

Détection des virus entériques dans les eaux usées de la région de monastir par RT-PCR

Mouna Hassine, Khira Sdiri, Samira Riabi, Abir Beji, Zaidoun Aouni, Mahjoub Aouni

Laboratoire des Maladies Transmissibles et Substances Biologiquement Actives, Faculté de Pharmacie de Monastir.

M. Hassine, K. Sdiri, S. Riabi, A. Beji, Z. Aouni, M. Aouni

M. Hassine, K. Sdiri, S. Riabi, A. Beji, Z. Aouni, M. Aouni

Détection des virus entériques dans les eaux usées de la région de Monastir par RT-PCR

Detection of enteric viruses in wastewater of Monastir region by RT-PCR method

LA TUNISIE MEDICALE - 2010 ; Vol 88 (n°02) : 57 - 62

LA TUNISIE MEDICALE - 2010 ; Vol 88 (n°02) : 57 - 62

R É S U M É

Pré requis : Les virus entériques humains constituent un véritable danger pour la santé publique. Ces virus excrétés dans les selles à des concentrations importantes sont partiellement éliminés par les procédés mis en place pour le traitement des eaux usées. Les propriétés fondamentales de ces virus conditionnent leur devenir en milieu récepteur. Après rejet dans le milieu extérieur, ces virus ne peuvent pas se multiplier, mais ils vont s'agréger entre eux et/ou sur la matière particulaire.

But : La surveillance et la détermination de l'incidence saisonnière des virus entériques (calicivirus, entérovirus et virus de l'hépatite A) circulant dans la région de Monastir.

Méthodes : Détection de ces virus par une approche moléculaire basée sur la RT-PCR, cette technique a été utilisée sur 93 échantillons d'eaux usées collectés à partir de la station Sayada-Lamta-Bouhjar et de la station El Frina, durant la période s'étalant entre le mois d'Octobre 2005 et le mois de Juillet 2006.

Résultats : L'étude moléculaire a montré que les calicivirus ont été rencontrés dans 67,56% des échantillons d'eaux usées et présentent une répartition essentiellement hivernale avec un pic ponctuel en printemps. Les entérovirus ont été détectés dans 35,13% des échantillons testés et présentent une circulation régulière durant toute l'année avec une dominance estivo-automnale. Enfin, la présence du virus de l'hépatite A a été notée surtout en hiver dans 10,81% des échantillons d'eaux usées.

Conclusion : La fonction épuratoire de ces stations est insuffisante sur le plan virologique.

S U M M A R Y

Background: Wastewater frequently has been contaminated by enteric viruses, which can cause gastroenteritis, hepatitis, and other viral diseases. Since current water treatments do not ensure their complete removal and they become contaminants of the water environment.

Aim: In order to monitor and assess the prevalence and the seasonal incidence of enteric viruses contaminating wastewater, a total of 93 samples were collected from the stations of Sayada-Lamta-Bouhjar and El Frina.

Methods: The purpose of this study is to establish a rapid, sensitive and specific RT-PCR method using highly conserved primers to detect enteric viruses (caliciviruses, enteroviruses and hepatitis A viruses) circulating in the area of Monastir, during the period from October 2005 to July 2006.

Results: Our study shows that the caliciviruses were detected in 67.56% of the wastewater samples and present an essentially winter distribution with a specific peak in spring. The enteroviruses were detected in 35.13% of the samples tested and present a regular circulation during the year with a predominance in the summer and early fall. Finally, the presence of hepatitis A viruses was noted especially in winter in 10.81% of the wastewater samples.

Conclusion: We notice that current wastewater treatment methods are sometimes not efficient to eliminate enteric viruses.

Mots - clés

Calicivirus - Entérovirus, Virus de l'hépatite A - Eaux usées - RT-PCR.

Key - words

Caliciviruses -Enteroviruses - Hepatitis A virus - Wastewater, RT-PCR.

