single tube to detect human and bovine noroviruses and control for inhibition." *Virology* **5**: 94.
- Siebenga, J. J., H. Vennema, B. Renckens, E. de Bruin, B. van der Veer, R. J. Siezen, et al. (2007). "Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006." *J Virol* **81**(18): 9932-41.
- Smiley, J. R., K. O. Chang, J. Hayes, J. Vinje and L. J. Saif (2002). "Characterization of an enteropathogenic bovine calicivirus representing a potentially new calicivirus genus." *J Virol* **76**: 10089-98.
- Smiley, J. R., A. E. Hoet, M. Traven, H. Tsunemitsu and L. J. Saif (2003). "Reverse transcription-PCR assays for detection of bovine enteric caliciviruses (BEC) and analysis of the genetic relationships among BEC and human caliciviruses." *J Clin Microbiol* **41**: 3089-99.
- Smith, A. W., D. E. Mattson, D. E. Skilling and J. A. Schmitz (1983). "Isolation and partial characterization of a calicivirus from calves." *Am J Vet Res* **44**(5): 851-5.
- Smith, A. W., D. E. Skilling, N. Cherry, J. H. Mead and D. O. Matson (1998a). "Calicivirus emergence from ocean reservoirs: zoonotic and interspecies movements." *Emerg Infect Dis* **4**: 13-20.
- Smith, J., R. B. Aylward, D. Salisbury, S. Wassilak and G. Oblapenko (1998b). "Certifying the elimination of poliomyelitis from Europe: advancing towards global eradication." *Eur J Epidemiol* **14**: 769-73.
- Souza, M., S. M. Cheetham, M. S. Azevedo, V. Costantini and L. J. Saif (2007). "Cytokine and antibody responses in gnotobiotic pigs after infection with human norovirus (HuNoV) genogroup II.4-HS66 strain." *J Virol* **104**(6): e42-6.
- Souza, M., M. S. Azevedo, K. Jung, S. Cheetham and L. J. Saif (2008). "Pathogenesis and immune responses in gnotobiotic calves after infection with the genogroup II.4-HS66 strain of human norovirus." *J Virol* **82**(4): 1777-86.
- Straub, T. M., K. Honer zu Bentrup, P. Orosz-Coghlan, A. Dohnalkova, B. K. Mayer, R. A. Bartholomew, et al. (2007). "In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses." *Emerg Infect Dis* **13**(3): 396-403.
- Sugieda, M., H. Nagaoka, Y. Kakishima, T. Ohshita, S. Nakamura and S. Nakajima (1998). "Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs." *Arch Virol* **143**(6): 1215-21.
- Sugieda, M. and S. Nakajima (2002). "Viruses detected in the caecum contents of healthy pigs representing a new genetic cluster in genogroup II of the genus "Norwalk-like viruses"." *Virus Res* **87**(2): 165-72.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar (2007). "MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0." *Mol Biol Evol* **24**(8): 1596-9.
- Tan, M., P. Huang, J. Meller, W. Zhong, T. Farkas and X. Jiang (2003). "Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to

