



Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

 www.em-consulte.com



Article original

Détection du virus de l'hépatite A dans les coquillages en Tunisie par reverse transcription-nested PCR – recherche de corrélation entre la contamination virale et bactérienne

Hepatitis A virus detection in shellfish from Tunisia by reverse transcription-nested PCR – investigation of a correlation between viral and bacterial contamination

I. Amri^a, F. Hmaïed^{a,*}, F. Loisy^b, B. Lebeau^b, I. Barkallah^a, M. Saidi^a, A. Slim^c

^a CNSTN, laboratoire de microbiologie et biologie moléculaire, pôle technologique, 2020 Sidi Thabet, Tunisie

^b Centre européen d'expertise et de recherche sur les agents microbiens, 1, all de la Filée, BP 54424, 44244 La Chapelle S, Erdre cedex, France

^c Laboratoire de microbiologie, hôpital Charles-Nicolle, 1006 Tunis, Tunisie

INFO ARTICLE

Historique de l'article :

Reçu le 18 septembre 2009

Accepté le 16 octobre 2009

Disponible sur Internet le 26 novembre 2009

Mots clés :

VHA
 Coquillages
 Extraction
 Contamination
 RT-Nested-PCR
E. coli

Keywords:

HAV
 Shellfish
 Extraction
 Contamination
 RT-Nested-PCR
E. coli

RÉSUMÉ

Buts de l'étude. – Nous nous proposons dans cette étude d'évaluer la contamination par le virus de l'hépatite A (VHA) de coquillages collectés à partir de cinq zones conchylicoles tunisiennes et de rechercher une éventuelle corrélation entre la contamination bactérienne et virale.

Matériel et méthodes. – Cinquante-quatre échantillons de coquillages ont fait l'objet d'une extraction virale par 2 méthodes l'une utilisant l'élué par une solution de glycine et l'autre utilisant une solution d'extrait de bœuf. Les deux méthodes ont été comparées par l'application d'une reverse transcription suivie d'une nested PCR. La recherche de *Salmonella* et d'*E. coli* a été réalisée dans tous les échantillons de coquillages inclus dans cette étude.

Résultats. – Sur les deux techniques testées, la technique à base de glycine a affiché le rendement le plus élevé. Le virus de l'hépatite A a été détecté dans 32 % des échantillons de coquillages analysés. Les résultats des analyses bactériologiques ont montré une absence de *Salmonella* et une contamination par *E. coli*. Parmi les 17 échantillons de coquillages contaminés par le VHA, six échantillons se sont révélés ayant une contamination par *E. coli* < à la limite de législation.

Conclusion. – Nous avons constaté une contamination assez élevée des échantillons de coquillages collectés. Une absence de corrélation entre la contamination bactérienne et virale a été notée.

© 2009 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

ABSTRACT

Objectives. – We aimed at evaluating the contamination by hepatitis A virus (HAV) of 54 shellfish samples collected from five Tunisian shellfish harvesting areas and finding a correlation between bacterial and viral contamination.

Material and methods. – Fifty-four shellfish samples were analysed in our study. Two methods of viral extraction were evaluated by reverse transcription-nested PCR. The first one was based on elution by glycine solution and the second one used a beef extract solution. Bacteriological determination (*Salmonella* and *E. coli*) was carried out for all shellfish samples.

Results. – Glycine extraction showed a higher detection rate of HAV compared to the saline beef extraction method. The hepatitis A virus was detected in 32 % of shellfish samples analysed. None of the samples revealed the presence of *Salmonella*. From 17 samples positive for HAV, we found six samples showing a number of *E. coli* below the European legislation.

Conclusion. – An important HAV contamination was observed in our study. No correlation between bacterial and viral contamination was found.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : hmaiedfatma@yahoo.com (F. Hmaïed).

