

#### STAGEGEGEVENS

Stageperiode: 7 februari 2017 tot 9 juni 2017

Stageplaats: Instituut voor Landbouw-, Visserij- en voedingsonderzoek  
Eenheid Technologie en Voeding  
Brusselsesteenweg 370  
9090 Melle  
Tel. 09 272 30 00  
Fax 09 272 30 01

Stagementor: dr. ir. Els Van Coillie

Stagebegeleider: mevr. Hanne Lievens

## **SAMENVATTING**

### **Optimalisatie van een detectiemethode voor hepatitis E in varkenslever**

Het hepatitis E virus (HEV) veroorzaakt leverontsteking, net als de andere vijf hepatitis virussen (A, B, C, D en G). Het verschil zit vooral in de besmettingsroute, de klachten en de ernst van de ziekte. Zo kan HEV overgedragen worden van dier op mens via 3 verschillende wegen namelijk via fecaal-orale weg, via besmette levensmiddelen of via transfusie en bloeddonatie. Momenteel is HEV infectie moeilijk te behandelen maar de overdracht van het virus kan wel voorkomen worden.

De opzet van dit onderzoek is het optimaliseren van een detectiemethode voor HEV op basis van qPCR naar aanleiding van groeiende bezorgdheid over de overdracht van HEV via besmette levensmiddelen en in het bijzondere varkenslever.

In een eerste fase wordt de qPCR-detectiemethode geoptimaliseerd uitgaande van 3 methoden die beschreven zijn in de literatuur. Hierbij worden primer- en probecombinaties met bijhorende qPCR-programma's getest gebruikmakend van een HEV-gBlock fragment (= synthetisch DNA fragment dat een gedeelte van het HEV-genoom bevat). Hieruit is gebleken dat met de primer- en probecombinatie beschreven door Pas *et al* [1] de beste resultaten worden bekomen. Deze primer- en probecombinatie met bijhorende qPCR-programma is geselecteerd voor gebruik in verdere analyses. Als procescontrole wordt gebruik gemaakt van het murine norovirus waarvoor ook een primer- en probecombinatie met bijhorend qPCR-programma beschreven door Stals *et al* [2] getest wordt met behulp van het MNV-1 gBlock fragment.

Vervolgens wordt de reverse transcriptie stap of cDNA-synthese geoptimaliseerd aan de hand van het WHO HEV RNA referentiemateriaal. Dit referentiemateriaal wordt in verschillende verdunningen en hoeveelheden getest in de mastermix. De resultaten bekomen met 1 µl onverdund referentiemateriaal verschillen heel weinig met de te verwachte waarden waarbij besloten wordt om hiermee verder te werken telkens als controle voor de cDNA-synthese.

In een derde fase wordt de RNA-extractie gebruikmakend van de RNeasy Mini kit (Qiagen) getest aan de hand van humaan HEV positieve faecessuspensie en het murine norovirus lysaat waarvan de concentraties geschat zijn op ongeveer 9 log RNA kopijen/ml. De bekomen concentraties liggen in dezelfde grootteorde als de te verwachten concentraties.

In een laatste stap worden varkensleverstalen beënt met humaan HEV positieve faecessuspensie en murine norovirus lysaat. Het virus wordt vervolgens geconcentreerd volgens een protocol gebaseerd op het standaardprotocol van Wageningen bioveterinary research. Hierna wordt RNA geëxtraheerd, cDNA bereid en qPCR uitgevoerd zoals hierboven beschreven. Door vergelijking van het aantal gedetecteerde genomische kopijen met het aantal beënte wordt er een besluit getrokken over het verloop van het volledige proces.

Trefwoorden: Hepatitis E virus, RT-qPCR, RNA-/virusextractie, varkenslever

## **VOORWOORD**

Juni 2012 het moment waarop ik besloot om een sprong in het duister te wagen en dus overschakelde van studierichting Sociaal technische wetenschappen naar Chemie. Nu vijf jaar later met een secundair diploma Chemie en bijna een diploma Professionele bachelor Chemie afstudeerrichting Biochemie op zak heb ik geen enkele spijt van mijn keuze want bloed, zweet en vooral de vele tranen waren het meer dan waard. Ik ben heel blij dat ik dankzij het doorzettingsvermogen geworden ben tot wat ik nu ben.

Met het einde in zicht van mijn opleiding en in het bijzondere mijn stage zou ik graag een dankwoord willen geven. In eerste instantie wil ik graag dr. ir. Els Van Coillie bedanken voor het toevertrouwen van het delicaat stageonderwerp maar ook voor telkens klaar te staan met goede raad en daad met betrekking tot mijn bachelorproef. Ook mijn stagebegeleider Hanne Lievens verdient een woord van dank voor het nalezen van mijn bachelorproef. Naast mijn stagebegeleider en -mentor zou ik ook mijn dank willen betuigen aan dr. Nikki De Clercq voor haar praktische ondersteuning in het labo.

Als laatst zou ik ook mijn vrienden en familie willen bedanken voor de nodige steun en toeverlaat afgelopen drie jaar, en in het bijzondere mijn mama want zij heeft me doen inzien dat opgeven in moeilijke tijden geen optie is.

## INHOUDSOPGAVE

<b>SAMENVATTING</b> .....	<b>2</b>
<b>AFKORTINGENLIJST</b> .....	<b>6</b>
<b>FIGURENLIJST</b> .....	<b>7</b>
<b>TABELLENLIJST</b> .....	<b>8</b>
<b>1 VOORSTELLING STAGEPLAATS</b> .....	<b>9</b>
<b>2 PROBLEEMSTELLING EN OPDRACHT</b> .....	<b>10</b>
<b>3 THEORETISCHE ACHTERGROND</b> .....	<b>11</b>
3.1 VOEDSELGEBONDEN VIRUSSEN .....	11
3.2 HEPATITIS E VIRUS.....	11
<b>3.2.1 Introductie</b> .....	<b>11</b>
<b>3.2.2 Viruseigenschappen</b> .....	<b>12</b>
3.2.2.1 Genoomorganisatie.....	12
3.2.2.2 Genoomheterogeniteit .....	12
<b>3.2.3 Transmissiewegen</b> .....	<b>13</b>
3.2.3.1 Fecaal-orale weg .....	13
3.2.3.2 Besmette levensmiddelen.....	13
3.2.3.3 Transfusie en bloeddonatie .....	13
<b>3.2.4 Pathogenese bij de mens</b> .....	<b>14</b>
3.2.4.1 Symptomen.....	14
3.2.4.2 Acute en chronische hepatitis E .....	14
3.2.4.3 Hepatitis E virus infecties bij de mens .....	14
<b>3.2.5 Detectie van HEV-seropositiviteit bij de mens m.b.v. ELISA-test</b> .....	<b>14</b>
<b>3.2.6 Hepatitis E virus bij het varken</b> .....	<b>15</b>
<b>3.2.7 Preventie van hepatitis E besmetting</b> .....	<b>15</b>
3.3 DETECTIE VAN HEPATITIS E VIRUS .....	16
<b>3.3.1 Cultivatie</b> .....	<b>16</b>
3.3.1.1 2D/3D-celculturen .....	16
<b>3.3.2 Moleculaire detectie</b> .....	<b>16</b>
3.3.2.1 RT- qPCR .....	16
3.3.2.2 Beperkingen van moleculaire methoden.....	16
<b>3.3.3 Detectie van voedselgebonden virussen in complexe matrices zoals voedingsmiddelen</b> .....	<b>17</b>
3.3.3.1 Principe van cDNA-synthese/ reverse transcriptie stap .....	17

3.3.3.2	Principe van quantitative PCR (qPCR) .....	17
<b>4</b>	<b>MATERIAAL EN METHODEN.....</b>	<b>19</b>
	OPTIMALISATIE VAN DE DETECTIEMETHODE.....	19
4.1	QPCR.....	19
<b>4.1.1</b>	<b>HEV qPCR.....</b>	<b>19</b>
<b>4.1.2</b>	<b>MNV-1 qPCR (procescontrole) .....</b>	<b>21</b>
4.2	CDNA-SYNTHESE.....	22
4.3	RNA-EXTRACTIE.....	23
<b>4.3.1</b>	<b>Humaan HEV positief faecessuspensie.....</b>	<b>23</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Murine norovirus lysaat.....</b>	<b>24</b>
<b>4.3.3</b>	<b>RNA extractie uit leverstalen .....</b>	<b>24</b>
4.4	VIRUSCONCENTRATIE .....	24
<b>5</b>	<b>RESULTATEN EN DISCUSSIE .....</b>	<b>25</b>
5.1	QPCR.....	25
<b>5.1.1</b>	<b>HEV qPCR.....</b>	<b>25</b>
<b>5.1.2</b>	<b>MNV-1 qPCR .....</b>	<b>26</b>
5.2	CDNA-SYNTHESE.....	27
5.3	RNA-EXTRACTIE.....	29
<b>5.3.1</b>	<b>Humaan HEV positief faecessuspensie.....</b>	<b>29</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Murine norovirus lysaat.....</b>	<b>30</b>
5.4	VIRUSCONCENTRATIE .....	31
<b>6</b>	<b>ALGEMEEN BESLUIT .....</b>	<b>35</b>

## AFKORTINGENLIJST

HEV	Hepatitis E virus
MNV	Murine norovirus
RNA	Ribonucleïne acid/zuur
DNA	Deoxyribonucleïne acid/zuur
PCR	Polymerase Chain Reaction/ Polymerase kettingreactie
EDTA	Ethyleendiaminetetra-azijnzuur
rpm	revolutions per minute/ omwentelingen per minuut
WHO	World Health Organization
AbkFQ	Iowa Black Dark
MGB	Minor Groove Binding
6-FAM	6-carboxyfluoresceine

## FIGURENLIJST

Figuur 1	Organogram van het ILVO .....	9
Figuur 2	Structurele weergave van het HEV-genoom .....	12
Figuur 3	Transmissiewegen van HEV .....	13
Figuur 4	Principe van ELISA .....	15
Figuur 5	Voorbeeld van gemeten fluorescentie (y-as) die exponentieel toeneemt in functie van aantal cycli (x-as). De horizontale lijn komt overeen met de 'threshold' of drempelwaarde. ....	17
Figuur 6	Principe van detectie met een TaqMan probe [24] .....	18
Figuur 7	Voorbeeld van lineaire regressie waarbij Ct-waarden (y-as) uitgezet wordt in functie van log concentratie (x-as) .....	18
Figuur 8	RNA-extractiestappen volgens de RNeasy Mini kit .....	23
Figuur 9	Standaardcurves bekomen aan de hand van de 3 geteste primer/probe combinaties en bijhorende qPCR programma's uit de literatuur. Standaardcurves zijn gebaseerd op een 10-voudige seriële verdunningsreeks van het HEV-gBlock fragment ( $10^5$ - $10^1$ DNA kopijen/ reactie) en uitgevoerd in drievoud. Standaardcurves bekomen met primer- en probecombinatie beschreven door (A) Jothikumar et al, (B) Martin Latil et al, (C) Pas et al. ....	26
Figuur 10	Standaardcurve bekomen aan de hand van de geteste primer/probe combinatie en bijhorend qPCR programma beschreven door Stals et al (2009). De standaardcurve is gebaseerd op een 10-voudige seriële verdunningsreeks van het MNV-1 gBlock fragment in ( $10^5$ - $10^1$ DNA kopijen/reactie) en uitgevoerd in drievoud. ....	26
Figuur 11	Standaardcurve bekomen door een 10-voudige seriële verdunningsreeks van het HEV-gBlock fragment ( $10^5$ - $10^1$ DNA kopijen/reactie) en uitgevoerd in drievoud .....	28
Figuur 12	Standaardcurve bekomen door een 10-voudige seriële verdunningsreeks van het HEV-gBlock fragment ( $10^5$ - $10^1$ DNA kopijen/reactie) en uitgevoerd in drievoud .....	29
Figuur 13	Standaardcurve bekomen door een 10-voudige seriële verdunningsreeks van het HEV-gBlock fragment ( $10^5$ - $10^1$ DNA kopijen/reactie) en uitgevoerd in drievoud .....	29
Figuur 14	Omrekenen van bekomen concentratie tot uiteindelijke concentratie a.d.h.v. een voorbeeldconcentratie ( $2 \times 10^5$ cDNA kopijen in 25 $\mu$ l qPCR reactie).....	30
Figuur 15	Standaardcurve bekomen door een 10-voudige seriële verdunningsreeks van het MNV-1 gBlock fragment ( $10^5$ - $10^1$ DNA kopijen/reactie) en uitgevoerd in drievoud .....	31
Figuur 16	Omrekenen van bekomen concentratie tot uiteindelijke concentratie a.d.h.v. een voorbeeldconcentratie ( $2 \times 10^6$ cDNA kopijen in 25 $\mu$ l qPCR reactie).....	31
Figuur 17	Standaardcurve bekomen door een 10-voudige seriële verdunningsreeks van het HEV-gBlock fragment ( $10^5$ - $10^1$ DNA kopijen/reactie) en uitgevoerd in drievoud .....	32
Figuur 18	Omrekenen van bekomen concentratie tot uiteindelijke concentratie a.d.h.v. een voorbeeldconcentratie ( $10^4$ cDNA kopijen in 25 $\mu$ l qPCR reactie) .....	32
Figuur 19	Standaardcurve bekomen door een 10-voudige seriële verdunningsreeks van het MNV-1 gBlock fragment ( $10^5$ - $10^1$ DNA kopijen/reactie) en uitgevoerd in drievoud .....	33
Figuur 20	Omrekenen van bekomen concentratie tot uiteindelijke concentratie a.d.h.v. een voorbeeldconcentratie ( $10^2$ cDNA kopijen in 25 $\mu$ l qPCR reactie) .....	34