Les principaux virus humains susceptibles de contaminer les eaux usées sont les virus nus, capables de résister dans l'environnement et donc essentiellement les virus présentant un cycle de multiplication entérique. Plusieurs de ces virus, à savoir les calicivirus, les entérovirus, le virus de l'hépatite A, les rotavirus et les adénovirus sont excrétés dans les selles des malades ou de porteurs sains et se retrouvent dans les eaux usées (1,2,3). Pour la mise en évidence des virus entériques, la technique de référence demeure l'isolement sur culture cellulaire. Cependant, la difficulté de cette technique réside dans le fait qu'elle est difficile pour le virus de l'hépatite A et qu'il n'existe pas de modèle de culture cellulaire spécifique aux calicivirus. Ainsi, l'essor de la biologie moléculaire a permis la mise au point de méthodes fiables et sensibles pour la détection des virus entériques dans les prélèvements environnementaux. Le but de ce travail est de déterminer la prévalence des calicivirus, des entérovirus et du virus de l'hépatite A dans les eaux usées de la région de Monastir au cours d'une période s'étalant entre le mois d'Octobre 2005 et le mois de Juillet 2006 et de déterminer l'incidence saisonnière de leur circulation.

MATERIEL ET METHODES

Matériel

1. Eaux usées

Quatre-vingt-treize échantillons d'eaux usées ont été collectés durant la période Octobre 2005-Juillet 2006 à partir de deux stations d'épuration dans la région de Monastir utilisant le procédé des boues activées (station Sayada-Lamta-Bouhjar et station El Frina). Durant cette période 2 échantillons sont prélevés chaque semaine de chaque station : un échantillon à l'entrée (avant traitement) et un autre à la sortie.

Les paramètres physico-chimiques des eaux usées traitées et non traitées (température de l'eau, matières décantables (MD), potentiel d'hydrogène (pH), conductivité (Cd), dosage des chlorures (Cl⁻), demande chimique en Oxygène (DCO), demande biologique en Oxygène pendant 5 jours (DBO5), matières en suspension (MES)) nous ont été fournis par le personnel de ces stations (Tableau I).

Tableau 1 : Les moyennes des différents paramètres physico-chimiques étudiés.

Stations	Sayada-Lamta-Bouhjar		El Frina	
	Entrée	Sortie	Entrée	Sortie
Température de l'eau	20	20	20	20
MD (ml/l)	5,72	≤0,2	4,20	≤0,2
pH	7,32	7,28	7,54	7,47
Conductivité (µs/cm)	3158	3153	3707,7	3701,8
Chlorures (mg/l)	509,6	477,6	629,4	502
DCO (mg/l)	568,6	88	842	105
DBO5 (mg/l)	340,7	19,5	290	23,2
MES (mg/l)	558,2	27,6	206,25	28,5

2. Souches virales

La souche virale utilisée comme témoin positif pour la détection des entérovirus est une souche d'Echovirus 11 (E11) isolée en 1998 dans la région de Monastir à partir des eaux usées. Pour la détection du virus de l'hépatite A, nous avons utilisé la souche prototype HM-175 comme souche de référence. Pour les calicivirus, une souche de Hu Cv nous a été fournie gracieusement du CHU de Dijon, France, et a été utilisée comme souche de référence.

Méthodes

1. Extraction-Concentration des virus à partir des eaux usées

Pour la concentration et l'éluion des virus, nous nous sommes inspirés de la technique décrite par Gerba et Goyal (4). Cette technique a été modifiée et adaptée aux moyens techniques de notre laboratoire. Son principe repose sur la capacité des virus à se fixer sur un sel métallique puis d'en être décrochés en faisant varier les conditions électrochimiques.