1. Introduction

Le virus de l'hépatite A (VHA) à transmission féco-orale constitue un problème majeur de santé publique [1]. Il est lié à une importante morbidité et des pertes économiques considérables à l'échelle mondiale [2]. L'incidence des infections par le VHA varie en fonction des conditions socioéconomiques et du niveau sanitaire du pays. Dans les pays industrialisés, les progrès de l'hygiène ont raréfié les contacts avec le VHA, rendant les populations adultes plus réceptives à l'infection et les épidémies plus massives. Survenant plus tard au cours de la vie, les infections sont plus fréquemment symptomatiques et parfois graves. Par ailleurs, l'incidence des hépatites A est beaucoup plus élevée dans les pays en voie de développement dans lesquels les conditions d'hygiène et le niveau socioéconomique sont souvent peu élevés [3,4]. En Tunisie, l'hépatite A reste une infection fréquente : 84 % des enfants sont déjà atteints par le virus durant les cinq premières années de la vie [5]. Le virus de l'hépatite A est le plus résistant des *Picornavirus* et conserve son pouvoir infectieux après plusieurs semaines dans l'eau de mer ou sur des objets [6]. Cette résistance associée à une excrétion fécale prolongée [7] conditionne son mode de transmission essentiellement féco-oral qui peut être direct par contact avec des sujets infectés ou indirect par l'intermédiaire d'eau ou d'aliments contaminés.

Les mollusques bivalves sont des denrées alimentaires qui ont été clairement impliqués dans la provocation d'épidémies d'hépatite A dans plusieurs pays comme les États-Unis, la Chine, l'Espagne et l'Italie [8–12]. En effet, ces mollusques s'alimentent par filtration de grandes quantités d'eau de mer et concentrent les virus dans leur tube digestif [13]. Actuellement, la surveillance microbiologique des mollusques bivalves repose uniquement sur des analyses bactériologiques. La directive européenne 91/492/EEC [14] établit que la qualité microbiologique des mollusques bivalves doit être contrôlée en mesurant *Escherichia coli* (moins de 230/100 g de chair) et les *Salmonelles* (absence). Toutefois, plusieurs études ont montré que les bactéries ne constituent pas des indicateurs fiables de contamination virale dans les coquillages [15,16].

La recherche du VHA dans les coquillages est complexe du fait de l'adsorption de ces virus sur des particules ou en agrégats et de la sensibilité nécessaire pour prendre en considération la faible concentration virale susceptible d'être trouvée dans les échantillons. Les deux principales techniques utilisées actuellement sont la culture cellulaire et la biologie moléculaire. La méthode de référence généralement utilisée pour la détection des particules virales est la culture cellulaire. Cependant, cette méthode est difficilement applicable pour le VHA qui présente une croissance lente sur culture cellulaire et n'entraîne pas d'effet cytopathique. D'où le recours aux techniques de biologie moléculaire qui sont rapides, sensibles et spécifiques telle que l'amplification génique (PCR) pour l'analyse de la contamination virale [17,18].

L'objectif de cette étude est d'optimiser une approche moléculaire pour la mise en évidence du VHA et d'évaluer la contamination par le virus de l'hépatite A des mollusques bivalves dans cinq zones de production conchylicoles du Sud et du Nord de la Tunisie.

2. Matériel et méthodes

2.1. Échantillons et témoins

Entre décembre 2007 et juillet 2008, 54 échantillons de coquillages ont été collectés : 19 lots d'échantillons de moules (*Mytilus galloprovincialis*), 11 lots d'échantillons d'huîtres (*Crassostrea gigas*) et 24 lots d'échantillons de palourdes (*Tapes Decussatus*) à partir de cinq zones de conchyliculture du nord et du sud de la Tunisie : lac de Tunis, canal de Tunis, Menzel Jemil, Ferme myticole de bizerte (FMB) et Gabes.

Une suspension virale extraite à partir des selles d'un enfant âgé de huit ans, atteint de l'hépatite A dans la région de Tunis, a été utilisée comme témoin positif. Ces selles ont été titrées à 8×10^6 copies/g de selles.

2.2. Analyses bactériologiques

Soixante-quinze grammes de la chair et du liquide intervalvaire des échantillons de coquillages sont prélevés aseptiquement puis broyés en présence d'une solution de Tryptone sel (Biokar diagnostics). La recherche d'*E. coli* dans les échantillons de coquillages a été réalisée selon la norme ISO/TS 16649-3 : 2005.

Vingt-cinq grammes de la chair et du liquide intervalvaire des échantillons de coquillages ont été utilisés pour la recherche de *Salmonella* selon la norme ISO 6579 : 2002.