## TABELLENLIJST

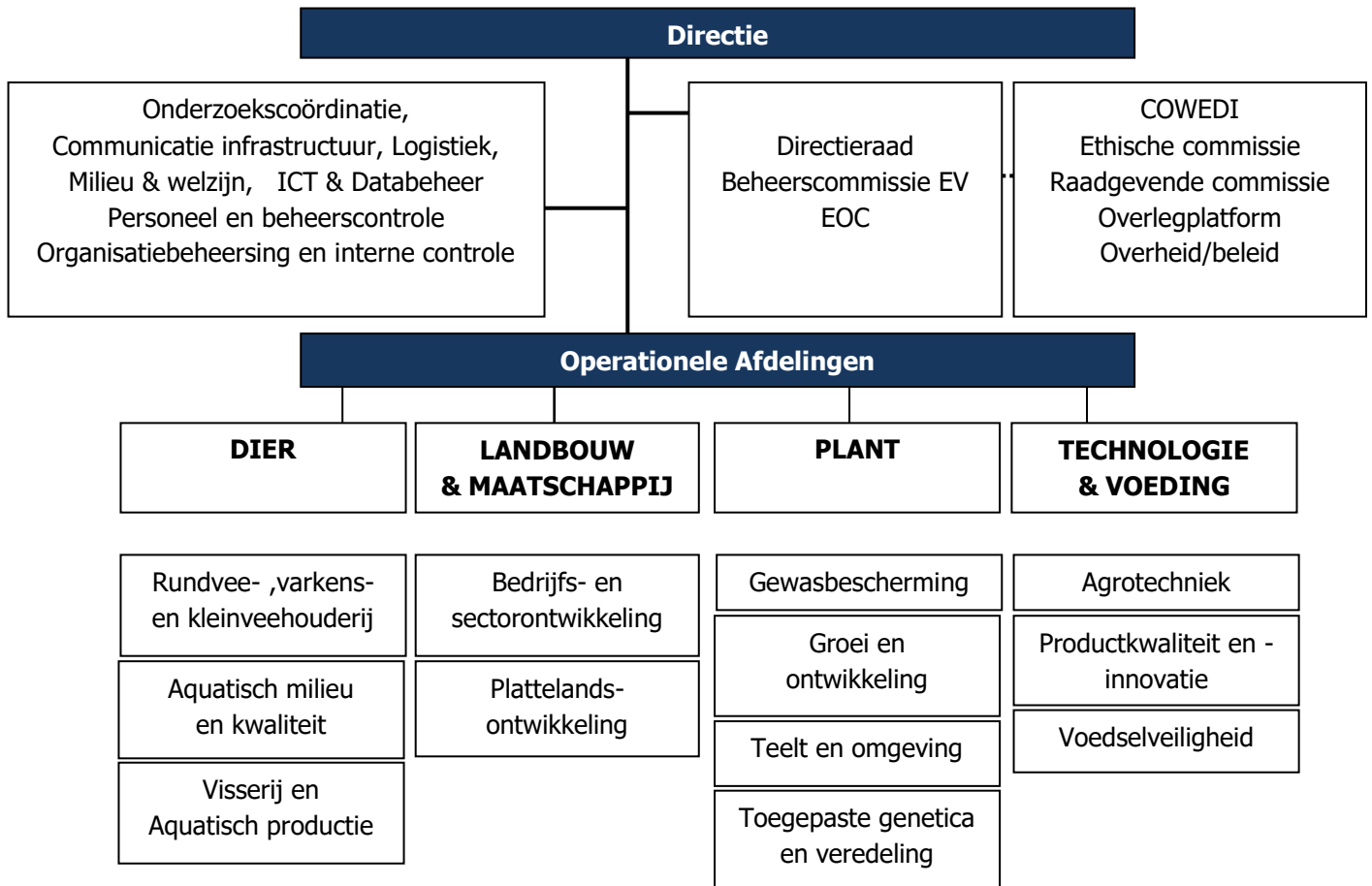
Tabel 1	Overzicht onderzoeksresultaten van HEV seroprevalentie bij varkens [16] .....	15
Tabel 2	Overzicht van de geteste primers en probes .....	19
Tabel 3	Overzicht tijd/temperatuurprofiel qPCR programma's uit de literatuur.....	20
Tabel 4	Finale primer- en probeconcentratie in de mastermix .....	21
Tabel 5	Primer-/probesequentie en tijd/temperatuursprogramma volgens Stals et al (2009) [2]..	21
Tabel 6	Overzicht hoeveelheid reactieproduct voor 1 reactie (totaal volume: 20 µl).....	22
Tabel 7	Resultaten: onverdund en verdund HEV RNA referentiemateriaal .....	27
Tabel 8	Resultaten: 1 µl of 5 µl template cDNA-synthese.....	28
Tabel 9	Resultaten: RNA-extractie van HEV positief faecessuspensie .....	29
Tabel 10	Resultaten: RNA-extractie van Murine norovirus lysaat .....	30
Tabel 11	Resultaten: virusconcentratie van willekeurige leverstalen .....	32
Tabel 12	Resultaten: virusconcentratie van willekeurige leverstalen .....	33



# 1 VOORSTELLING STAGEPLAATS

Het Instituut voor Landbouw-, Visserij- en Voedingsonderzoek (ILVO) is een wetenschappelijke en dienstverlenende instelling waar multidisciplinair onderzoek in de land- en tuinbouw, visserij en voeding verricht wordt. Door het multidisciplinair karakter van het onderzoek worden productiesystemen in hun totaliteit bekeken, met aandacht voor het eindproduct, maar ook voor de wijze van produceren en de gevolgen voor maatschappij, milieu, dier, landschap en biodiversiteit. [3]

Het ILVO bestaat uit 4 kenniseenheden en is gevestigd op campus Merelbeke/Melle en in Oostende voor het onderzoekdomein 'Visserij'. In het onderstaande organogram wordt de organisatie en structuur binnen het ILVO weergegeven (figuur 1).



Figuur 1 Organogram van het ILVO

Mijn onderzoek gedurende de stage behoort tot de eenheid Technologie & Voeding en meerbepaald bij het onderzoekdomein 'Voedselveiligheid'. Dit onderzoekdomein is gericht op zowel microbiologische als chemische voedselveiligheid.

## 2 PROBLEEMSTELLING EN OPDRACHT

Er is een groeiende bezorgdheid over het opduikende voedselgebonden virus Hepatitis E (HEV). Hepatitis E (HEV) is een RNA virus dat de leverziekte hepatitis veroorzaakt. Wetenschappelijk studies wijzen op zoönotische transmissie uit varkens. Consumptie van rauw of onvoldoende verhitte lever en leverworst afkomstig van geïnfecteerde dieren blijkt een risicofactor voor HEV infectie.

Er bestaan verschillende genotypen van HEV maar in geïndustrialiseerde landen komen voornamelijk genotype 3 en 4 voor, die via varkens kunnen worden overgedragen naar de mens. Het virus kan op verschillende manieren overgedragen worden. Als eerst kan het HEV zich bevinden in faeces van een besmet persoon of dier waardoor drinkwater of oppervlaktewater besmet kan geraken. Ook kan het virus overgebracht worden via besmet voedsel met als voornaamste bron varkenslever. Een laatste transmissieweg is via bloedtransfusie.

In de literatuur zijn meerdere methoden beschreven voor de detectie van hepatitis E uit voedingsmatrices. De opzet van dit onderzoek is de optimalisatie van een detectiemethode op basis van qPCR (= quantitative polymerase chain reaction) voor hepatitis E in lever afkomstig van varkens.

In de eerste fase worden verschillende qPCR's vergeleken die in de literatuur beschreven zijn. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een HEV-gBlock fragment (= synthetisch DNA fragment dat een gedeelte van het HEV genoom bevat) om de verschillende primers en probes te testen. De meest performante qPCR wordt weerhouden voor de optimalisatie van de virus/RNA-extractie stap.

In de tweede fase van het optimaliseren wordt gebruik gemaakt van HEV RNA referentiemateriaal zodat de werking van cDNA-synthese of de reverse transcriptie stap nagegaan kan worden. Dit materiaal wordt nadien ook telkens meegenomen als controle van cDNA-synthese bij elke analyse. Vervolgens gaat de aandacht vooral naar de RNA-extractie en de virusconcentratie. Het uitvoeren van de RNA-extractie gebeurt aan de hand van een RNeasy Mini kit aangemaakt door Qiagen. Nadien wordt een protocol getest voor virusconcentratie uit varkenslever.

### **3 THEORETISCHE ACHTERGROND**

#### **3.1 VOEDSELGEBONDEN VIRUSSEN**

Voedselgebonden virussen zijn een belangrijke bron voor wereldwijde voedselinfecties. De drie meest voorkomende virussen in Europa zijn norovirus, hepatitis A en hepatitis E.

Het norovirus is een besmettelijke virus dat een ontsteking in de darmen veroorzaakt, beter bekend als de ziekte 'buikgriep' [4]. Het virus wordt uitgescheiden in de faeces en het braaksel van besmette personen waardoor bijvoorbeeld drink- of oppervlaktewater kan besmet worden. Dit heeft tot gevolg dat het virus overgedragen kan worden op voedingswaren die in contact komen met besmette faeces of water. Rauwe oesters of andere schelp- en schaaldieren zijn risicovormende voedingswaren maar ook rauwe groenten en fruit kunnen besmet zijn met het norovirus [5]. Na het consumeren van de norovirusbevattende voeding kunnen verscheidene klachten optreden zoals misselijkheid, hoofdpijn, diarree, lichte koorts en hevige braken. De ziekte heeft een duur van 2 à 3 dagen en geneest vanzelf.

Het hepatitis A virus (HAV) wordt overgedragen via dezelfde voedingsmiddelen als deze beschreven voor het norovirus maar het HAV veroorzaakt een andere ontsteking namelijk aan de lever. HAV brengt ziekteverschijnselen als misselijkheid en koorts met zich mee. Bij sommige volwassenen kan HAV geelzucht teweegbrengen. Dit houdt in dat de huid en het oogwit geel kleurt, urine verdonkert en de ontlasting ontkleurt. Net als bij norovirus infectie geneest de ziekte uit zichzelf. [6]

Het hepatitis E virus veroorzaakt net als hepatitis A leverontsteking maar de ziekteverschijnselen zijn vaak ernstiger alsook de infectiebronnen zijn verschillend. HEV komt in geïndustrialiseerde landen voornamelijk voor in rauwe lever en leverproducten afkomstig van besmette varkens, maar ook andere bronnen kunnen aanleiding geven tot HEV-infectie.

#### **3.2 HEPATITIS E VIRUS**

##### **3.2.1 Introductie**

Om de betekenis van hepatitis te achterhalen kan het woord opgedeeld worden in twee stukken, enerzijds het stukje 'hepar' dat afkomstig is uit het Grieks wat lever betekent en anderzijds het achtervoegsel 'titis' dat staat voor ontsteking. Wanneer leverontsteking ontstaat door een virus dan wordt er gesproken van virale hepatitis. [7]

Er zijn zes verschillende virussen die aan de oorzaak liggen van leverontstekingen. De twee meest bekende zijn hepatitis A en B maar naast deze bestaan er nog vier minder bekende namelijk C, D, E en G. Deze laatste worden ook wel eens de 'non-A and non-B hepatitis' genaamd. Het gemeenschappelijke aan alle hepatitis virussen is dat ze besmettelijk zijn en zoals eerder gezegd leverontstekingen veroorzaken. Het verschil zit vooral in de besmettingsroute, de klachten en de ernst van de ziekte. [7] In deze bachelorproef wordt enkel dieper ingegaan op het hepatitis E virus (HEV).

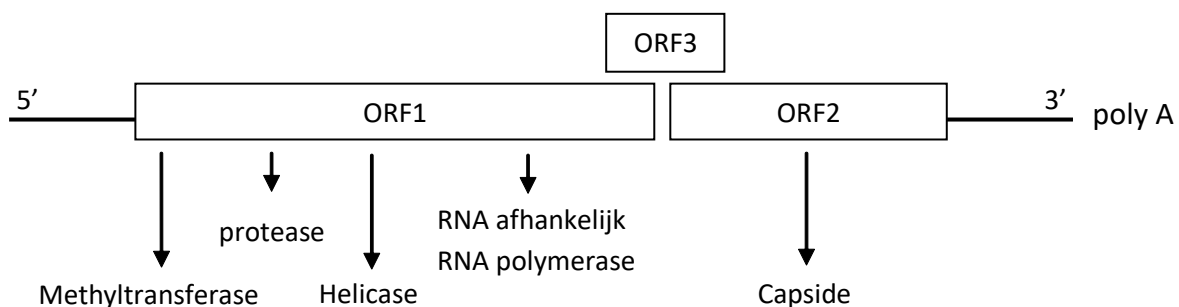
HEV infectie is een belangrijk wereldgezondheidsprobleem dat momenteel moeilijk te behandelen valt maar de overdracht van het virus kan wel voorkomen worden. Hepatitis E is ontdekt door het uitbreken van hepatitis met een onbekende etiologie in Kashmir Valley (India) in 1978. Enkele jaren later, in 1983, konden wetenschappers de moleculaire karakteristieken achterhalen.

### 3.2.2 Viruseigenschappen

Hepatitis E virus (HEV) is een positief enkelstrengig RNA virus zonder enveloppe en behoort tot de familie *Hepeviridae*. Het RNA heeft een totale grootte van 7,2 kilobasen<sup>1</sup> (kb). De viruspartikelen zelf hebben een diameter van ongeveer 27-35 nm. [8]

#### 3.2.2.1 Genoomorganisatie

Het HEV-genoom bestaat uit drie "open reading frames" (ORF) zoals te zien is op figuur 2. ORF1 codeert voor de niet-structurele proteïnen met functies zoals bijvoorbeeld methyltransferase, protease, helicase en RNA afhankelijk RNA-polymerase. De structurele of capside proteïnen worden gecodeerd door ORF2. ORF3 is het kleinst en overlapt ORF1 en ORF2. Van de proteïnen die ontstaan uit het ORF3 is de functie nog niet duidelijk. Ze zijn niet noodzakelijk voor virusvermeerdering noch voor virusassemblage. [9] [10]



Figuur 2 Structurele weergave van het HEV-genoom

#### 3.2.2.2 Genoomheterogeniteit

Door het genoom te analyseren zijn er meerdere genotypen ontdekt waarvan genotypen 1-4 het best gekend zijn. Genotype 1 en 2 zijn tot op heden enkel terug te vinden bij de mens en vooral in ontwikkelingslanden zoals Azië, Mexico, Noord- en Zuid- Afrika. De verspreiding van genotype 1 en 2 is te wijten aan slechte sanitaire voorzieningen en slechte hygiënische omstandigheden. De andere twee genotypen zijn zowel bij de mens als bij varkens en bepaalde andere dieren op te sporen. Deze twee types worden beschouwd als zoönotisch, met andere woorden deze zijn overdraagbaar van dier op mens. Genotype 3 heerst over de hele wereld, niet enkel in ontwikkelingslanden maar ook in geïndustrialiseerde landen.

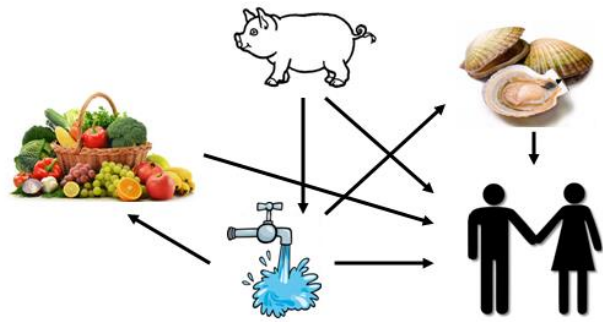
De genotypen verschillen in effectiviteit van de transmissie en ook in de ernst van de HEV-ziekte. Zo kan bijvoorbeeld genotype 4 ernstige symptomen veroorzaken bij geïnfecteerde patiënten. Mensen die besmet zijn met het genotype 3 vertonen meestal geen ziekteverschijnselen tenzij de persoon behoort tot een risicogroep waardoor hij/zij toch ziekteverschijnselen ontwikkelt.

<sup>1</sup> Kilobase = een lengte-eenheid van een DNA/RNA-fragment dat gelijk is aan 1000 nucleotiden.

### 3.2.3 Transmissiewegen

De overdracht van dier op mens gebeurt op 3 manieren (zie figuur 3):

- Fecaal-orale weg
- Besmette levensmiddelen
- Transfusie en bloeddonoratie



Figuur 3 Transmissiewegen van HEV

#### 3.2.3.1 Fecaal-orale weg

Varkens zijn de belangrijkste drager van het HEV genotype 3. Doordat het virus uitgescheiden wordt via fecale weg kunnen mensen rechtstreeks besmet worden door contact met besmette varkensfaeces of kan het virus terechtkomen in drinkwater of in oppervlaktewater (recreatie) waardoor andere organismen zoals de mens of schaaldieren geïnfecteerd kunnen worden. Hevige regenval of overstromingen kunnen ervoor zorgen dat het gemakkelijk en snel verspreidt over een groter gebied [8].