Le protocole d'extraction-concentration des virus à partir des eaux usées est le suivant :

100 ml d'échantillon sont homogénéisés par agitation magnétique. Une solution de chlorure d'aluminium (AlCl₃) est ajoutée jusqu'à l'obtention d'une concentration finale de 510-4 M. L'eau est acidifiée à pH 3,5 à l'aide d'une solution de HCl 5 N. Le mélange est rigoureusement agité pendant 30 min, puis centrifugé à 6000 tours/min (tr/min) pendant 15 min à +4°C. Le culot est repris dans 100 ml d'une solution éluante d'extrait de viande à 10% (pH 9), agité pendant 30 min et centrifugé à 10 000 tr/min. Le surnageant est recueilli dans un récipient stérile auquel du polyéthylène glycol 6000 (PEG 6000) est ajouté jusqu'à une concentration finale de 10%. Le PEG est un polymère synthétique soluble dans l'eau, non toxique qui agit probablement en piégeant l'eau autour des virus provoquant ainsi leur précipitation. Après homogénéisation, la solution est incubée pendant une nuit à +4°C. Le précipité formé est ensuite récupéré par centrifugation à 10 000 tr/min pendant 45 min à +4°C et le culot est remis en suspension dans un faible volume de tampon phosphate (PBS) (pH 7-7,2). Cette solution est par la suite décontaminée par l'ajout d'un mélange d'antibiotiques (Pénicilline et Streptomycine) et d'antifongique (Fungizone).

2. Extraction de l'ARN viral

L'extraction du génome viral a été réalisée selon la technique décrite par Chomczynski et Sacchi (5) en utilisant le TRI-Reagent® (Sigma). Cette technique consiste à ajouter 500 µl de TRI-Reagent® qui assure la dégradation des protéines capsidales à 200 µl du concentré. Après une incubation à température ambiante pendant 5 min, 200 µl de chloroforme sont ajoutés afin de séparer l'acide nucléique des protéines. Le mélange est homogénéisé au vortex pendant 15 secondes et laissé en contact 15 min à température ambiante. Une centrifugation à 13 500 tr/min pendant 15 min à +4°C est effectuée afin de séparer les deux phases.

A la phase aqueuse (surnageant), un volume de 500 µl d'isopropanol est ajouté afin de précipiter l'acide nucléique. Après homogénéisation par retournement, le mélange est centrifugé à 13 500 tr/min à +4°C pendant 10 min et 1ml d'éthanol à 75% est ajouté au culot. L'ensemble est de nouveau centrifugé pendant 10 min à 7500 tr/min à +4°C. Le culot est lavé deux fois avec de l'éthanol à 75%. Le culot est ensuite séché puis repris dans 50 µl d'eau traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC).

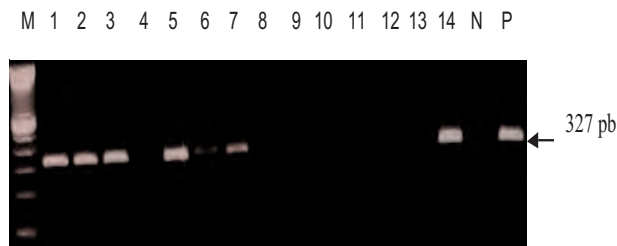
3. RT-PCR

Dans le cas des calicivirus, nous avons effectué une RT-PCR one-step en utilisant le couple d'amorces JV12-JV13 qui s'hybride à une région du cadre de lecture ouvert ORF1 codant l'ARN polymérase (6) (Tableau II). Le fragment amplifié a une taille de 327 pb (Figure 1).

Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées

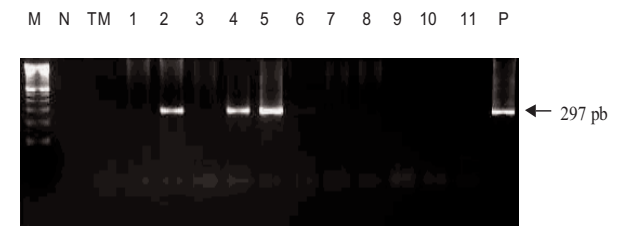
Oligonucléotides	Position dans le génome (pb)	Séquences nucléotidiques de 5' à 3'
JV12 (+)	4567-4587	ATACCACTATGATGCAGATTA
JV13 (-)	4896-4874	TCATCATCACCATAGAAAGAG
K1 (-)	596-577	ATTGTCACCATAAGCAGCCA
K2 (+)	83-67	ACCTTTGTACGCCTGTT
K3 (-)	182-166	AAGCACTTCTGTTTCCC
K4 (+)	463-447	ATTCAGGGGCCGAGGA
VHA1 (+)	2167-2141	GTTTGTCTCCTCTTACCATGCTATG
VHA2 (-)	2438-2413	GGAAATGTCTCAGGTACTTCTTTG