2.3. Extraction des virus à partir des coquillages

Pour chaque lot, les coquillages sont débarrassés de corps étrangers présents sur leurs coquilles par un brossage sous l'eau de robinet, puis lavés abondamment à l'eau stérile. Après ouverture des coquilles de manière aseptique, la chair et le liquide intervalvaire sont recueillis dans des flacons stériles à raison de 50 g puis conservés à -20°C . Deux techniques d'extraction virale ont été utilisées et comparées (E1) et (E2). La technique (E1) est une technique d'extraction par une solution glycine-NaCl décrite par Sobsey et al. [19] : 50 g de tissus et de liquide intervalvaire des coquillages sont homogénéisés dans un broyeur (Moulinex). Un volume de 150 ml de tampon 0,2 M glycine-0,15 M NaCl (pH = 9,5) est ajouté au broyat. L'ensemble est mélangé, sous agitation, pendant 15 minutes à température ambiante puis centrifugé à 10 000 g pendant dix minutes à 4°C . La seconde technique d'extraction (E2) décrite par Alouini et Sobsey [20] utilise une solution NaCl-extrait de bœuf. Elle consiste à homogénéiser 50 g de tissus et de liquide intervalvaire des coquillages dans un broyeur (Moulinex) en présence de 50 ml de la solution NaCl 0,3 M. Un volume de 350 ml d'une solution tampon (7 % d'extrait de bœuf-0,3 M de NaCl) (pH = 7,5) est ajouté au broyat. L'ensemble est homogénéisé de nouveau dans le broyeur (Moulinex) puis une centrifugation de la suspension a été effectuée à 3500 rpm pendant 20 minutes à 4°C . Après l'étape de clarification, les surnageants obtenus à partir de la technique (E1) et (E2) sont récupérés et les pH sont ajustés à 7,2.

Pour chaque technique, un échantillon de coquillages contaminé artificiellement par la suspension de selles d'un patient VHA positif ayant un titre viral de 8×10^6 copies/g de selles a été inclus et a servi comme témoin positif. Pour comparer ces deux techniques, une contamination artificielle des coquillages a été effectuée avec des dilutions de 10^{-1} à 10^{-6} de la suspension de selles. Après broyage de la chair et le liquide intervalvaire dans le broyeur (Moulinex), chaque dilution de la suspension virale est ajoutée à 50 g de chaque broyat. Après agitation pendant une heure à température ambiante, ces échantillons contaminés sont soumis aux deux techniques d'extraction (E1) et (E2) décrites précédemment.

2.4. Concentration virale

Le surnageant obtenu suite à l'extraction virale est concentré par le Polyéthylène Glycol 6000 (PEG 6000) [21]. La solution de PEG 6000 à 50 % est ajoutée à l'extrait obtenu dans un rapport de 1/4 (v/v). L'ensemble est incubé une nuit à 4°C . Le précipité formé est récupéré par centrifugation à 10 000 g pendant 90 minutes à 4°C . Le culot est remis en suspension dans 10 ml de tampon phosphate (PBS, pH = 7,2). Une décontamination au chloroforme est ensuite réalisée, suivie d'une clarification du surnageant par centrifugation à 1500 g pendant 40 minutes à 4°C . Le surnageant obtenu est récupéré, son pH est ajusté à 7,2 et est conservé à -20°C jusqu'à l'étape d'extraction de l'ARN viral.

2.5. Détection du génome viral

2.5.1. Extraction de l'ARN viral par le phénol-chloroforme-alcool isoamylique

Un volume de 10 μl de protéinase K (20 mg/ml) est ajouté à 400 μl du surnageant obtenu lors de la première étape d'extraction et concentration virale dans un tube eppendorf stérile puis incubés à 56°C pendant 60 minutes. Par la suite, 400 μl du mélange phénol-chloroforme-alcoolisoamylique 25/24/1 (v/v/v) (Promega) sont additionnés au mélange et homogénéisés pendant 15 secondes. Après centrifugation à 17 000 g pendant 15 minutes à 4°C , le surnageant est récupéré puis transféré dans un autre tube eppendorf contenant 40 μl d'acétate de sodium 3 M pH 5,5 et 900 μl d'éthanol absolu glacial. Les tubes sont retournés pendant dix secondes et placés au moins une heure à -80°C . Après centrifugation à 17 000 g pendant 30 minutes à 4°C , le surnageant est enlevé délicatement et le culot est repris dans 500 μl d'éthanol 75 % et centrifugé à 17 000 g pendant 15 minutes à 4°C . Après élimination complète du surnageant, le culot est séché sous vide pendant cinq à sept minutes puis repris dans 30 μl d'eau ultrapure stérile contenant 3 μl de RNAsine (Invitrogen). L'extrait est conservé à -80°C afin d'être utilisé par la suite pour la détection des génomes viraux par RT-Nested-PCR.

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/4136226>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/4136226>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)