#### 3.2.3.2 Besmette levensmiddelen

Het consumeren van rauwe varkenslever of afgeleide producten hiervan verhoogt het risico op HEV-infecties. Het virus vermenigvuldigt zich in dit orgaan waardoor de lever een reservoir wordt voor het HEV. Uit studies is gebleken dat het virus kan overleven in voeding dus het is belangrijk om leverbevattende voedingsmiddelen een voldoende hittebehandeling te geven. [11]

Verder kunnen mogelijk andere levensmiddelen besmet geraken door contact met gecontamineerd water. Een eerste voorbeeld is groenten en fruit bijvoorbeeld doordat de boer zijn akkers of gewassen besproeit met HEV-besmet water. Een tweede voorbeeld zijn waterorganismen zoals schelp- of schaaldieren omdat zij zich voeden door voedingsstoffen uit het water te filtreren. Als het water virussen bevat, kunnen de schaaldieren op deze manier besmet raken. [8, 12]

#### 3.2.3.3 Transfusie en bloeddonoratie

Heel recent is onderzoek gedaan in Zuidoost Engeland naar HEV overdracht via bloed. Hierbij werden uit 225 000 donoren 79 donoren geselecteerd waar HEV werd gedetecteerd in het bloed maar die geen symptomen of abnormale leverfuncties vertoonden en waarbij ook geen anti-HEV IgM en IgG gevonden werden. Het bloed werd toegediend aan 43 personen. Bij 42% van deze groep werd HEV overgedragen maar slechts één vertoonde de symptomen [13]. Hieruit kan besloten worden dat bloeddonoratie een derde mogelijke bron van HEV-besmetting is. Besmet bloed kan het HEV-RNA ook overdragen op bloedproducten zoals serum, plasma of rode –en witte bloedcellen evenals kan het virus overgedragen worden via orgaantransplantaties. De overdracht van moeder op kind is incidenteel beschreven maar nog onvoldoende opgehelderd. [14]

### **3.2.4 Pathogenese bij de mens**

#### 3.2.4.1 Symptomen

De eerst verschijnselen die optreden na infectie met hepatitis E virus zijn gelijkwaardig aan de symptomen van griep. Misselijkheid, een slechte eetlust en koorts zijn een paar voorbeelden maar ook vermoeidheid, spierpijn en jeuk zijn aanwijzingen van een infectie. Wanneer de ernst van de infectie groot is, kunnen de symptomen uitlopen tot een vergrote lever en in slechter geval tot geelzucht. Verder kan de urine donker kleuren en de ontlasting ontkleuren. De vermelde ziekteverschijnselen zijn te verwarren met die van hepatitis A. [7]

#### 3.2.4.2 Acute en chronische hepatitis E

Er wordt gesproken van acute hepatitis wanneer de ontsteking van de lever plotseling en kortdurend opduikt. Vaak verloopt acute infectie zonder of met milde ziekteverschijnselen of complicaties. Duurt de ontsteking aan de lever langer dan zes maanden dan wordt er gesproken van chronische hepatitis. Dit laatste is zeldzamer dan acute hepatitis. Chronische hepatitis E kan in twee vormen voorkomen. In een eerste geval verloopt de ziekte mild en is er geen schade merkbaar aan de lever maar in het tweede geval kan de lever langzaam aan aangetast worden wat kan leiden tot levercirrose.

#### 3.2.4.3 Hepatitis E virus infecties bij de mens

Een groot gedeelte van de bevolking die besmet geraakt met het virus ontwikkelt geen duidelijke ziekteverschijnselen. Uitzonderingen op de regel zijn zwangere vrouwen, leverpatiënten of personen die lijden aan immunodeficiëntie<sup>1</sup>.

In ontwikkelingslanden ondervinden zwangere vrouwen, in hun derde trimester, grote complicaties bij een HEV-besmetting. Zo kan een abortus het gevolg zijn van een HEV-infectie of het kindje komt toch levend ter wereld maar dan zit de kans erin dat het enkele dagen na de geboorte alsnog sterft. [15]

Patiënten met een onderliggend leverprobleem of met immuunsuppressie hebben een verhoogde kans op een HEV-infectie. Doordat hun lichamelijke weerstand laag is, kan het HEV zijn symptomen doordrukken.

Mensen die beroepsmatig in contact komen met varkens vertonen een hogere seroprevalentie ten opzichte van de algemene populatie. Varkenshouders, medewerkers van het slachthuis en dierenartsen gespecialiseerd in varkens lopen een verhoogd risico op infectie maar weinig van deze personen ontwikkelen een HEV-ziektebeeld. [14]

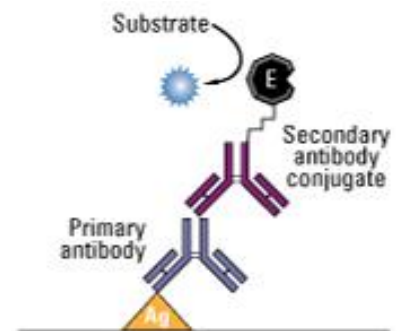
### **3.2.5 Detectie van HEV-seropositiviteit bij de mens m.b.v. ELISA-test**

Wanneer een persoon in contact komt met HEV worden antilichamen/immunoglobulinen (Ig), specifiek IgG en IgM, aangemaakt door het lichaam. Dit zijn stoffen die de antigenen of lichaamsvreemde stoffen van het HEV herkennen en neutraliseren. Om na te gaan of een persoon al dan niet besmet is geweest met HEV kan er gebruik gemaakt worden van een ELISA (=Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)-test die specifieke anti-HEV antilichamen opspoorde in serum of plasma. [16]

---

<sup>1</sup> Immunodeficiëntie= ziekte waarbij het afweersysteem van het lichaam tekortschiet.

Het principe van de ELISA-test is in figuur 4 terug te vinden. De primaire antilichamen afkomstig uit het serum of plasma binden op het antigeen (Ag) waarna het secundair antilichaam dat gelabeld is met een enzym kan hechten op het antigeen-bindend antilichaam. De finale detectie gebeurt na toediening van substraat. Bij aanwezigheid van antilichamen in de geteste stalen wordt het substraat omgezet en resulteert dit in een kleurverandering. Afhankelijk van de kleurintensiteit kan de hoeveelheid bepaald worden. [17]



Figuur 4 Principe van ELISA

### 3.2.6 Hepatitis E virus bij het varken

Het HEV bij varkens is pas ontdekt na een experiment waarbij het virus intraveneus toegediend werd aan het dier. Aan de hand van een real time PCR kon het HEV-genoom gedetecteerd worden in het bloed, de faeces en de lever. De resultaten waren verrassend omdat het virus wel aangetoond kon worden in het bloed maar er geen klinische symptomen optraden [9]. De verspreiding van het virus onder varkens kan dus heel snel maar ook onopmerkelijk verlopen. In tabel 1 wordt een overzicht van onderzoeksresultaten van HEV seroprevalentie bij varkens in verschillende Europese landen weergegeven.

Tabel 1 Overzicht onderzoeksresultaten van HEV seroprevalentie bij varkens [16]

Land	Seroprevalentie	referentie
Verenigd Koninkrijk	93 % (584/629)	Grierson <i>et al.</i> , 2015
België	73 % (613/840)	Thiry <i>et al.</i> , 2014
Nederland	73 % (803/1100)	Van der Poel <i>et al.</i> , 2014
Duitsland	65 % (216/332)	Dremsek <i>et al.</i> , 2013
Zwitserland	58 % (1161/2001)	Burn <i>et al.</i> , 2014
Frankrijk	31 % (2035/6565)	Rose <i>et al.</i> , 2011
Ierland	27 % (89/330)	O'Connor <i>et al.</i> , 2015
Spanje	20 % (233/1141)	Jimenez de Oya <i>et al.</i> , 2011

Doordat het virus zich vermenigvuldigt in het varken en uitgescheiden wordt via de faeces, gebeurt de overdracht tussen dieren via de orale-fecale weg of door direct contact met geïnfecteerde dieren. Het virus kan gedetecteerd worden bij besmette varkens vanaf 2 tot 3 weken na de inoculatie en de virusuitscheiding kan tot 7 weken duren. Uit studies blijkt dat vrouwelijke, infecteerde varkens het virus overzetten op hun jongen. Wanneer deze biggen een leeftijd bereiken van 9 weken kan het virus gedetecteerd worden omdat de maternale immuniteit verdwenen is. Op een leeftijd van 12 tot 15 weken scheiden ze het virus uit via de faeces. [9]

### 3.2.7 Preventie van hepatitis E besmetting

Wat vaccinatie betreft, is dit nog volop in ontwikkeling. Uit verschillende bronnen is geweten dat er in China een vaccin bestaat maar dit is niet vergund op de Europese markt [18]. In tussentijd is het hanteren van goede hygiëne bij het verwerken van varkensvlees een must maar het vermijden van gecontamineerd water is ook belangrijk.

Verder zou het virus in de lever en in leverproducten geïnactiveerd worden door een voldoende hoge en lange hittebehandeling. Volgens onderzoekers is verhitten bij 71°C gedurende 20 minuten noodzakelijk voor een totale inactivatie van het virus. [19]

### 3.3 DETECTIE VAN HEPATITIS E VIRUS

#### 3.3.1 Cultivatie

##### 3.3.1.1 2D/3D-celculturen

Celkweek is een techniek die ontstaan is om eukaryote cellen te laten leven en zelfs te laten groeien los van hun oorspronkelijk weefsel. In de jaren 40 en 50 van de 20<sup>ste</sup> eeuw werd de techniek van celculturen verder ontwikkeld om onder andere onderzoek naar virussen te ondersteunen. Virussen zijn niet op te kweken op voedingsbodems die gebruikt worden voor bacteriën maar door celculturen is kweken van virussen mogelijk. Door de ontdekking van celculturen zijn onderzoekers in staat virussen te laten groeien met onder andere als doeleinde vaccins te ontwikkelen. Voor replicatie van HEV zijn er 2 soorten celkweek beschreven namelijk tweedimensionale en driedimensionale celculturen. [20] Cellen kweken op een 2D-celcultuur gebeurt op polystyreen dat zeer stijf en onnatuurlijk is. De cellen verspreiden zich aan het plastic oppervlak en de gevormde cellen hechten aan de eiwitten die afzetten en denatureren aan synthetische oppervlak. Een groot nadeel aan 2D-celculturen is het gebrek aan metabolische gradiënten die wel aanwezig zijn in het lichaam. 3D-celcultuur is een betere techniek om natuurlijke weefsels en organen na te bootsen. De cellen synthetiseren een extracellulaire matrix en scheiden dit uit waardoor het driedimensionaal materiaal, dat flexibel en buigzaam is, sterk gaat lijken op natuurlijk weefsel. De cellen oefenen een kracht op elkaar uit wat zorgt dat ze kunnen bewegen en migreren zoals in het lichaam. Het opkweken van HEV in celculturen blijft echter zeer moeilijk. De HEV-replicatie verloopt zeer traag en over het algemeen is er geen duidelijk af te lezen resultaat van geïnfecteerde cellen. Het wordt momenteel voornamelijk gebruikt om de inactivatie van HEV na te gaan. [21]

#### 3.3.2 Moleculaire detectie

##### 3.3.2.1 RT- qPCR

Om HEV-RNA te detecteren uit lever of andere bronnen wordt er veelal gebruik gemaakt van reverse-transcription qPCR. qPCR is een kwantitatieve detectiemethode waarbij DNA geamplificeerd wordt en real time gedetecteerd wordt aan de hand van fluorescentie. Vermits HEV een RNA virus is, dient het genoom eerst een Reverse-Transcriptie stap te ondergaan, dit houdt in dat het HEV-RNA omgezet wordt naar complementair DNA (cDNA). Deze techniek wordt uitgebreider beschreven in het hoofdstuk 'materiaal en methode' omdat dit de detectiemethode is die toegepast wordt in deze bachelorproef.

##### 3.3.2.2 Beperkingen van moleculaire methoden

Alhoewel RT-qPCR een vrij snelle techniek is met een grote gevoeligheid, heeft deze techniek ook nadelen. In het RNA kunnen componenten afkomstig van de matrix aanwezig zijn die voor inhibitie van de RT-qPCR reactie zorgen. Ook kan bijvoorbeeld DNA uit de omgeving het staal contamineren wat vals-positieve resultaten kan opleveren. [22]



### 3.3.3 Detectie van voedselgebonden virussen in complexe matrices zoals voedingsmiddelen

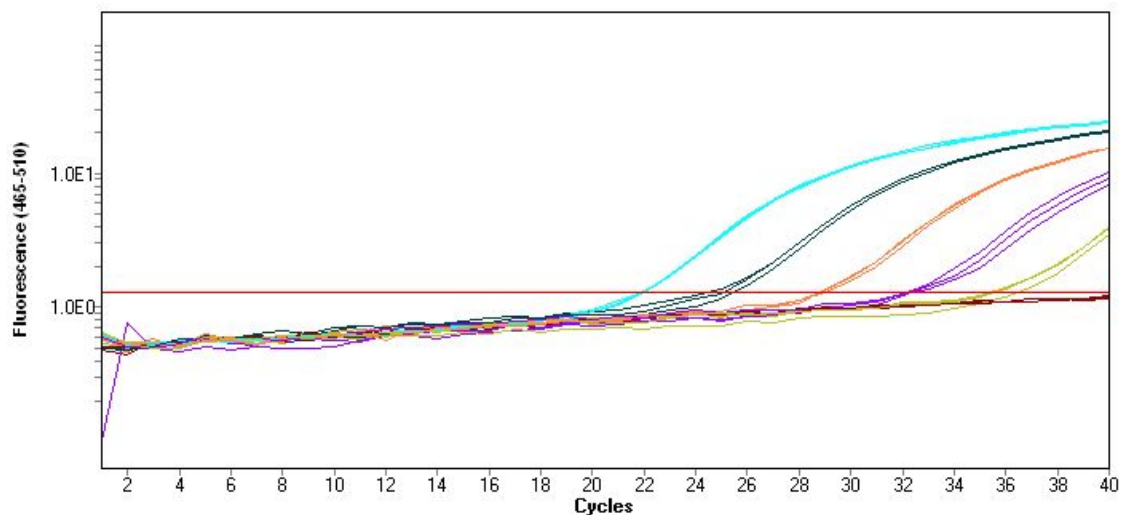
Voedingsmiddelen die besmet zijn met HEV moeten eerst de nodige staalvoorbereiding ondergaan voordat het virus gedetecteerd kan worden. Vertrekkend van het levensmiddel worden bepaalde reagentia toegevoegd zodat het virus geëxtraheerd wordt. Daarna wordt het RNA opgezuiverd uit het bekomen extract. Als laatste stap wordt het gezuiverd RNA omgezet tot complementair DNA (cDNA), ook wel reverse transcriptie stap genoemd. Dit cDNA kan dan gemeten worden met qPCR. Het gehele proces van staalvoorbereiding tot de bepaling wordt uitvoerig besproken in het stuk 'materiaal en methode'.

#### 3.3.3.1 Principe van cDNA-synthese/ reverse transcriptie stap

Doordat er enkel DNA geamplificeerd kan worden in de qPCR is het noodzakelijk om enkelstrengig RNA om te zetten in complementair DNA. Dit gebeurt door middel van cDNA synthese, reactie waarbij gebruik gemaakt wordt van een reverse transcriptie enzym, primers (bvb. Random hexamers), dNTP's en een specifieke buffer.

#### 3.3.3.2 Principe van quantitative PCR (qPCR)

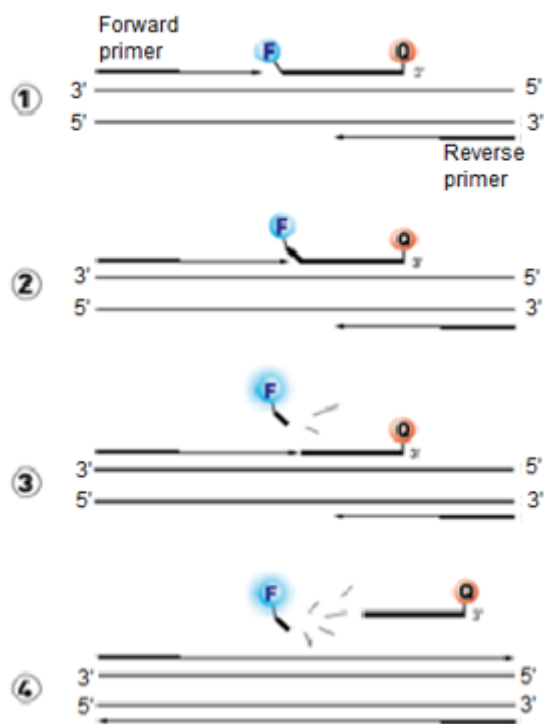
Real time PCR of quantitative PCR (qPCR) is een combinatie van DNA-amplificatie met onmiddellijke detectie door middel van fluorescentie in één stap. Dankzij Taq polymerase kunnen kleine stukjes DNA vermenigvuldigd worden bij herhaalde cyclussen van opwarming en denaturatie waarbij specifiek ontworpen primers aanhechten en verlengen door opeenvolgende aanhechting van complementaire nucleotiden. Doordat bij elke cycli meer en meer DNA gesynthetiseerd wordt, neemt de fluorescentie tijdens metingen in exponentiële fase toe en bereikt een plateau wanneer één van de reagentia gelimiteerd is (zie figuur 5). [23]



Figuur 5 Voorbeeld van gemeten fluorescentie (y-as) die exponentieel toeneemt in functie van aantal cycli (x-as). De horizontale lijn komt overeen met de 'threshold' of drempelwaarde.