Figure 1 : Révélation sur gel d'agarose à 2% des produits d'amplifications des calicivirus par RT-PCR one- step. M : Marqueur de poids (100 pb Leader) ; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11,12, 13 et 14 : échantillons d'eaux usées analysés ; N : Témoin négatif ; P : Témoin positif.



Dans le cas des entérovirus, il faut repérer la séquence commune de tous les sérotypes qui présentent une certaine stabilité. Il s'agit d'une séquence située dans la région 5' non codante du génome (7). Pour cela nous avons adopté la technique de nested RT-PCR en utilisant deux couples d'amorces (K1-K2) et (K3-K4). Le fragment amplifié a une taille de 297 pb (Figure 2)

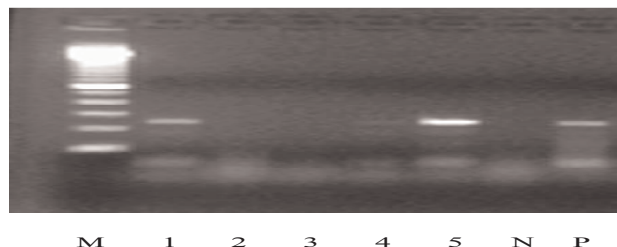
Figure 2 : Révélation sur gel d'agarose à 2% des produits d'amplification des entérovirus par nested RT-PCR. M : Marqueur de poids moléculaire (100 pb Leader) ; N : Témoin négatif ; TM : Témoin du mélange réactionnel ; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 et 11 : échantillons analysés ; P : Témoin positif (souche d'E11).



Dans le cas du virus de l'hépatite A, nous avons utilisé le couple d'amorces (VHA1-VHA2) (8), situé dans une région très conservée de la jonction VP1-VP3 du génome. Le fragment amplifié a une taille de 247 pb (Figure 3).

Pour le génome des entérovirus et du virus de l'hépatite A, l'amplification génomique est précédée par une étape de transcription inverse, au cours de laquelle un ADNc est synthétisé à partir du brin d'ARN. Pour ce faire, on prépare un mélange réactionnel de 10 µl constitué de 2 µl du tampon RT 5X (75 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,3), 10 mM de dithiothreitol (DTT), 0,2 mM de chaque dNTP, 50 pmol d'amorce anti-sens, 50 U de l'enzyme transcriptase reverse M-MLV-RT (Q-Biogen) et 5 µl de l'extrait d'ARN.

Figure 3 : Révélation sur gel d'agarose à 2% des produits d'amplifications du virus de l'hépatite A par RT-PCR. M : Marqueur de poids moléculaire (100 pb Leader) ; 1, 2, 3, 4 et 5 : échantillons analysés ; N : Témoin négatif ; P : Témoin positif (souche HM-175).



4. PCR

Pour les Calicivirus, la rétro-transcription et l'amplification sont réalisées en une seule étape à l'aide du one step RT-PCR kit (QIAGEN®).

La RT-PCR one-step se précède d'une étape de dénaturation initiale et qui se déroule à 94°C pendant 2 min. Avant que ces 2 min s'achèvent, les tubes contenant le mélange réactionnel suivant : 6,2 µl de H₂O, 50 pmol de l'amorce anti-sens JV13 et 7 µl d'ARN extrait subissent un choc thermique en les introduisant dans de la glace pendant au moins 3 min. Ensuite, à ce volume de 10 µl, on ajoute un volume réactionnel de 40 µl et qui comprend 25,4 µl de H₂O, 10 µl du tampon 5X, 0,2 mM de chaque dNTP, 1 µl de RNAsinh (Applied Biosystems), 1 µl du mélange enzymatique et 50 pmol de l'amorce sens JV12.