- human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket." *J Virol* **77**(23): 12562-71.
- Tan, M., R. S. Hegde and X. Jiang (2004). "The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors." *J Virol* **78**(12): 6233-42.
- Trujillo, A. A., K. A. McCaustland, D. P. Zheng, L. A. Hadley, G. Vaughn, S. M. Adams, et al. (2006). "Use of TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus." *J Clin Microbiol* **44**(4): 1405-12.
- Tsang, O. T., A. T. Wong, C. B. Chow, R. W. Yung, W. W. Lim and S. H. Liu (2008). "Clinical characteristics of nosocomial norovirus outbreaks in Hong Kong." *J Hosp Infect* **69**(2): 135-40.
- van der Poel, W. H., J. Vinje, R. van der Heide, M. I. Herrera, A. Vivo and M. P. Koopmans (2000). "Norwalk-like calicivirus genes in farm animals." *Emerg Infect Dis* **6**(1): 36-41.
- van der Poel, W. H., H. van der Heide, F. Verschoor, H. Gelderblom, J. Vinje and M. P. Koopmans (2003). "Epidemiology of Norwalk-like virus infections in cattle in The Netherlands." *Vet Microbiol* **92**: 297-309.
- Vennema, H., E. de Bruin and M. Koopmans (2002). "Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction." *J Clin Virol* **25**: 233-5.
- Verbelen, V., M. Bodeus, M. G. Garrino, A. Scipioni, B. Kabamba, G. Daube, et al. (2004). "Hospital outbreak of gastroenteritis due to Norovirus in Belgium." *Acta Clin Belg* **59**(1): 30-3.
- Vinje, J. and M. P. Koopmans (1996). "Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands." *J Infect Dis* **174**: 610-5.
- Vinje, J., S. A. Altena and M. P. Koopmans (1997). "The incidence and genetic variability of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands." *J Infect Dis* **176**: 1374-8.
- Vinje, J. and M. P. Koopmans (2000). "Simultaneous detection and genotyping of "Norwalk-like viruses" by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format." *J Clin Microbiol* **38**: 2595-601.
- Vinje, J., H. Vennema, L. Maunula, C. H. von Bonsdorff, M. Hoehne, E. Schreier, et al. (2003). "International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses." *J Clin Microbiol* **41**(4): 1423-33.
- Wang, Q.-H., V. Costantini and L. J. Saif (2007). "Porcine enteric caliciviruses: Genetic and antigenic relatedness to human caliciviruses, diagnosis and epidemiology." *Vaccine* **25**(30): 5453-66.
- Wang, Q. H., M. G. Han, S. Cheetham, M. Souza, J. A. Funk and L. J. Saif (2005). "Porcine noroviruses related to human noroviruses." *Emerg Infect Dis* **11**(12): 1874-81.
- Wang, Q. H., M. Souza, J. A. Funk, W. Zhang and L. J. Saif (2006). "Prevalence of noroviruses and sapoviruses in swine of various ages determined by reverse transcription-PCR and microwell hybridization assays." *J Clin Microbiol* **44**(6): 2057-62.
- Ward, J. M., C. E. Wobus, L. B. Thackray, C. R. Erexson, L. J. Faucette, G. Belliot, et al. (2006). "Pathology of immunodeficient mice with naturally occurring murine norovirus infection." *Toxicol Pathol* **34**(6): 708-15.
- Wardley, R. C. and R. C. Povey (1977). "The clinical disease and patterns of excretion associated with three different strains of feline caliciviruses." *Res Vet Sci* **23**(1): 7-14.
- Waters, A., S. Coughlan and W. W. Hall (2007). "Characterisation of a novel recombination event in the norovirus polymerase gene." *Virology* **363**(1): 11-4.
- Widdowson, M. A., B. Rockx, R. Schepp, W. H. van der Poel, J. Vinje, Y. T. van Duynhoven, et al. (2005a). "Detection of serum antibodies to bovine norovirus in veterinarians and the general population in the Netherlands." *J Med Virol* **76**(1): 119-28.
- Widdowson, M. A., A. Sulka, S. N. Bulens, R. S. Beard, S. S. Chaves, R. Hammond, et al. (2005b). "Norovirus and foodborne disease, United States, 1991-2000." *Emerg Infect Dis* **11**(1): 95-102.
- Wilde, J., J. Eiden and R. Yolken (1990). "Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions." *J Clin Microbiol* **28**: 1300-7.
- Wilson, I. G. (1997). "Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification." *Appl Environ Microbiol* **63**(10): 3741-51.
- Wise, A. G., S. S. Monroe, L. E. Hanson, D. L. Grooms, D. Sockett and R. K. Maes (2004). "Molecular characterization of noroviruses detected in diarrhetic stools of Michigan and Wisconsin dairy calves: circulation of two distinct subgroups." *Virus Res* **100**(2): 165-77.

- Wobus, C. E., S. M. Karst, L. B. Thackray, K. O. Chang, S. V. Sosnovtsev, G. Belliot, et al. (2004). "Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages." *PLoS Biol* **2**(12): e432.
- Wolf, S., W. M. Williamson, J. Hewitt, M. Rivera-Aban, S. Lin, A. Ball, et al. (2007). "Sensitive multiplex real-time reverse transcription-PCR assay for the detection of human and animal noroviruses in clinical and environmental samples." *Appl Environ Microbiol* **73**(17): 5464-70.
- Wolf, S., W. Williamson, J. Hewitt, S. Lin, M. Rivera-Aban, A. Ball, et al. (2009). "Molecular detection of norovirus in sheep and pigs in New Zealand farms." *Vet Microbiol* **133**(1-2): 184-9.
- Woode, G. N. and J. C. Bridger (1978). "Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves." *J Med Microbiol* **11**(4): 441-52.
- Worobey, M. and E. C. Holmes (1999). "Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses." *J Gen Virol* **80**(10): 2535-43.
- Xi, J. N., D. Y. Graham, K. N. Wang and M. K. Estes (1990). "Norwalk virus genome cloning and characterization." *Science* **250**(4987): 1580-3.
- Zheng, D. P., T. Ando, R. L. Fankhauser, R. S. Beard, R. I. Glass and S. S. Monroe (2006). "Norovirus classification and proposed strain nomenclature." *Virology* **346**(2): 312-23.

Presses de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège

4000 Liège (Belgique)

D/2009/0480/20

ISBN 978-2-930404-58-5



9 782930 404585