Voor qPCR wordt veelal gebruik gemaakt van een specifieke fluorescent gemerkte probe voor detectie. De TaqMan® probe, ook wel gekend als 'double-dye oligonucleotide' of 'dual labelled probe', is het meest gebruikte type probe voor qPCR.

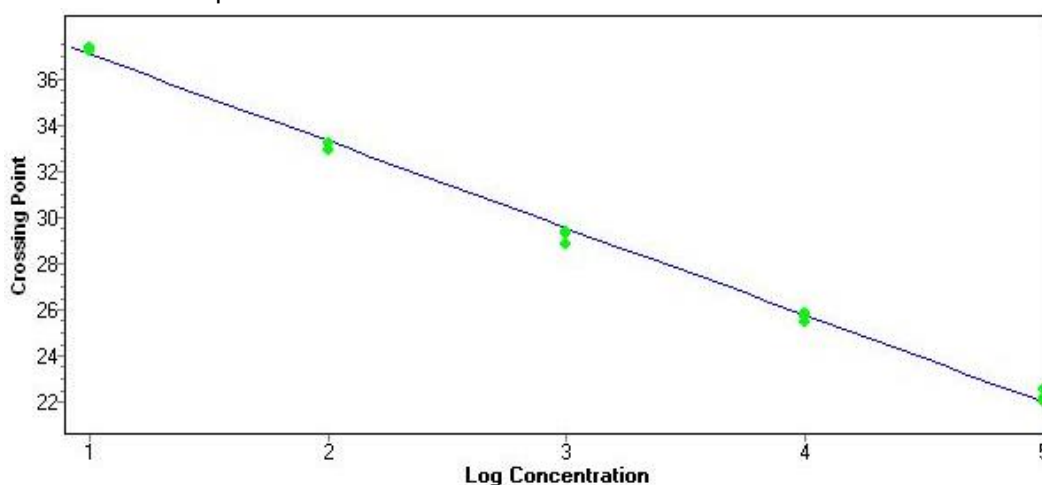
Zoals te zien is op figuur 6 bevindt het fluorofoor zich aan het 5'-uiteinde van de probe en de quencher aan het 3'-uiteinde. Het fluorofoor wordt in geëxciteerde toestand gebracht en brengt zijn energie over op de quencher waardoor er geen fluorescentie optreedt. Bij de aanhechtingsstap gaan de probe en primers binden op het amplicon. Hierna verlengt de sequentie dankzij de werking van Taq polymerase vanaf de primers en dit zorgt ervoor dat het 5'-uiteinde van de probe afgeknipt wordt. Dit proces splitst de fluorofoor en de quencher waardoor ze ruimtelijk gescheiden worden en dus de fluorofoor zijn energie niet meer kunnen overdragen op de quencher. Dit leidt tot toenemende fluorescentie dat gemeten wordt door het qPCR-toestel. [23]



Figuur 6 Principe van detectie met een TaqMan probe [24]

Taq polymerase is een enzym dat inactief is bij kamertemperatuur maar eens het zich bevindt bij 95°C en in de omgeving van het volledig gedeneureerd DNA, waarop de primers aangehecht zijn, treedt het enzym in werking. Zijn uiteindelijke functie is het incorporeren van de dNTP's/dUTP's op de gedeneureerde DNA-sequentie maar dit kan niet doorgaan zonder de aanwezigheid van MgCl<sub>2</sub>. Net zoals bij de cDNA-synthese is MgCl<sub>2</sub> een cofactor voor de Taq polymerase. De component heeft een werking zoals een katalysator, dit wilt zeggen dat MgCl<sub>2</sub> deelneemt aan de reactie maar na de reactie wordt het onveranderd teruggevonden.

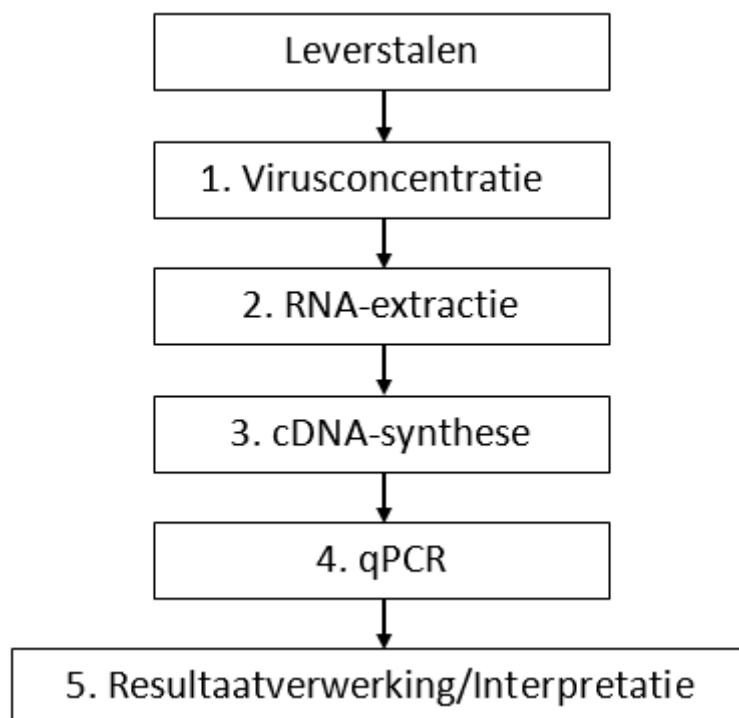
Voor kwantificatie wordt gebruik gemaakt van een directe verdunningsreeks van een gekende standaard. De bekomen Ct-waarden, zijnde de cycli waarbij de drempelwaarde wordt overschreden, worden vervolgens uitgezet in functie van de concentratie, wat leidt tot een standaardcurve (zie figuur 7). Door meting van de Ct-waarde van een ongekende staal kan d.m.v. de standaardcurve de concentratie worden bepaald.



Figuur 7 Voorbeeld van lineaire regressie waarbij Ct-waarden (y-as) uitgezet wordt in functie van log concentratie (x-as)

## 4 MATERIAAL EN METHODEN

### OPTIMALISATIE VAN DE DETECTIEMETHODE



Figuur 6 Flowchart qPCR detectiemethode voor HEV in varkenslever

#### 4.1 qPCR

##### 4.1.1 HEV qPCR

Optimalisatie van de qPCR is gebaseerd op drie HEV qPCR detectiemethodes beschreven in de literatuur [24] [25] [1], elk met hun eigen ontwikkelde primer- en probesequenties en qPCR-programma (zie tabel 2 en tabel 3). Primers en probes worden gesynthetiseerd door het Integrated DNA Technologies (IDT). Ze worden opgelost in de juiste hoeveelheid Tris-EDTA-buffer (TE-buffer), zoals vermeld op de bijgeleverde 'specification sheet', zodat een eindconcentratie van 100  $\mu$ M bekomen wordt. Vanuit een 100  $\mu$ M stockoplossing wordt een verdunde werkstock (20  $\mu$ M) aangemaakt door 40  $\mu$ l stock aan te lengen met 160  $\mu$ l TE-buffer. Voor de bereiding van TE-buffer wordt gebruik gemaakt van 1 M vloeibare tris-HCl (Gibco by life technologies, Verenigde Staten) en titriplex<sup>®</sup>II 0,1 mM EDTA (MERCK, Duitsland). Vijf ml tris-HCl en 0,0146 g EDTA worden afgewogen op de analytisch balans, samengevoegd en aangelengd tot 500 ml met gedestilleerd water. De TE-buffer wordt daarna gesteriliseerd bij 121°C gedurende 15 minuten.

Tabel 2 Overzicht van de geteste primers en probes

Literatuur	Forward primer Reverse primer Probe	primer/probe sequentie (5' tot 3')	Product lengte (bp)
A) Jothikumar <i>et al</i> (2006)	JVHEVF JVHEVR JVHEVP	GGTGGTTTCTGGGGTGAC AGGGGTTGGTTGGATGAA TGATTCTCAGCCCTTCGC	70

B) Martin Latil <i>et al</i> (2014)	HEV-5260-F HEV-5330-R HEV-5280-T	CGGTGGTTTCTGGGGTGAC AGGGGTTGGTTGGATGAATATAG GGGTTGATTCTCAGCCCTTCGC	71
C) Pas <i>et al</i> (2012)	HEV25 HEV26 HEV-MGB	CGGTGGTTTCTGGGGTGA GCRAAGGGRTTGGTTGG ATTCTCAGCCCTTCGC	75

De gebruikte Fluoroforen die zich bevinden aan 5' uiteinde van de verschillende probes zijn telkens 6-FAM. De gebruikte quenchers die zich bevinden aan 3' uiteinde van de verschillende probes zijn voor (A) en (B) AbkFQ en voor (C) MGB Eclipse.

Tabel 3 Overzicht tijd/temperatuurprofiel qPCR programma's uit de literatuur

Literatuur	Naam van de stap	Tijd - Temperatuur
A) Jothikumar <i>et al</i> (2006)	UNG*	2 min – 50°C
	Activatie	15 min – 95°C
	Amplificatie (40 cycli)	10 sec – 95°C
		20 sec – 55°C
		15 sec – 72°C
cooldown	10 sec – 40°C	
B) Martin Latil <i>et al</i> (2014)	UNG*	2 min – 50°C
	Activatie	15 min – 95°C
	Amplificatie (40 cycli)	15 sec – 95°C
		1 min – 60°C
		1 min – 65°C
cooldown	10 sec – 40°C	
C) Pas <i>et al</i> (2012)	UNG*	2 min – 50°C
	Activatie	15 min – 95°C
	Amplificatie (40 cycli)	15 sec – 95°C
		1 min – 60°C
		10 sec – 40°C

\* UNG = Uracil-N-glycosylase

Om een kwantitatieve meting uit te voeren met behulp van qPCR wordt er gebruik gemaakt van een HEV-gBlock fragment. Het gBlock fragment is een synthetisch DNA fragment dat een gedeelte van het HEV-genoom bevat. Dit gedeelte is gebaseerd op de partiële sequentie van het varkens HEV isolaat SW28IT (Genbank accessienummer: GU117636.1) en omvat de primer-probe bindingsregio's. Dit fragment wordt wederom aangemaakt door IDT en opgelost in 100 µl TE-buffer zodat er een finale stockconcentratie van 10 ng/µl wordt bekomen. Vervolgens wordt er een 1/10 verdunde werkoplossing aangemaakt met een finale concentratie van 1 ng/µl, waarna deze volledig wordt uitverdeeld over eppendorf buisjes. Per eppendorf buisje wordt telkens 2,2 µl van de werkoplossing, met een concentratie van 1 ng/µl, aangelengd met 97,8 µl nuclease vrij water. Het totaal volume van 100 µl bevat  $2 \times 10^7$  DNA kopijen van het HEV gBlock fragment/µl, en wordt per 5 µl verdeeld over 20 eppendorf buisjes, waarna ze bewaard worden bij -20°C. Een tienvoudige seriële verdunningsreeks in de range van  $2 \times 10^6$  –  $2 \times 10^0$  DNA kopijen gBlock fragment/µl wordt aangemaakt als standaardcurve en geanalyseerd in drievoud. Bij aanvang van een experiment wordt telkens 1 eppendorf buisje met een volume van 5 µl en een concentratie van  $2 \times 10^7$  DNA kopijen/µl uitgehaald, ontdooid op ijs en wordt er 45 µl nuclease vrij water toegevoegd. Vervolgens wordt er 5 µl over gepipetteerd in een ander eppendorf buisje dat 45 µl nuclease vrij water bevat. Dit wordt telkens herhaald tot de laagste concentratie namelijk  $2 \times 10^0$  DNA kopijen/µl.

De 3 verschillende primer/probe combinaties met bijhorende qPCR-programma's worden getest/vergeleken met behulp van een standaardcurve van  $10^5$  -  $10^1$  HEV-gblock DNA kopijen. Voor elke

primer/probe combinatie wordt een mastermix aangemaakt waarna telkens 20 µl mastermix wordt toegevoegd aan de desbetreffende wells van een Sapphire microplate 96 well plaat (Greiner Bio-one, Verenigde Staten). Hierna wordt aan elke well die een volume van 20 µl mastermix bevat, 5 µl template (= in dit geval HEV-gblock DNA fragment) toegevoegd. Dit resulteert in 25 µl reactiemengsels bestaande uit: 1 x TaqMan® Universal Mastermix (Applied Biosystems, Verenigd Koninkrijk), primers, probe (zie tabel 4) en 5 µl template. Nadat alle reactiemengsels zijn toegevoegd, wordt de plaat afgesloten met een zelfklevende Ampliseal™ folie (Greiner Bio-one, Verenigde Staten) en in een Lightcycler® 480 real-time PCR toestel (Roche Diagnostics, Duitsland) geplaatst. Voor elke verdunning van de standaardcurve (staal) wordt aan de hand van dit toestel Ct waarde bepaald.

Tabel 4 Finale primer- en probeconcentratie in de mastermix

<b>Forward primer Reverse primer Probe</b>	<b>Optimale concentratie (nM)</b>
JVHEVF	300
JVHEVR	300
JVHEVP	100
HEV-5260-F	600
HEV-5330-R	600
HEV-5280-T	250
HEV25	600
HEV26	900
HEV-MGB	100

In HEV qPCR reacties met cDNA bereid uit humaan HEV positieve faecessuspensie of uit varkenslever, al dan niet beënt met humaan HEV positieve faecessuspensie, wordt telkens 5 µl cDNA getest.

#### 4.1.2 MNV-1 qPCR (procescontrole)

Optimalisatie van de MNV qPCR is gebaseerd op een bestaande qPCR detectiemethode met primer- en probesequenties en qPCR-programma ontwikkeld door Stals *et al* (zie tabel 5). Primers en probe zijn evenals gesynthetiseerd door Integrated DNA Technologies (IDT) en worden op dezelfde wijze opgelost zoals beschreven in 4.1.1 HEV qPCR.

Tabel 5 Primer-/probesequentie en tijd/temperatuursprogramma volgens Stals *et al* (2009) [2]

<b>Forward primer Reverse primer Probe</b>	<b>primer/probe sequentie (5' tot 3')</b>	<b>Product lengte (bp)</b>	<b>Naam van de stap</b>	<b>Tijd - Temperatuur</b>
MNV-1 Fw-ORF1/ORF2 MNV-1 Rv-ORF1/ORF2 MNV-1 MGB-ORF1/ORF2	CACGCCACCGATCTGTTCTG GCGCTGCGCCATCACTC CGCTTTGGAACAATG	109	UNG Activatie Amplificatie (40 cycli) cooldown	2 min – 50°C 15 min – 95°C 15 sec – 95°C 1 min – 60°C 10 sec – 40°C

De gebruikte fluorofoor die zich bevindt aan 5' uiteinde van de probe is in dit geval 6-FAM. De quencher die zich bevindt aan 3' uiteinde van de probe is MGB Eclipse.

Om een kwantitatieve meting uit te voeren met behulp van qPCR wordt er gebruik gemaakt van een MNV-gBlock fragment. Het gBlock fragment is een synthetisch DNA fragment dat een gedeelte van het

MNV 1-genoom bevat. Dit gedeelte is gebaseerd op de partiële sequentie van het Murine norovirus 1 clone CW1 (Genbank accessienummer: DQ285629.1) en omvat de primer-probe bindingsregio's. Voor het aanmaken van het MNV-1 gBlock fragment tot het bekomen van de verdunningsreeks wordt verwezen naar het HEV-gBlock fragment (zie 4.1.1 HEV qPCR). De primer/probe combinatie met bijhorende qPCR-programma wordt getest met behulp van een standaardcurve van  $10^5$  -  $10^1$  MNV-1 gblock DNA kopijen. Hierbij wordt een 25  $\mu$ l reactiemengsel aangemaakt op dezelfde wijze als de HEV qPCR (zie 4.1.1) met als enige verschil dat de primers en probe een concentratie hebben van 200 nM.