Pour les entérovirus, la réaction de polymérisation est réalisée selon le protocole décrit par Kämmerer et al (7). Un microlitre d'ADNc sont ajoutés à 23 µl de mélange réactionnel de PCR contenant 5 µl de tampon GoTaq 5X (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,9), 50 mM MgCl₂, 0,2 mM de chaque dNTP, 50 pmol d'amorces K1 et K2 et 1,25 U de l'enzyme GoTaq DNA polymerase (Promega).

Pour la nested PCR/5' non codante, le même mélange réactionnel a été utilisé que pour la réaction de polymérisation décrite ci-dessus à l'exception du couple d'amorces internes qui sont les amorces K3 et K4. La réaction a été effectuée en présence de 1 µl du premier amplifiât.

Pour amplifier le génome viral de l'hépatite A, nous préparons un mélange de volume égal à 20 µl composé de : 5 µl de tampon GoTaq 5X, 50 mM MgCl₂, 0,2 mM de chaque dNTP, 50 pmol de chaque amorce HAV1 et HAV2, 11 µl d'EBDS, 5 U de l'enzyme GoTaq DNA Polymerase (Promega) et 5 µl d'ADNc.

5. Migration électrophorétique

Les produits d'amplification subissent une électrophorèse sur gel d'agarose à 2% contenant 25 µg de Bromure d'Ethidium (BET) par gramme d'agarose émergé dans un tampon de migration Tris-Borate-EDTA (TBE) concentré 0,5X. Dans chaque puit 10 µl d'amplifiât sont déposés et la migration est faite à 90 Volts pendant 45 min. Un marqueur de taille de 100 pb (Pharmacia Biotech) est systématiquement inclus pour évaluer la taille du fragment amplifié. Les bandes d'ADN sont ensuite visualisées sous lumière ultraviolette.

RESULTATS

1. Détermination de la prévalence des virus entériques

L'analyse des résultats de la RT-PCR effectuée sur les 93 prélèvements a montré que 37 échantillons (39,78%) contiennent au moins un des trois virus recherchés, alors qu'aucun virus n'a pu être détecté dans le reste des échantillons (60,22%).

Selon cette approche basée sur la détection du génome viral, nous avons détecté respectivement les calicivirus, les entérovirus et le virus de l'hépatite A dans 67,56%, 35,13% et 10,81% de nos prélèvements.

L'association d'entérovirus et du virus de l'hépatite A dans un même échantillon d'eau usée, a été notée dans 4 cas, alors que la contamination simultanée d'un même échantillon par le virus de l'hépatite A et les calicivirus a été trouvée uniquement dans un seul échantillon. La présence simultanée d'entérovirus et des calicivirus n'a pas été signalée.

2. Recrudescence saisonnière des virus entériques

Le suivi de l'évolution des entérovirus dans les stations d'épuration étudiées a montré une circulation régulière de ces virus durant toute l'année (à l'exception du mois de Novembre, Février et Mars) avec une dominance estivo-automnale, ceci est en accord avec ce qui est connu à propos de la recrudescence saisonnière des entérovirus en climat méditerranéen (circulation faiblement endémique avec poussée épidémique estivo-automnale) (18, 19).

Concernant les calicivirus, ces virus ont été détectés du mois de Janvier au début du mois de Juin avec une forte prévalence aux mois de Février et Mai (c'est-à-dire au cours de la saison froide ou moyennement chaude). Nos résultats corroborent avec ceux trouvés par Melnick (20) et Lopman et al (21) qui ont montré que des épidémies à calicivirus peuvent être observées durant toute l'année avec une saisonnalité hivernale et apparition des pics épidémiques ponctuels observés surtout au printemps.

Dans le cas du virus de l'hépatite A, l'émergence des cas s'est restreinte aux mois de Décembre, Février et Avril.

DISCUSSION

Parmi les 93 échantillons d'eaux usées analysés, 37 (39,78%) étaient infectés par l'un des virus recherchés. Ce pourcentage confirme les résultats des travaux antérieurs (9, 10,11) concernant l'apport de la RT-PCR dans la détection des virus entériques dans les prélèvements environnementaux.

Les techniques de biologie moléculaire sont incapables de différencier entre l'ARN viral associé à des particules infectieuses et celui associé à des particules inactives. Cependant, Tsai et al (12) ont montré qu'à cause de la faible résistance de l'ARN viral nu dans l'eau naturelle, la RT-PCR détecte principalement l'ARN des particules virales bien protégées. En outre, Limsawat et al (13) ont prouvé que les résultats positifs en RT-PCR indiquent la présence récente des virus potentiellement viables. Mais, l'inconvénient majeur de la RT-PCR à partir des produits environnementaux est le fait d'être précédée par une étape d'extraction-concentration virale, pouvant ne pas éliminer les inhibiteurs de la PCR.

Néanmoins la RT-PCR reste un moyen pratique pour l'analyse des virus entériques du fait de sa rapidité, sensibilité et spécificité.

Le nombre de nos échantillons demeure cependant insuffisant pour discuter la prévalence de circulation des virus entériques dans la région de Monastir, mais nous pouvons dire que la présence des virus entériques à la sortie des stations d'épurations indique que le traitement des eaux usées est insuffisant sur le plan virologique. Ceci semble bien en accord avec d'autres travaux réalisés dans des pays développés tels que

l'Espagne, les Pays bas (14, 15) ainsi qu'en Tunisie qui ont montré que les processus de traitement des eaux usées sont inefficaces pour éliminer entièrement les virus entériques (16, 17). Les eaux rejetées dans la mer et/ou utilisées pour l'irrigation des plantations restent donc une source de dissémination de ces virus. Ceci implique que l'utilisation des eaux épurées doit être limitée à certains usages contrôlés dont le risque de contamination pour les humains serait minime (par exemple l'irrigation des cultures non maraîchères, l'irrigation des terrains de golf, etc...)

En Tunisie, les eaux usées traitées doivent répondre à la norme NT106.02 (d'après l'Institut National de la Normalisation et de la propriété industrielle (INNORPI), normes de rejet dans un milieu hydrique). L'analyse des différents paramètres physico-chimiques (Tableau I) montre que la station d'épuration El Frina reçoit des eaux plus polluées que la station d'épuration Sayada-Lamta-Bouhjar. Ces eaux présentent une conductivité et une quantité de chlorures élevées. Une autre différence que nous pouvons remarquer et que la station El Frina reçoit une grande partie d'eaux industrielles riches en polluants chimiques (DCO élevée) provenant d'industrie textile, alors que la station Sayada-Lamta-Bouhjar reçoit surtout des eaux domestiques. Ceci peut expliquer le pourcentage faible des virus entériques isolés de la station El Frina. De point de vue efficacité, notre étude a montré que les deux stations ont rejeté des effluents qui obéissent à la norme tunisienne NT106.02. Les valeurs de pH respectent les normes puisque la plage acceptable dans le cas d'eaux usées à rejeter dans le milieu hydrique est de 6,5 à 8,5. En effet, une eau acide aura tendance à corroder ou user l'équipement et une eau alcaline occasionnera des dépôts de tartres dans les conduites. Selon les normes, les matières en suspension (MES) qui constituent l'essentiel de la pollution ne doivent pas dépasser 30 mg/l dans les effluents des eaux usées. Dans les deux stations étudiées les valeurs moyennes de MES dans les eaux usées traitées sont 27,6 mg/l et 28,5 mg/l, respectivement, pour la station Sayada-Lamta-Bouhjar et El Frina. Concernant les matières décantables (MD), les normes tunisiennes exigent des valeurs inférieures à 0,3 mg/l après deux heures de décantation, et dans notre étude les deux stations rejettent des eaux traitées dont les moyennes de MD sont $\leq 0,2$ mg/l. De même pour la DBO5, la valeur maximale acceptable dans les rejets d'eaux usées traitées est fixée à 30 mg O2/l. Cette norme a été respectée par les deux stations (Sayada-Lamta-Bouhjar : DBO5 = 19,5 mg O2/l et El Frina : DBO5 = 23,2 mg O2/l). Pour la DCO, la norme fixée à 90 mg/l a été légèrement dépassée par la station El Frina (DCO = 105 mg/l) et respectée par la station Sayada-Lamta-Bouhjar (DCO = 88 mg/l). Pour les deux stations, les eaux usées traitées contiennent une quantité moyenne de chlorure conforme à la norme fixée à 700 mg/l. Globalement la qualité des eaux usées traitées dans les deux stations étudiées est acceptable puisque le traitement et la réduction de la pollution organique satisfont la norme de rejet dans le milieu naturel.