In MNV-1 qPCR reacties met cDNA bereid uit murine norovirus lysaat of uit varkenslever, al dan niet beënt met MNV-1 lysaat, wordt telkens 5  $\mu$ l cDNA getest.

## 4.2 cDNA-SYNTHESE

HEV RNA referentie-materiaal (WHO, Duitsland) is gelyofiliseerd plasma met infectieus HEV RNA en wordt opgelost in 500  $\mu$ l nuclease vrij water zodat er een eindconcentratie van 250 000 RNA kopijen/ml bekomen wordt. Vervolgens wordt deze stock uitverdeeld over eppendorf buisjes met telkens een volume van 10  $\mu$ l. De 50 eppendorf buisjes hebben een concentratie van 250 RNA kopijen/ $\mu$ l en worden bewaard bij -20°C.

Optimalisatie van cDNA-synthese is gebaseerd op verdunningen van het HEV RNA referentiemateriaal waarbij eventuele inhibitie van het plasma waarin het materiaal zich bevindt, nagegaan wordt. Een eppendorf buisje met een concentratie van 250 RNA kopijen/ $\mu$ l wordt uitgehaald, ontdooid op ijs en 5  $\mu$ l wordt overgebracht in een andere eppendorf buisje waarbij 45  $\mu$ l nuclease vrij water toegevoegd wordt. Hierdoor wordt een 1/10 verdunning bekomen met een concentratie van 25 RNA kopijen/ $\mu$ l. Vervolgens wordt een 1/100 verdunning aangemaakt met behulp van 5  $\mu$ l 1/10 verdunning over te brengen in 45  $\mu$ l nuclease vrij water zodat dit eppendorf buisje een concentratie van 2,5 RNA kopijen/ $\mu$ l bevat. In eerst instantie worden 4 mastermixen aangemaakt in aparte microcentrifuge buisjes (zie tabel 6). Een volume van 1,00  $\mu$ l RNA-extract en 10,50  $\mu$ l mastermix 1 (1  $\mu$ l template) evenals een volume van 5  $\mu$ l RNA-extract en 6,50  $\mu$ l mastermix 1 (5  $\mu$ l template) worden samengevoegd in PCR-microcentrifuge buisjes en in de Thermal Cycler (MJ Research PTC-200, Verenigde Staten) geplaatst. Deze mix van RNA en primers wordt eerst blootgesteld aan een hittebehandeling bij 95°C gedurende 2 minuten. Deze hittebehandeling wordt uitgevoerd om op deze manier de afwezigheid van secundaire structuren (denaturatie nucleotidensequenties), een optimale primer binding, en bijgevolg cDNA synthese te garanderen. Na een verhitting wordt deze mix afgekoeld op ijs voor 2 minuten. Vervolgens wordt er 8,50  $\mu$ l van mastermix 2 toegevoegd aan de PCR-microcentrifuge buisjes. Reverse transcriptie vindt plaats in het GeneAmp PCR system 3700-toestel (Thermofisher Scientific, Verenigde Staten) met het volgende programma: 10 min bij 22°C, 15 min bij 42°C, 5 min bij 99°C en 5 min bij 5°C.

Tabel 6 Overzicht hoeveelheid reactieproduct voor 1 reactie (totaal volume: 20  $\mu$ l)

Mastermix 1	1 $\mu$ l template	5 $\mu$ l template
Nuclease vrij water (Qiagen, Duitsland)	9,50 $\mu$ l	5,50 $\mu$ l
Random Hexamers (Invitrogen, Verenigde Staten)	1,00 $\mu$ l	1,00 $\mu$ l
Mastermix 2		
MgCl <sub>2</sub> (Applied biosystems, Verenigde Staten)	4,00 $\mu$ l	4,00 $\mu$ l
10x PCR-buffer II (Applied biosystems, Verenigde Staten)	2,00 $\mu$ l	2,00 $\mu$ l
dNTP (20 mM) (GE healthcare Life Science, Verenigd Koninkrijk)	1,00 $\mu$ l	1,00 $\mu$ l
Rnase inhibitor (20 U/ $\mu$ l) (Applied biosystems, Verenigde Staten)	1,00 $\mu$ l	1,00 $\mu$ l
MultiScribe RT (50 U/ $\mu$ l) (Applied biosystems, Verenigde Staten)	0,50 $\mu$ l	0,50 $\mu$ l

Voor RNA bereid uit humaan HEV positieve faecessuspensie, uit murine norovirus lysaat of uit varkenslever wordt telkens 1  $\mu$ l gebruikt voor cDNA synthese.

### 4.3 RNA-EXTRACTIE

In figuur 8 worden de RNA-extractiestappen weergegeven aan de hand van RNeasy Mini kit (Qiagen, Duitsland). RNA-extractie wordt getest met humaan HEV positieve faecessuspensie en murine norovirus lysaat waarvan de grootteorde concentratie ongeveer gekend zijn. Telkens bij de start van een nieuwe kit moeten bepaalde oplossingen toegevoegd worden aan de nieuwe buffers. Zo moet 10  $\mu$ l  $\beta$ -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich™, Duitsland) toegevoegd worden per ml RTL buffer dus voor een totaalvolume van 45 ml RTL buffer wordt 450  $\mu$ l  $\beta$ -mercaptoethanol bijgevoegd. Ook moet 44 ml van 100% absolute ethanol (Chem-Lab NV, België) toegediend worden aan de geconcentreerde RPE-buffer. En een derde oplossing dat aangemaakt moet worden voor de tweede stap in de RNA-extractie is 50% ethanol. Dit kan door 12,5 ml 100% absolute ethanol samen te voegen met 12,5 ml RNase vrij water.



Figuur 8 RNA-extractiestappen volgens de RNeasy Mini kit

#### 4.3.1 Humaan HEV positief faecessuspensie

Een falcon met ongeveer 40 g HEV besmet faeces (geschatte concentratie ongeveer 9 log HEV kopijen/g) wordt per  $\pm$  1 g uitverdeeld over 15 ml falcons en wordt gesuspendeerd in  $\pm$  9 ml Phosphate buffered saline (PBS-buffer). Voor de bereiding van de PBS-buffer wordt er gebruik gemaakt van Phosphate buffered saline-tabletten (OXOID, Engeland). Afhankelijk van het totaal volume wordt het aantal tabletten opgelost in gedestilleerd water, bijvoorbeeld 2 tabletten oplossen in 200 ml gedestilleerd water. Daarna wordt de oplossing gesteriliseerd bij 115°C gedurende 10 minuten.

Vervolgens wordt 100  $\mu$ l HEV faecessuspensie overgebracht in een 1,5 ml microcentrifuge buisje en 600  $\mu$ l RTL-buffer wordt toegevoegd waarna het microcentrifuge buisje wordt geplaatst in Centrifuge 5417 C (Eppendorf, Duitsland) gedurende 3 minuten bij 14 000 rpm. Het supernatans wordt overgebracht in een proper microcentrifuge buisje waarbij 1 volume van 50% ethanol toegevoegd wordt. Deze suspensie wordt goed gemixt door pipetteren en nadien wordt 700  $\mu$ l overgebracht op een RNeasy spinkolom. De spinkolom wordt in de centrifuge geplaatst gedurende 20 seconden bij 10 000 rpm waarna het vloeibare afval, verzameld in de collectie tube, afgegoten wordt in een afvalvat. Deze stap wordt herhaald met de overgebleven suspensie uit het vorige microcentrifuge buisje. Vervolgens kunnen de wasstappen doorgaan waarbij eerst gewassen wordt met 700  $\mu$ l RW1-buffer en nadien met 500  $\mu$ l RPE-buffer. Tussen elke wasstap wordt gecentrifugeerd gedurende 20 seconden bij 10 000 rpm en wordt het vloeibaar afval, verzameld in de collectie tube, afgegoten in het afvalvat. In een laatste wasstap wordt opnieuw 500  $\mu$ l RPE-buffer op de spinkolom gebracht waarna gecentrifugeerd wordt gedurende 2 minuten bij 10 000 rpm. Vervolgens wordt na alle wasstappen de RNeasy spinkolom verwijderd van de collectie tube en geplaatst in een 1,5 ml microcentrifuge buisje waarin het RNA opgevangen wordt. Het elueren van het RNA gebeurt door middel van 30  $\mu$ l RNase vrij water op het membraan te brengen en te centrifugereren gedurende 1 minuut bij 10 000 rpm. Deze stap wordt een tweede keer herhaald zodat het RNA geëluëerd is in een totaalvolume van 60  $\mu$ l. Het RNA moet bewaard worden op ijs of kan

ingevroren worden bij -20°C afhankelijk wanneer de cDNA synthese kan plaatsvinden. Van het bekomen RNA wordt telkens 1 µl gebruikt voor de cDNA synthese.

#### **4.3.2 Murine norovirus lysaat**

De RNA-extractie vertrekkend van murine norovirus lysaat (geschatte concentratie ongeveer 9 log MNV kopijen/ml) verloopt op dezelfde wijze als deze van het humaan HEV positieve faecessuspensie (zie 4.3.1). Hier wordt ook telkens 1 µl van het bekomen RNA gebruikt voor de cDNA synthese.

#### **4.3.3 RNA extractie uit leverstalen**

Voor RNA-extractie uit leverstalen wordt gestart van 200 µl supernatans (zie 4.4) en worden dezelfde stappen doorlopen als deze van het humaan HEV positieve faecessuspensie (zie 4.3.1). Van het bekomen RNA wordt telkens 1 µl gebruikt voor de cDNA synthese.

#### **4.4 VIRUSCONCENTRATIE**

De te onderzoeken leverstalen en de leverstalen waarbij controlemateriaal toegevoegd wordt, worden telkens in drievoud getest. Met behulp van een mesje/schaartje en pincet wordt ongeveer 50 mg varkenslever afgesneden en in een 2,0 ml microcentrifuge buisje (Simport, Canada) met ±0,4 g zirconia/silica beads (BioSpec products, Verenigde Staten) gebracht. Vervolgens wordt er controlemateriaal (a en b) toegevoegd. In buisje 1a, 2a en 3a wordt telkens 10 µl HEV-positief humaan faecessuspensie toegevoegd aan 50 mg varkenslever als positieve controle en bij 50 mg lever in buisje 1b, 2b en 3b wordt 10 µl Murine norovirus lysaat toegediend als procescontrole. Een derde controle namelijk de negatieve controle is een buisje met 50 µl PBS-buffer. In een volgende stap wordt 950 µl TRIZOL/TRI reagent® (Sigma-Aldrich™, Verenigde Staten) toegevoegd aan alle buisjes. Nadien worden alle buisjes in de FastPrep homogenisator (MP Biomedicals, Verenigde Staten) geplaatst waarna het toestel 2 runs doorloopt gedurende 2 minuten aan een snelheid van 4 m/s. Belangrijk hierbij is dat alle buisjes na elke run gedurende 2 min op ijs geplaatst worden zodat de inhoud afgekoeld wordt en dus minder risico op RNA-afbraak is. Eens alles goed gehomogeniseerd is, worden de buisjes gecentrifugeerd gedurende 20 minuten bij 4000 g. Als laatste stap wordt 200 µl supernatans overgebracht in een proper 1,5 ml eppendorf buisje voor de RNA-extractie. Het overige supernatans wordt bewaard bij -20°C.

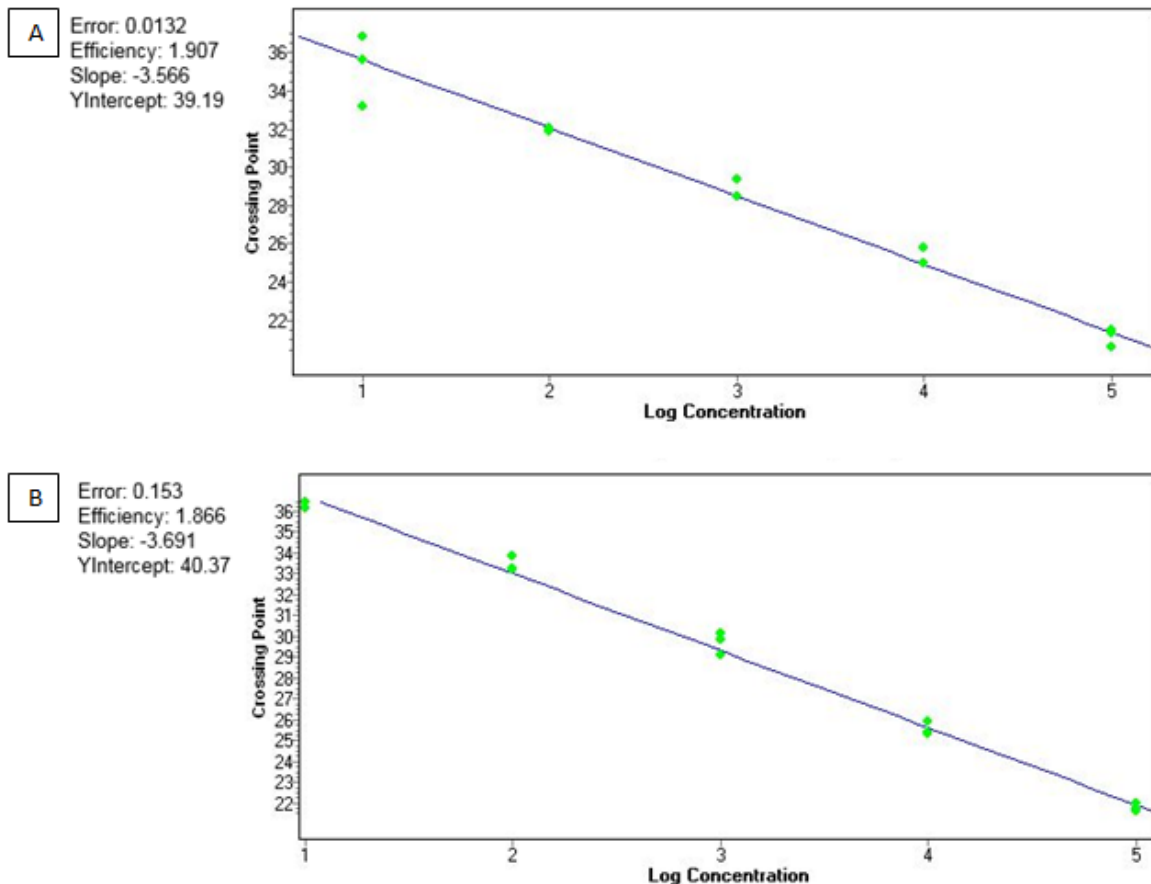


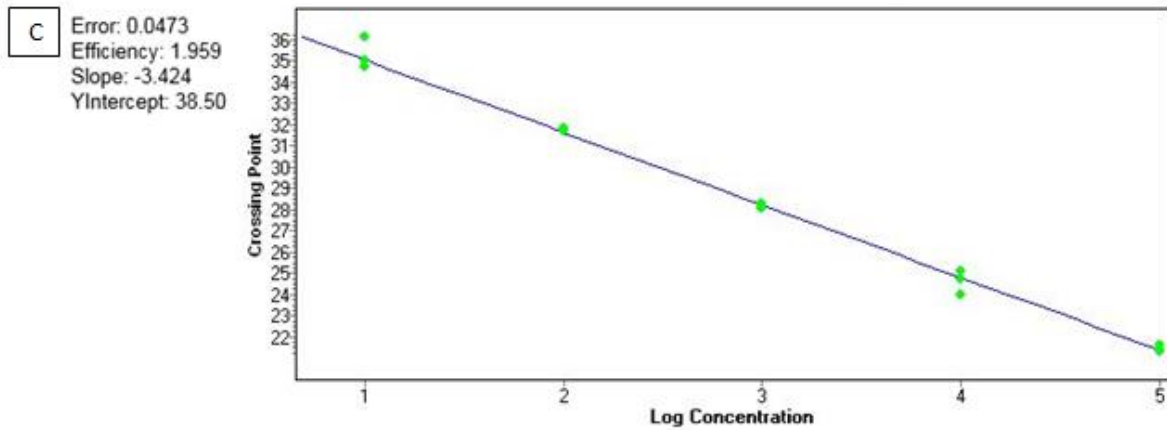
## 5 RESULTATEN EN DISCUSSIE

### 5.1 QPCR

#### 5.1.1 HEV qPCR

In figuur 9 worden de qPCR resultaten van de standaardcurves, bekomen aan de hand van de 3 geteste primer/probe combinaties met bijhorende qPCR programma's, weergegeven. De efficiëntie van een PCR reactie wordt berekend door middel van de helling van de standaardcurve met volgende vergelijking:  $\text{Efficiency} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ . Een ideale helling situeert zich rond -3,3 en resulteert bijgevolg in een 100% efficiënte qPCR reactie. Een voldoende efficiënte reactie bevindt zich in de range van 80-110% [23]. Het Y-intercept, zijnde het snijpunt van de standaardcurve met de Y-as, is de Ct-waarde (kwantificatiecyclus) voor 1 DNA kopij. Er wordt steeds gestreefd naar een zo gevoelig mogelijke methode. Bijgevolg, hoe lager de Ct-waarde van het Y-intercept, hoe gevoeliger de ontwikkelde qPCR. Op basis van deze vereisten wordt primer/probe combinatie en bijhorend qPCR programma ontwikkeld door Pas *et al* (2012), geselecteerd om verdere analyses mee uit te voeren (zie figuur 9C). In deze qPCR worden 10 DNA kopijen steeds gedetecteerd, met een Ct-waarde van 35 à 36, en wordt dit beschouwd als detectielimiet.