Le fait de trouver les virus entériques à la sortie des deux stations d'épuration montre que ces virus ont trouvé des conditions physico-chimiques favorables permettant leur stabilité et leur résistance. Nous pouvons citer comme exemple

le pH qui a une moyenne de 7,39 à l'entrée et à la sortie de ces stations. Ce pH est favorable à la survie des virus entériques puisque ces virus sont stables entre pH 3 et 10. Il en est de même pour la température de l'eau qui a une valeur de 20°C, alors que les virus entériques ne sont inactivés que par une chaleur au-delà de 45°C.

Cependant, notre étude ne nous permet pas de discuter concrètement l'efficacité de l'abattement viral pour ces deux stations, et cela pour plusieurs raisons : (i) nos résultats sont qualitatifs, (ii) nous ne disposons pas de méthode quantitative standard spécifique pour les prélèvements environnementaux, (iii) en Tunisie, il n'existe pas de recommandations, ni de limites ou de normes définissant les quantités minimales acceptables en virus entériques au niveau des eaux usées traitées.

CONCLUSION

L'essor de la biologie moléculaire a permis la mise au point de méthodes fiables et sensibles pour la détection des virus entériques dans les prélèvements environnementaux. La forte prévalence des virus entériques dans les eaux usées a également été démontré par d'autres équipes (22, 9, 23).

La culture cellulaire, bien que c'est la technique de référence pour la détermination du caractère infectieux des virus, elle est difficile à appliquer dans le cas du virus de l'hépatite A et les calicivirus difficilement cultivables.

Plusieurs études (24) ont montré que l'amplification génomique à partir de surnageant de culture cellulaire est plus rentable du fait que la culture cellulaire, d'une part, augmente le faible titre des virus rencontré dans les prélèvements environnementaux et d'autre part, élimine l'action des substances inhibitrices des enzymes utilisées en RT-PCR. Donc, pour valoriser notre travail, il est nécessaire de typer les virus isolés afin de déterminer les sérotypes circulants.

La présence de ces virus à la sortie des stations d'épuration reflète la défektivité du traitement pour l'abattement viral. Il est donc indispensable de préserver la qualité des eaux côtières afin d'éviter une éventuelle transmission à l'homme en particulier lors de la consommation des coquillages contaminés. Pour ce faire, l'équipement des stations d'épuration de systèmes efficaces de désinfection et la limite des apports d'eaux contaminées à proximité des zones de production, peut améliorer la situation.

REMERCIEMENTS

Nous remercions tout le personnel de l'Office National de l'Assainissement de la région de Monastir pour la collaboration dans la collecte des échantillons.