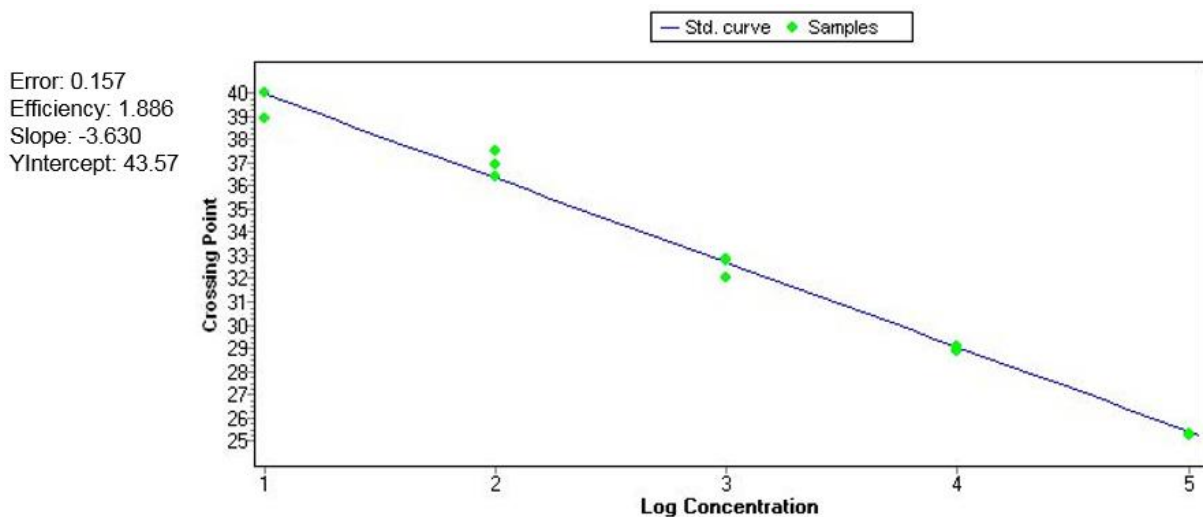




Figuur 9 Standaardcurves bekomen aan de hand van de 3 geteste primer/probe combinaties en bijhorende qPCR programma's uit de literatuur. Standaardcurves zijn gebaseerd op een 10-voudige seriële verdunningsreeks van het HEV-gBlock fragment ( $10^5$ - $10^1$  DNA kopijen/reactie) en uitgevoerd in drievoud. Standaardcurves bekomen met primer- en probecombinatie beschreven door (A) Jothikumar *et al* [25], (B) Martin Latil *et al* [24], (C) Pas *et al* [1].

### 5.1.2 MNV-1 qPCR

In figuur 10 wordt de standaardcurve, bekomen aan de hand van de geteste primer/probe combinatie en bijhorend qPCR programma voor MNV-1 beschreven door Stals *et al* (2009), weergegeven. De verkregen 88.6% efficiëntie en het Y-intercept van 43.6 zijn vergelijkbaar met de waarden (86.0% efficiëntie en 42.3 Y-intercept) beschreven in het artikel van Stals *et al* [26]. De bekomen efficiëntie bevindt zich ook in de range van 80-110% wat wijst op een voldoende efficiënte reactie. Bovendien wordt telkens een gelijkaardige efficiëntie en gevoeligheid bekomen bij het herhaaldelijk opstellen van een standaardcurve gebruikmakend van het MNV-1 gBlock fragment.



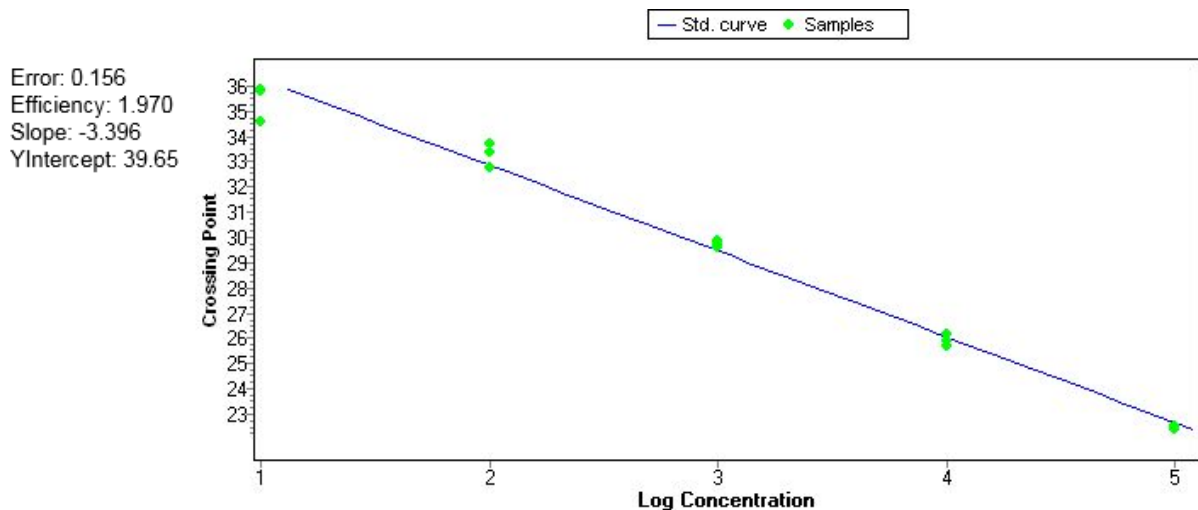
Figuur 10 Standaardcurve bekomen aan de hand van de geteste primer/probe combinatie en bijhorend qPCR programma beschreven door Stals *et al* (2009). De standaardcurve is gebaseerd op een 10-voudige seriële verdunningsreeks van het MNV-1 gBlock fragment in ( $10^5$ - $10^1$  DNA kopijen/reactie) en uitgevoerd in drievoud.

## 5.2 CDNA-SYNTHESE

In tabel 7 worden de resultaten weergegeven bekomen aan de hand van verdunningen van HEV RNA referentiemateriaal. De concentraties zijn bepaald aan de hand van de standaardcurve (zie figuur 11). In het geval van het onverdund referentiemateriaal komt de gemeten concentratie het beste overeen met de verwachte concentratie wat betreft 1 µl. De gemeten concentraties bekomen met 5 µl onverdund referentiemateriaal liggen lager dan de te verwachten concentraties in tegenstelling tot de 1/10 verdunning van het referentiemateriaal waarbij de bekomen concentraties hoger liggen dan de te verwachten concentraties ongeacht 1 µl of 5 µl template. Bij verdunning 1/100 van het referentiemateriaal is de concentratie dusdanig laag dat het niet meer gedetecteerd wordt in de qPCR. Vermits de resultaten niet eenduidig zijn, wordt een tweede experiment uitgevoerd waarbij enkel vertrokken wordt van 1 µl en 5 µl onverdund referentiemateriaal.

Tabel 7 Resultaten: onverdund en verdund HEV RNA referentiemateriaal

<b>Naam staal</b>		<b>Ct-waarde</b>	<b>Concentratie (Aantal DNA kopijen in 25 µl qPCR reactie)</b>	<b>Te verwachten [] a.d.h.v. de gekende hoeveelheid RNA startmateriaal</b>
1 µl HEV RNA referentiemateriaal 250 RNA kopijen/µl	1	34.63	3.01E1	6.25E1
	2	34.75	2.77E1	6.25E1
	3	32.96	9.31E1	6.25E1
5 µl HEV RNA referentiemateriaal 250 RNA kopijen/µl	1	31.85	1.92E2	3.13E2
	2	32.51	1.27E2	3.13E2
	3	32.39	1.38E2	3.13E2
1 µl 1/10 verdunning van HEV RNA referentiemateriaal 25 RNA kopijen/µl	1	33.95	9.31E1	6.25E0
	2	34.57	4.75E1	6.25E0
	3	33.66	3.13E1	6.25E0
5 µl 1/10 verdunning van HEV RNA referentiemateriaal 25 RNA kopijen/µl	1	33.82	5.19E1	3.13E1
	2	33.70	5.66E1	3.13E1
	3	34.59	3.09E1	3.13E1
1 µl 1/100 verdunning van HEV RNA referentiemateriaal 2,5 RNA kopijen/µl	1	-	-	6.25E-1
	2	-	-	6.25E-1
	3	-	-	6.25E-1
5 µl 1/100 verdunning van HEV RNA referentiemateriaal 2,5 RNA kopijen/µl	1	-	-	3.13E0
	2	-	-	3.13E0
	3	-	-	3.13E0

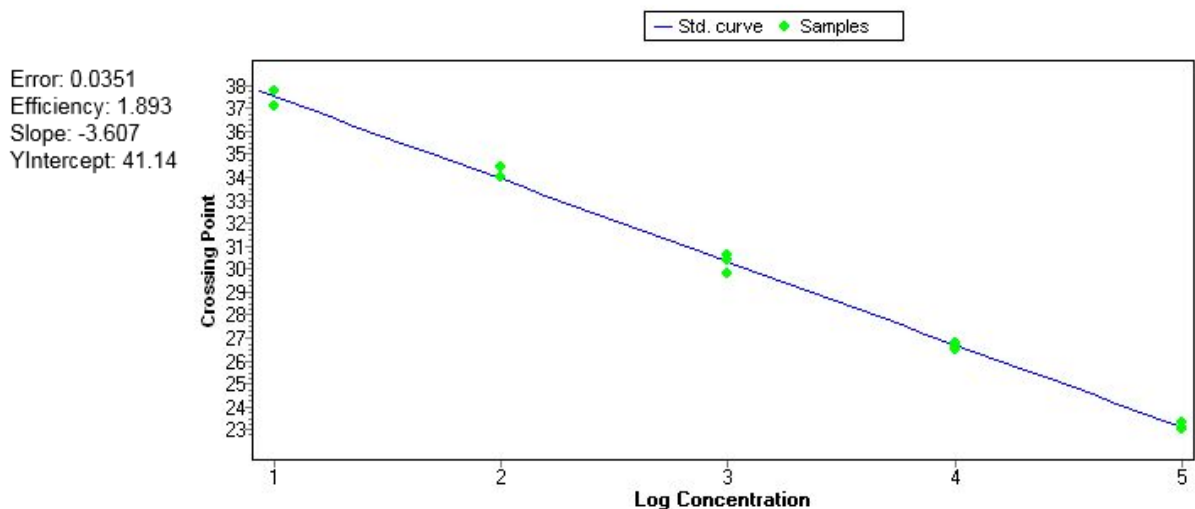


Figuur 11 Standaardcurve bekomen door een 10-voudige seriële verdunningsreeks van het HEV-gBlock fragment ( $10^5$ - $10^1$  DNA kopijen/reactie) en uitgevoerd in drievoud

In tabel 8 worden de resultaten weergegeven waarbij een tweede maal 1  $\mu$ l en 5  $\mu$ l HEV RNA referentiemateriaal (250 RNA kopijen/ $\mu$ l) de cDNA-synthese doorlopen hebben. De concentraties zijn bepaald door de Ct-waarden uit te zetten ten opzicht van de standaardcurve (zie figuur 12). Opnieuw wordt met 1  $\mu$ l HEV RNA referentiemateriaal de beste overeenkomst gevonden tussen de gemeten concentratie en de verwachte concentratie. Op basis van deze resultaten wordt besloten 1  $\mu$ l aan een concentratie van 250 HEV RNA kopijen/ $\mu$ l telkens mee te nemen tijdens elke analyse waarop cDNA-synthese uitgevoerd wordt omdat de bekomen concentraties het dichtste aanleuning bij de te verwachten concentraties.

Tabel 8 Resultaten: 1  $\mu$ l of 5  $\mu$ l template cDNA-synthese

Naam staal		Ct-waarde	Concentratie (Aantal DNA kopijen in 25 $\mu$ l qPCR reactie)	Te verwachten [] a.d.h.v. de gekende hoeveelheid RNA startmateriaal
1 $\mu$ l HEV RNA referentiemateriaal 250 RNA kopijen/ $\mu$ l	1	35.27	4.24E1	6.25E1
	2	36.45	1.99E1	6.25E1
	3	35.73	3.15E1	6.25E1
5 $\mu$ l HEV RNA referentiemateriaal 250 RNA kopijen/ $\mu$ l	1	35.78	3.06E1	3.13E2
	2	37.87	8.03E0	3.13E2
	3	35.86	2.90E1	3.13E2



Figuur 12 Standaardcurve bekomen door een 10-voudige seriële verdunningsreeks van het HEV-gBlock fragment ( $10^5$ - $10^1$  DNA kopijen/reactie) en uitgevoerd in drievoud

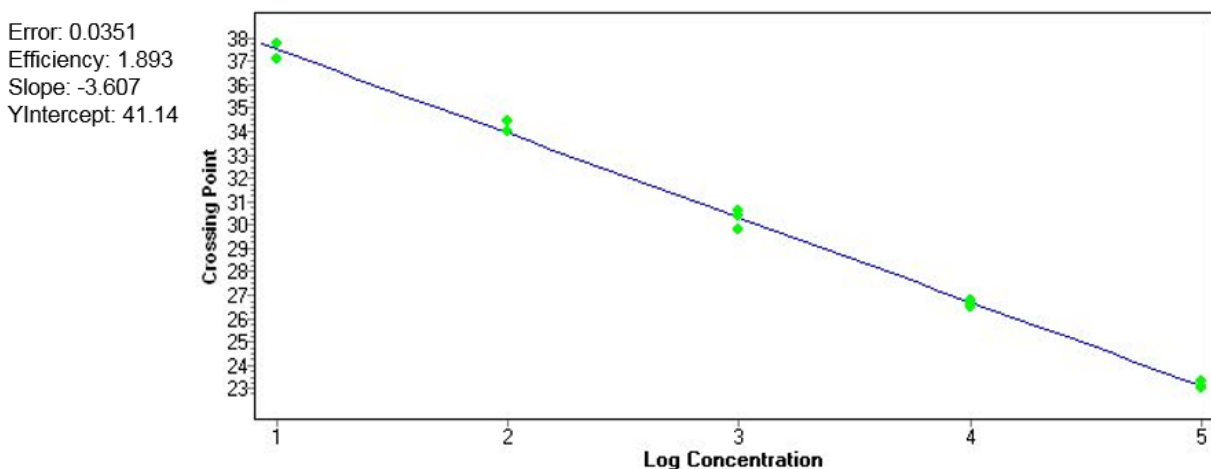
### 5.3 RNA-EXTRACTIE

#### 5.3.1 Humaan HEV positief faecessuspensie

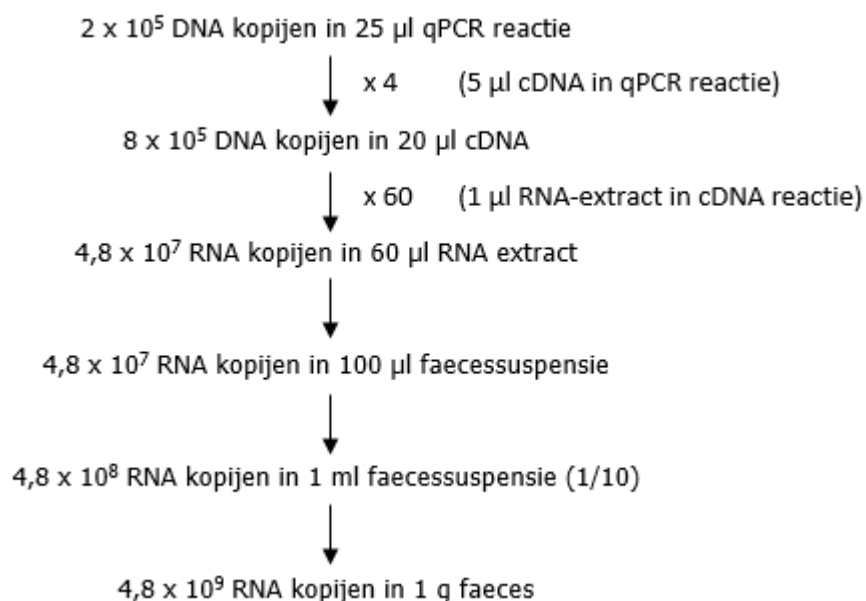
In tabel 9 worden de resultaten weergegeven waarbij 100  $\mu$ l HEV positieve faecessuspensie een RNA-extractie doorlopen heeft. De concentraties zijn bepaald door middel van de Ct-waarden uit te zetten ten opzichte van de standaardcurve (zie figuur 13). De uiteindelijke concentratie wordt berekend door rekening te houden met verdunningen doorheen het volledige proces (zie figuur 14). Deze zijn vergelijkbaar met de geschatte concentratie namelijk  $10^9$  RNA kopijen/g faeces.

Tabel 9 Resultaten: RNA-extractie van HEV positief faecessuspensie

Naam staal		Ct-waarde	Concentratie (Aantal DNA kopijen in 25 $\mu$ l qPCR reactie)	Uiteindelijke concentratie in de faeces (RNA kopijen/ g)
HEV positief faecessuspensie	1	21.42	2.92E5	7.01E9
	2	22.78	1.23E5	2.95E9
	3	22.17	1.82E5	1.46E9



Figuur 13 Standaardcurve bekomen door een 10-voudige seriële verdunningsreeks van het HEV-gBlock fragment ( $10^5$ - $10^1$  DNA kopijen/reactie) en uitgevoerd in drievoud



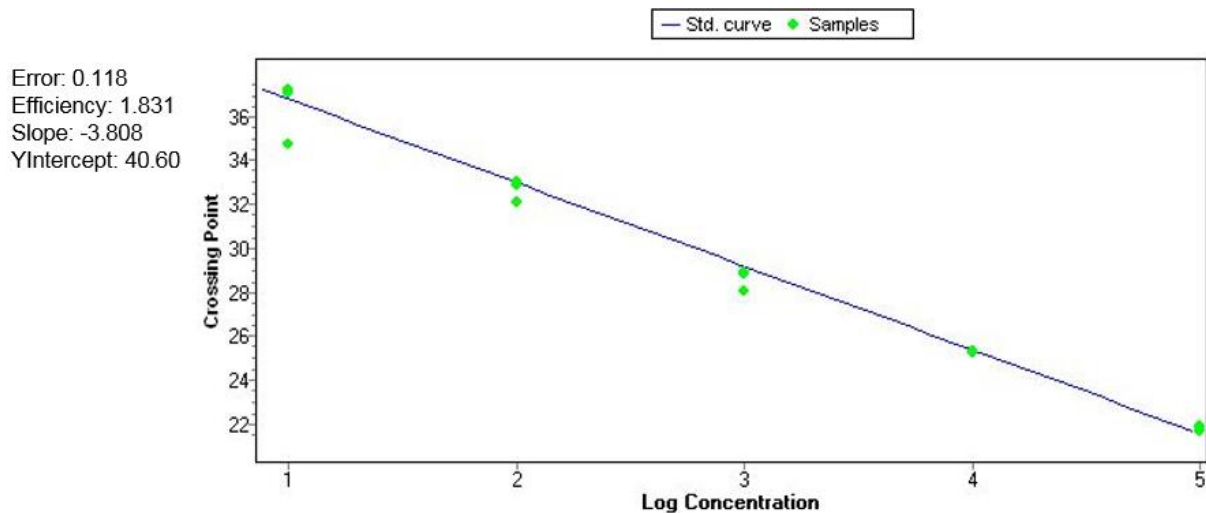
Figuur 14 Omrekenen van bekomen concentratie tot uiteindelijke concentratie a.d.h.v. een voorbeeldconcentratie ( $2 \times 10^5$  cDNA kopijen in 25  $\mu$ l qPCR reactie)

### 5.3.2 Murine norovirus lysaat

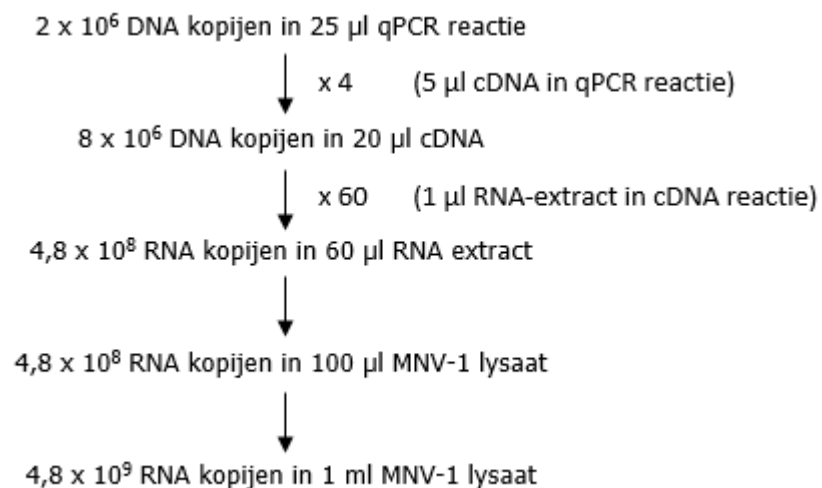
In tabel 10 worden de resultaten weergegeven waarbij 100  $\mu$ l murine norovirus lysaat een RNA-extractie doorlopen heeft. De concentraties zijn bepaald door de Ct-waarden uit te zetten ten opzichte van standaardcurve (zie figuur 15). De uiteindelijke concentratie wordt berekend door rekening te houden met verdunningen doorheen het volledige proces (zie figuur 16) en bevinden zich in een grootteorde tussen  $10^9$  en  $10^{10}$ , wat overeenkomt met de geschatte concentratie namelijk  $10^9$  RNA kopijen/ml.

Tabel 10 Resultaten: RNA-extractie van Murine norovirus lysaat

Naam staal		Ct-waarde	Concentratie (Aantal DNA kopijen in 25 $\mu$ l qPCR reactie)	Uiteindelijke concentratie in het murine norovirus lysaat (RNA kopijen/ml)
Murine norovirus lysaat	1	16.64	1.96E6	4.70E9
	2	15.94	2.99E6	7.18E9
	3	16.91	1.66E6	3.98E9



Figuur 15 Standaardcurve bekomen door een 10-voudige seriële verdunningsreeks van het MNV-1 gBlock fragment ( $10^5$ - $10^1$  DNA kopijen/reactie) en uitgevoerd in drievoud



Figuur 16 Omrekenen van bekomen concentratie tot uiteindelijke concentratie a.d.h.v. een voorbeeldconcentratie ( $2 \times 10^6$  cDNA kopijen in 25  $\mu$ l qPCR reactie)

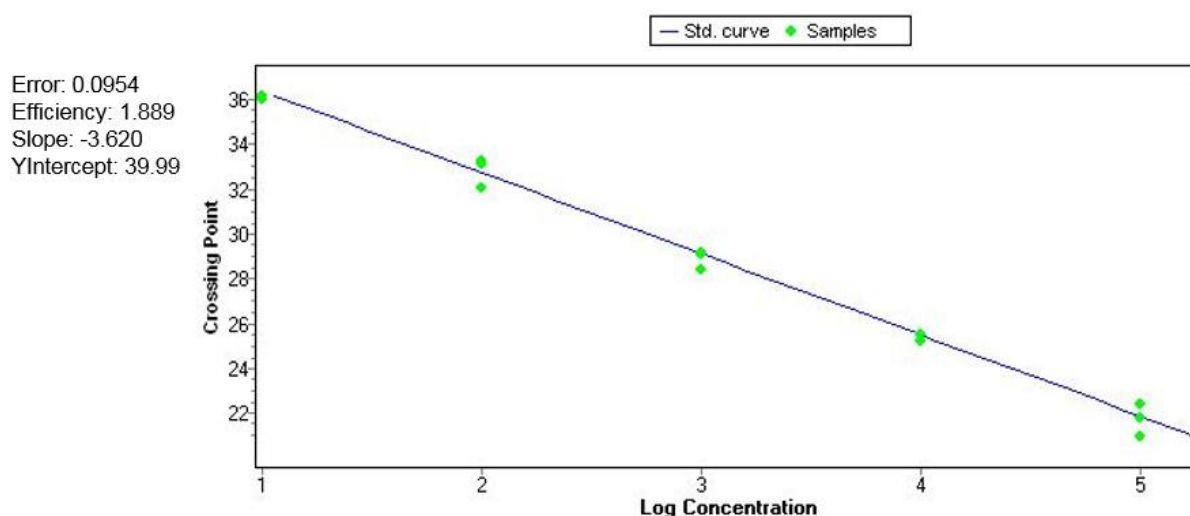
#### 5.4 VIRUSCONCENTRATIE

In tabel 11 worden de resultaten weergegeven waarbij éénzelfde leverstaal in zes fracties van 50 mg opgedeeld wordt. Aan drie fracties wordt 10  $\mu$ l HEV positieve faecessuspensie toegevoegd en aan drie andere fracties wordt 10  $\mu$ l PBS-buffer waarna de zes fracties het volledige proces doorlopen en vervolgens gemeten worden met de HEV qPCR. De concentraties zijn bepaald door de Ct-waarden uit te zetten ten opzichte van de standaardcurve en worden vervolgens teruggerekend rekening houdend met de verdunningen (zie figuur 17 en figuur 18). De uiteindelijke concentraties bevinden zich in grootte-orde tussen  $10^6$  en  $10^7$ , wat overeenkomt met de te verwachten waarden (zie 4.3.1). Doordat er bij twee niet-beënte leverstalen geen DNA kopijen gedetecteerd worden en bij één staal slechts een heel lage concentratie (rond detectielimiet) is het onderzochte leverstaal waarschijnlijk negatief voor het hepatitis E virus.

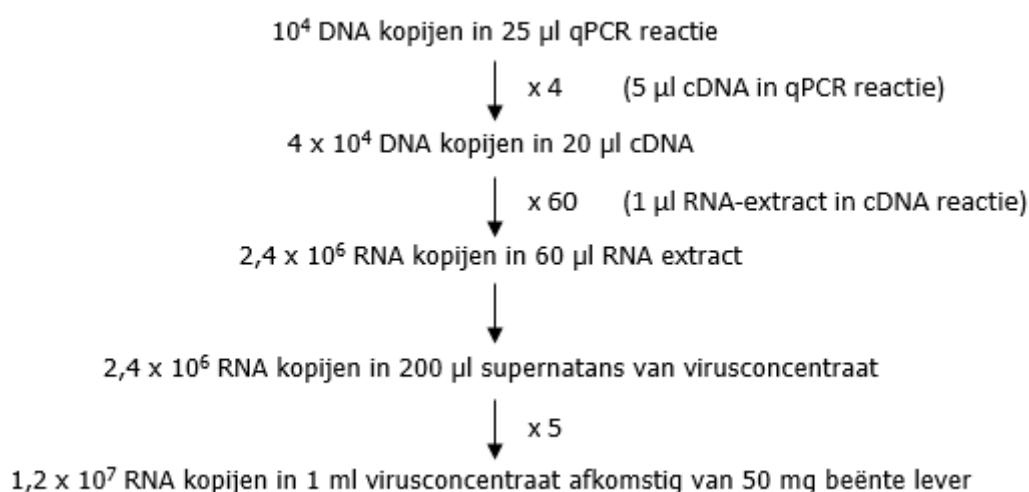
Tabel 11 Resultaten: virusconcentratie van willekeurige leverstalen

Naam staal		Ct-waarde	Concentratie (Aantal DNA kopijen/ qPCR reactie)	Uiteindelijke concentratie (RNA kopijen/ 50 mg lever)	Te verwachten concentratie* (RNA kopijen/ 50 mg lever)
Leverstalen + 10 µl PBS-buffer	1	36.23	1.09E1	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
Leverstaal + 10 µl HEV positieve faecessuspensie	1	26.10	6.85E3	8.22E6	3.80E6
	2	24.21	2.28E4	2.74E7	3.80E6
	3	25.93	7.65E3	9.18E6	3.80E6

\* Te verwachten concentratie berekent door een gemiddelde concentratie ( $3,8 \times 10^9$  RNA kopijen/g faeces) bekomen met de RNA-extractie (zie tabel 9).



Figuur 17 Standaardcurve bekomen door een 10-voudige seriële verdunningsreeks van het HEV-gBlock fragment ( $10^5$ - $10^1$  DNA kopijen/reactie) en uitgevoerd in drievoud



Figuur 18 Omrekenen van bekomen concentratie tot uiteindelijke concentratie a.d.h.v. een voorbeeldconcentratie ( $10^4$  cDNA kopijen in 25 µl qPCR reactie)

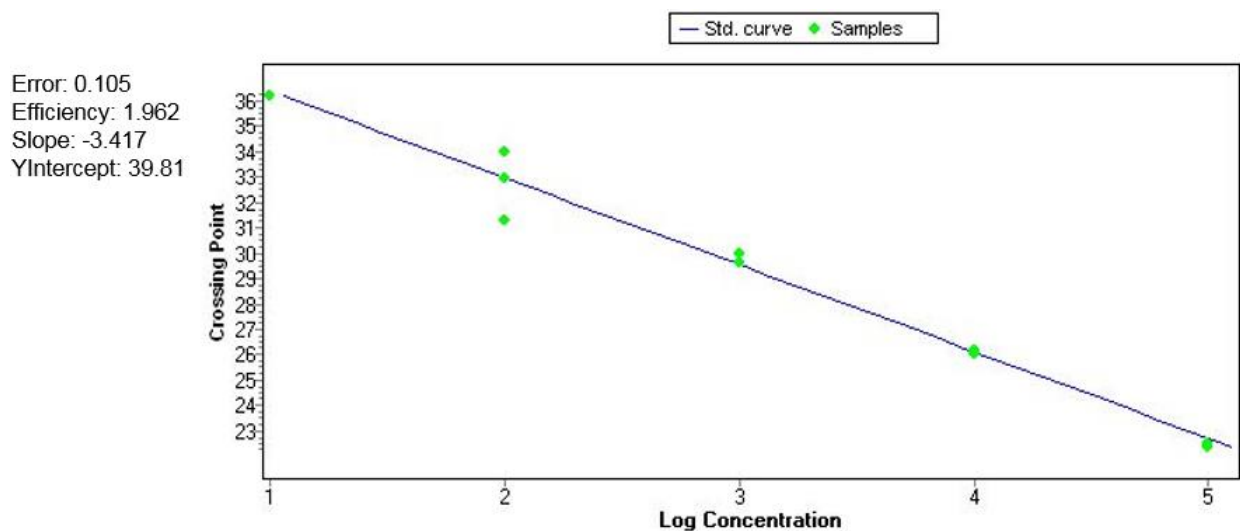


In tabel 12 worden de resultaten weergegeven waarbij éénzelfde leverstaal in drie fracties van 50 mg opgedeeld wordt. Aan deze fracties worden 10 µl murine norovirus lysaat toegevoegd waarna de drie fracties het volledige proces doorlopen en vervolgens gemeten worden met MNV-1 qPCR. De concentraties zijn bepaald door de Ct-waarden uit te zetten ten opzichte van de standaardcurve en worden vervolgens teruggerekend rekening houdend met de verdunningen (zie figuur 19 en Figuur 20). De uiteindelijke concentraties bevinden zich in grootteorde tussen  $10^4$  en  $10^5$  wat beduidend lager is dan de te verwachten waarden (zie 4.3.2). Een oorzaak van deze lage concentraties is vermoedelijke inhibitie van de MNV-1 qPCR door de componenten van de levermatrix.