RÉFÉRENCES

1. Bosch A, Lucena F, Diez JM, Gajardo R, Blasi M, and Jofre J. Waterborne viruses associated with hepatitis outbreak. *Res. Technol. Manag.* 1991; 3: 80-83.
2. Metcalf T, Melnick J, and Estes M. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology- a trip of over 50 years. *Annu. Rev. Microbiol.* 1995; 49: 461-487.
3. Brugha R, Vipond I, and Evans M. A community outbreak of food-borne small round-structured virus gastroenteritis caused by a contamination water supply. *Epidemiol. Infect.* 1999; 122: 145-154.
4. Gerba CP, and Goyal SM. *Methods in environmental virology.* Microbiology Series. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York and Basel. 1982; 7: 151-160.
5. Chomczynski P, and Sacchi N. Single step method of isolation of RNA by guanidium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162: 156-159.
6. Vinjé J, and Koopmans MP. Molecular detection and epidemiology of small round structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J. Inf. Dis.* 1996; 174: 610-615.
7. Kämmerer U, Kunkel B, and Kun K. Nested PCR for specific detection and rapid identification of human picornaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32: 285-291.
8. Traoré O, Arnal C, Mignotte B, Maul A, Laveran H, Billaudel S, and Schwartzbrod L. Reverse transcriptase PCR detection of Astrovirus, Hepatitis A virus and Poliovirus in experimentally contaminated mussels: comparison of several extraction and concentration methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64: 3118-3122.
9. Puig M, Jofre J, Lucena F, Allard A, Wadell G, and Girones R. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994; 60: 2963-2970.
10. Abbaszadegan M, Stewart P, and Le Chevalier M. A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65: 444-449.
11. Schvoerer E, Ventura M, Dubos O, Cazaux G, Serceau R, Gournier N, Dubois V, Caminade P, Fleury H, and Lafon ME. Qualitative and quantitative molecular detection of enteroviruses in water from bathing areas and from a sewage treatment plant. *Res. Microbiol.* 2001; 152: 179-186.
12. Tsai YL, Tran B, and Palmer CJ. Analysis of viral RNA persistence in seawater by reverse transcriptase-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 61: 363-366.
13. Limsawat S, and Ohgaki S. Fate of liberated viral RNA in wastewater determined by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997; 63: 2932-2933.
14. Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J, and Girones R. Viral pollution in the environment and in shellfish: Human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 9: 3376-3382.
15. Koopmans M, Von Bonsdorff CH, Vinjé J, De Medici D, and Monroe S. Food-borne viruses. *FEMS. Microbiol. Rev.* 2002; 26: 187-205.
16. Sdiri K, Khelifi H, Belguith K, and Aouni M. Comparaison de la culture cellulaire et de la RT-PCR pour la détection des entérovirus dans les eaux usées et les coquillages en Tunisie. *Pathol. Biol.* 2006; 54: 280-284.
17. Belguith K, Bouslama L, Nsaibia S, Sdiri K, Ben Othman H, and Aouni M. Comportement des entérovirus au cours des traitements des eaux usées. *Microbiol. Hyg. Alim.* 2006; 52: 27-33.
18. Nairn C, and Clements GB. A study of enterovirus isolation in Glasgow from 1977 to 1997. *J. Med. Virol.* 1999; 58: 304-312.
19. Belguith K, Hassen A, Gharbi J, and Aouni M. Dominance de la circulation des echovirus dans les eaux usées de la région de Monastir. *Microbiol. Hyg. Alim.* 2004; 47: 49-53.
20. Melnick JL. Enteroviruses. In: Evans SE. *Viral infections of humans.* Epidemiology and control. 3rd Edition. New York: Plenum Publishing corporation. 1991: 191-263.
21. Lopman B, Vennema H, Kohli E, Pothier P, Sanchez A, Negrodo A, Buesa J, Schreier E, Reacher M, and Brown D. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *The Lancet* 2004; 363: 682-688.
22. Bosch A, Pinto R, Blanch A, and Jofre J. Detection of human rotavirus in sewage through two concentration procedures. *Wat. Res.* 1988; 22: 343-48.
23. Green D, and Lewis G. Comparative detection of enteric viruses in wastewaters, sediments and oysters by reverse transcription-PCR and cell culture. *Wat. Res.* 1999; 33: 1195-1200.
24. Chung H, Jaykus L, and Sobsey M. Detection of human enteric viruses in oysters by in vivo and in vitro amplification of nucleic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996; 62: 3772-3778.