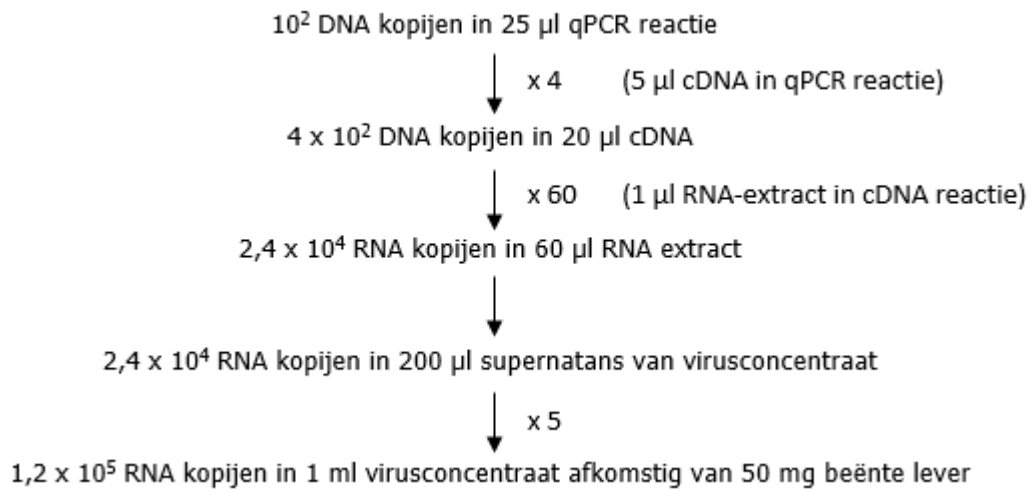
Tabel 12 Resultaten: virusconcentratie van willekeurige leverstalen

Naam staal		Ct-waarde	Concentratie (Aantal DNA kopijen/ qPCR reactie)	Uiteindelijke concentratie (RNA kopijen/ 50 mg lever)	Te verwachten concentratie* (RNA kopijen/ 50 mg lever)
Leverstaal + 10 µl MNV-1 lysaat	1	33.26	8.24E1	9.89E4	5.28E7
	2	32.07	1.84E2	2.21E5	5.28E7
	3	31.11	3.51E2	4.21E5	5.28E7

\* Te verwachten concentratie berekent door een gemiddelde concentratie ( $5,28 \times 10^9$  RNA kopijen/ml MNV-1 lysaat) bekomen met de RNA-extractie (zie tabel 10).



Figuur 19 Standaardcurve bekomen door een 10-voudige seriële verdunningsreeks van het MNV-1 gBlock fragment ( $10^5$ - $10^1$  DNA kopijen/reactie) en uitgevoerd in drievoud



Figuur 20 Omrekenen van bekomen concentratie tot uiteindelijke concentratie a.d.h.v. een voorbeeldconcentratie (10<sup>2</sup> cDNA kopijen in 25 µl qPCR reactie)

## 6 ALGEMEEN BESLUIT

Naar aanleiding van groeiende bezorgdheid over het opduikende voedselgebonden virus Hepatitis E werd een detectiemethode op basis van qPCR geoptimaliseerd voor detectie/ kwantificatie van HEV in varkenslever.

In eerste instantie werd de HEV qPCR stap geoptimaliseerd aan de hand van 3 HEV qPCR's die beschreven zijn in de literatuur. De primer- en probecombinaties met bijhorende qPCR-programma's werden getest gebruikmakend van een HEV-gBlock fragment. Uit de bekomen resultaten werd de primer- en probecombinatie met bijhorende qPCR-programma ontwikkeld door Pas *et al* [1] geselecteerd om verdere analyses uit te voeren. Ook werd een MNV-1 qPCR geoptimaliseerd zodat het murine norovirus lysaat (procescontrole) gedetecteerd kan worden. De primer- en probecombinatie met bijhorende qPCR-programma zijn gebaseerd op de studie van Stals *et al* [2] en werden getest met behulp van het MNV-1 gBlock fragment. De bekomen resultaten waren vergelijkbaar met de waarden beschreven door Stals *et al* [2].

In een tweede fase werd cDNA-synthese of reverse transcriptie stap geoptimaliseerd aan de hand van WHO HEV RNA referentiemateriaal waarvan de concentratie gekend is. Het referentiemateriaal, de 1/10 verdunning en 1/100 verdunning werden in verschillende hoeveelheden getest. Wanneer er uitgegaan wordt van 1 µl onverdund referentiemateriaal werd een vrij goed overeenkomst gevonden tussen de bekomen en de verwachte concentraties. Bijgevolg werd in verdere analyses telkens 1 µl van het onverdund referentiemateriaal (250 RNA kopijen/µl) meegenomen als controle voor de cDNA-synthese.

Vervolgens werd de RNA-extractie gebruikmakend van de RNeasy Mini kit (Qiagen) getest aan de hand van HEV positieve faecessuspensie (verwachte concentratie is ongeveer 9 log RNA kopijen/g) en het murine norovirus lysaat (verwachte concentratie is ongeveer 9 log RNA kopijen/ml). De bekomen concentraties lagen in dezelfde grootte orde als de te verwachten concentraties. Hieruit werd besloten dat de RNA-extractie uit humaan HEV positieve faecessuspensie en uit MNV-1 lysaat door middel van de RNeasy Mini kit efficiënt verloopt.

In de laatste fase werden varkensleverstalen beënt met humaan HEV positieve faecessuspensie en murine norovirus lysaat waarna deze het volledig proces doorliepen. De leverstalen die beënt werden met HEV positieve faecessuspensie leverde resultaten op die in dezelfde grootte orde liggen als de verwachte concentraties. Voor leverstalen die beënt waren met murine norovirus lysaat was dit niet het geval. Hierbij werden concentraties bekomen die beduidend lager liggen dan de te verwachte waarden wat mogelijk wijst op inhibitie van de MNV-1 qPCR door de levermatrix. Verdere optimalisatie van de virusconcentratie stap is bijgevolg aangewezen.

## LITERATUURLIJST

- [1] S. D. d. M. R. A. M. C. B. A. v. H. P. W. W. d. E. A. A. Pas, „Hepatitis E Virus Infection among Solid Organ Transplant Recipients, the Netherlands,” *Emerging Infectious Diseases*, nr. 18, pp. 869-872, 2012.
- [2] A. Stals, L. Baert, N. Botteldoorn, H. Werbrouck, L. Herman, M. Uyttendaele en E. Van Coillie, „Multiplex real-time RT-PCR for simultaneous detection of GI/GII noroviruses and murine norovirus1,” in *Molecular detection of noroviruses in ready-to-eat foods and fruit products*, 2009, pp. 247-253.
- [3] „de vlaamse overheid,” mei 2015. [Online]. Available: <http://lv.vlaanderen.be/nl/home/over-ons/instituut-voor-landbouw-visserij-en-voedingsonderzoek-ilvo>. [Geopend maart 2017].
- [4] „RIVM De zorg voor morgen begint vandaag,” Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, 6 maart 2017. [Online]. Available: [http://www.rivm.nl/Documenten\\_en\\_publicaties/Algemeen\\_Actueel/Veelgestelde\\_vragen/Infectieziekten/ISI\\_standaarden/ISI\\_Norovirus](http://www.rivm.nl/Documenten_en_publicaties/Algemeen_Actueel/Veelgestelde_vragen/Infectieziekten/ISI_standaarden/ISI_Norovirus). [Geopend maart 2017].
- [5] „geef virussen in voeding geen kans,” federale overheidsdienst volksgezondheid, veiligheid van de voedselketen en leefmilieu, 7 maart 2016. [Online]. Available: <http://www.health.belgium.be/nl/voeding/voedselveiligheid/microbiologische-gevaren-en-hygiene/voedselinfecties-en-vergiftigingen-0>. [Geopend maart 2017].
- [6] N. H. Centrum, „wat is hepatitis A? algemene informatie,” Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, mei 2013. [Online]. Available: <http://www.rivm.nl/dsresource?objectid=c298cb13-f28a-48cc-8287-0328de840cde&type=org&disposition=inline>. [Geopend maart 2017].
- [7] R. v. V. e. Milieu, „Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu,” mei 2013. [Online]. Available: <http://www.rivm.nl/dsresource?objectid=a4963105-0553-4577-8809-0c27b16db1be>. [Geopend maart 2017].
- [8] J. Izopet, „Zoonotic Hepatitis E virus: Classification, Animal Reservoirs and transmission Routes,” *Viruses*, vol. 8, nr. 270, p. 24, 2016.
- [9] „Het hepatitis E virus bij het varken: een zoönose?,” *Vlaams Diergeneeskundig*, nr. 79, p. 7, 2010.
- [10] F. Tacke, „Medscape,” Future virology, 2009. [Online]. Available: [http://www.medscape.com/viewarticle/589933\\_2](http://www.medscape.com/viewarticle/589933_2). [Geopend maart 2017].
- [11] Hindawi Publishing Corporation, „Hepatitis E virus in Industrialized Countries: The silent Threat,” *BioMed Research International*, p. 17, 2016.
- [12] M. D. Boulle, 2012. [Online]. Available: [http://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/001/892/824/RUG01-001892824\\_2012\\_0001\\_AC.pdf](http://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/001/892/824/RUG01-001892824_2012_0001_AC.pdf). [Geopend maart 2017].
- [13] H. Dalton R. en J. Seghatchian, „Hepatitis E virus: Emerging from the shadows in developed countries,” *Transfusion and apheresis science*, nr. 55, p. 4, 2016.
- [14] E. Slok, „LCI-richtlijn Hepatitis E,” rijksinstituut voor volksgezondheid en milieu, 26 april 2016. [Online]. Available: [http://www.rivm.nl/Documenten\\_en\\_publicaties/Professioneel\\_Praktisch/Richtlijnen/Infectieziekten/LCI\\_richtlijnen/LCI\\_richtlijn\\_Hepatitis\\_E](http://www.rivm.nl/Documenten_en_publicaties/Professioneel_Praktisch/Richtlijnen/Infectieziekten/LCI_richtlijnen/LCI_richtlijn_Hepatitis_E). [Geopend maart 2017].
- [15] N. Kamar, H. R. Dalton, F. Bravanel en J. Izopetb, „Hepatitis E Virus Infection,” NCBI, 27 januari 2014. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3910910/>. [Geopend maart 2017].
- [16] thermo fisher scientific, „Protein Biology Resource Library,” [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/be/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>. [Geopend maart 2017].

- [17] Bio-Rad Laboratories, „ELISA Detection Options,” BIO-RAD, 2017. [Online]. Available: <https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-detection-direct-indirect.html>. [Geopend maart 2017].
- [18] E. Pommereau, „Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV),” 1 februari 2017. [Online]. Available: <https://www.wiv-isp.be/nl/gezondheidsonderwerpen/hepatitis/preventie>. [Geopend maart 2017].
- [19] N. Cook, „Survival and elimination of hepatitis E virus: A Review,” *Food Environ virol*, vol. 7, p. 5, 2015.
- [20] microtissues, „Driedimensionale (3D) Cell Culture versus Twee dimensionale (2D) Cell Culture,” sigma-aldrich, [Online]. Available: [https://translate.google.be/translate?hl=nl&sl=en&tl=nl&u=http%3A%2F%2Fwww.microtissues.com%2Fthree\\_dimensional\\_3d\\_cell\\_culture\\_versus\\_two\\_dimensional\\_2d\\_cell\\_culture.htm&no=2&sandbox=1](https://translate.google.be/translate?hl=nl&sl=en&tl=nl&u=http%3A%2F%2Fwww.microtissues.com%2Fthree_dimensional_3d_cell_culture_versus_two_dimensional_2d_cell_culture.htm&no=2&sandbox=1). [Geopend maart 2017].
- [21] W. van der Poel, „Hepatitis E Virus,” *Emerging Zoonotic Viruses*, [Online]. Available: <http://www.wimvanderpoel.nl>. [Geopend mei 2017].
- [22] E. Parafragkou en M. Kulka, „Review: Approaches to the viral extraction, detection and identification of hepatitis viruses, HAV and HEV, in foods,” *Food biological contaminants*, vol. 1, nr. 99, pp. 130-142, 2016.
- [23] J. Vandesompele, „Eurogentec,” 2017. [Online]. Available: <http://www.eurogentec.com>. [Geopend april 2017].
- [24] S. Martin Latil, C. Hennechart-Collette, L. Guillier en S. Perelle, „Duplex RT-qPCR for the detection of hepatitis E virus in water, using a process control,” *International Journal of Food Microbiology*, nr. 157, pp. 167-173, 2012.
- [25] N. Jothikumar, T. L. Cromeans, B. H. Robertson, X. Meng en V. R. Hill, „A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus,” *Journal of Virological Methods*, nr. 131, pp. 65-71, 2006.
- [26] A. Stals, L. Baert, E. Van Coillie en M. Uyttendaele, „Evaluation of a norovirus detection methodology for soft red fruits,” in *Molecular detection of noroviruses in ready-to-eat foods and fruit products*, 2010, pp. 52-58.
- [27] S. Martens, *Rapporteren voor technici*, 1ste red., Leuven: Acco, 2016.
- [28] A. Boeykens, „Handleiding papers en bachelorproef,” Odisee, Gent, 2017.
- [29] „Hepatitis info,” 25 oktober 2016. [Online]. Available: [http://www.hepatitisinfo.nl/kennisbank/Aandoening.E/aDU1235\\_Hepatitis-E.aspx](http://www.hepatitisinfo.nl/kennisbank/Aandoening.E/aDU1235_Hepatitis-E.aspx). [Geopend maart 2017].
- [30] Qiagen, „Rneasy Mini Handbook,” juni 2012. [Online]. Available: <https://www.qiagen.com/es/resources/resourcedetail?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en>. [Geopend april 2017].
- [31] ThermoFisher Scientific, „Reverse Transcription—Six Most Common Applications,” [Online]. Available: <http://www.thermofisher.com/be/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/rt-education/reverse-transcription-applications.html>. [Geopend april 2017].
- [32] A. KUumar, „TaqMan Assay Vs SYBR Green Assay,” *Bio-resource*, 20 mei 2013. [Online]. Available: <http://technologyinscience.blogspot.be/2013/05/taqman-assay-vs-sybr-green-assay.html#.WPTpntLyjIU>. [Geopend april 2017].
- [33] M. Williams, „Sciencing,” Leaf Group Ltd, 2017. [Online]. Available: <http://sciencing.com/magnesium-chloride-used-pcr-5390976.html>. [Geopend april 2017].

- [34] ThermoFisher Scientific, „TaqMan® Universal PCR Master Mix,“ Applied biosystems, 2017. [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4304437>. [Geopend april 2017].