

## DETECTION PAR RT-PCR DU VIRUS DE L'HEPATITE A DANS LES SELLES D'ENFANTS DIARRHEIQUES A ABIDJAN RCI

BINI J.C.<sup>1\*</sup>, EKAZA E.<sup>1</sup>, KOUASSI-M'BENGUE A.<sup>1</sup>, FAYE-KETTE H.<sup>1</sup>,  
VEH K.A.<sup>1</sup>, BORGET-ALLOUE M.Y.<sup>2</sup>, AKRAN A.V.<sup>1</sup>, DOSSO M.<sup>1</sup>

### RESUME

Les hépatites aiguës constituent un problème de santé publique dans le monde du fait de la morbidité élevée. Parmi les virus hépatiques, le virus de l'hépatite A est la forme la plus répandue surtout chez les enfants. Sa dissémination est liée au bas niveau d'hygiène d'où sa fréquence dans nos pays en développement. Des études de séroprévalence ont été réalisées dans la plupart de nos pays avec des taux variables. Mais celles concernant la détection du virus de l'hépatite A dans les selles sont rares. En Côte d'Ivoire, aucune étude n'a été menée sur le niveau de circulation de l'hépatite A dans les selles.

Notre objectif était de détecter par RT-PCR le virus de l'hépatite A dans les selles chez une population abidjanaise. Ainsi, l'ARN viral de 30 échantillons de

selles provenant de patients âgés de 0 à 6 ans a été extrait selon la méthode de Boom. Les ARN extraits ont été amplifiés par RT-PCR utilisant des amorces spécifiques ciblant une portion de la région VP1 du génome du virus de l'hépatite A. Le génome du virus de l'hépatite A a été retrouvé dans 20% (6/30) des selles analysées.

Cette étude a permis pour la première fois de mettre en évidence le génome viral du virus de l'hépatite A montrant ainsi le niveau de circulation de ce virus dans la population infantile en Côte d'Ivoire.

**MOTS-CLÉS :** VIRUS DE L'HÉPATITE A, RT-PCR, DIARRHÉES, ENFANTS, ABIDJAN.

### SUMMARY

**Background :** Among the gastroenteritis, hepatitis A by a quiet incubation can lead to a serious epidemic and sometimes mortal. The subjects in phase of incubation of the disease excrete  $10^9$  particles per gram of stools [6] which are dispersed in the environment water. This viral dispersion is at the base of the transmission of the feco-oral examination type. No study on the presence of the virus of hepatitis A in the stools was undertaken in Côte d'Ivoire.

**Objective :** To show the importance of the research of the virus of hepatitis A in the stools by RT-PCR.

**Material and methods :** Thirty samples of stools coming from ambulatory patients from 0 to 6 years were analyzed according to the method of Boom, for the

extraction of the RNA. The extracted RNA was amplified by RT-PCR by using specific primers targeting a portion of area VP1 of the genome of the virus of hepatitis A.

**Results :** The genome of the virus of hepatitis A was found in 20% (6/30) of the stools analyzed.

**Conclusion :** This study by the use of RT-PCR made it possible to show the existence of the virus of hepatitis A in the stools. It also made it possible to show the role which the stools in the dissemination of the disease play.

**KEY WORDS :** HEPATITIS A VIRUS , RT-PCR, DIARRHOEA, CHILDREN, ABIDJAN

---

1- Unité de Microbiologie Moléculaire, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire 01 BP 490 Abidjan 01, Côte d'Ivoire  
2- Laboratoire RETROCI du CHU Treichville,  
01 BP 1712 Abidjan 01, Côte d'Ivoire.

**Correspondance :** M<sup>r</sup>. BINI Jean Claude\*

Tél. : (225) 07-86-60-81

22 BP 823 Abidjan 22

Email: jcbini@yahoo.fr

## INTRODUCTION

L'hépatite A est l'hépatite virale, la plus répandue au monde avec des zones de haute endémicité en Afrique et en Asie du Sud-Est. Dans les pays développés, le virus de l'hépatite A est la cause majeure des hépatites aiguës [20]. Asymptomatiques dans 90% des cas, le virus de l'hépatite A est excrété dans les selles à une concentration de 10<sup>9</sup>/g de selles [8]. La transmission est féco-orale [17]. L'infection peut survenir à tout âge mais elle est plus fréquente chez les jeunes. Le diagnostic clinique de l'hépatite A aiguë est évoquée par l'ictère et confirmé par la présence des anticorps anti-VHA de type IgM [5]. Les IgM anti-VHA disparaissent en moyenne vers la 10<sup>ème</sup> semaine et font place aux IgG anti-VHA qui persistent longtemps. La détection des IgG est plus élevée avec 90% des sujets des pays en développement contre 30-40% des sujets des pays industrialisés [3].

En Côte d'Ivoire, en 2005 la séroprévalence du virus de l'hépatite A était de 52,9% selon Ahoussou [2]. Peu d'études ont été menées jusqu'à ce jour sur le niveau de circulation du virus de l'hépatite A, dans les selles notamment. Si le diagnostic biologique de l'hépatite A aiguë demeure la mise en évidence de l'IgM anti-VHA, la détection du génome viral dans les selles par la biologie moléculaire permet de mesurer la durée de l'excrétion virale dans le temps et l'espace ; la mise en oeuvre de mesures de surveillance épidémiologique et d'hygiène environnementale.

Cette étude a pour objectif de détecter par RT-PCR, le virus de l'hépatite A et de déterminer le niveau de circulation de celui-ci dans les diarrhées infantiles à Abidjan sans au préalable connaître le statut sérologique anti-VHA de type IgM et/ou de type IgG des enfants.

## MATERIELS ET METHODES

**Collecte des échantillons :** Il s'agit d'une étude transversale qui s'est déroulée de décembre 2005 à mars 2006 à l'Unité de Microbiologie Moléculaire de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Un total de 30 échantillons de selles a été collecté. Tous les patients de 0 à 6 ans ayant une diarrhée ont été inclus dans l'étude.

**Dilution des selles :** Une suspension des selles à 10% (poids/volume) a été effectuée dans du sérum physiologique (NaCl 0,89%). La suspension a été par la suite centrifugée à 4000xg à +4°C pendant 20 min. Un filtrat a été obtenu après passage du surnageant sur des filtres millipores de 0,22 µm de diamètre et conservé à -20°C jusqu'à son analyse.

**Extraction des ARN :** L'extraction des ARN a été réalisée selon la méthode de Boom [6] : 300 µl du filtrat ont été ajoutés à 900 µl de tampon de lyse (5M Guanidine de Thiocyanate, 0,1M Tris-HCl pH 6,4 ; 0,2M EDTA pH 8 et 2,6% Triton X-100) et 50 µl de suspension de silice. Après une incubation de 10 min à température ambiante, le mélange

a été centrifugé pendant 2 min à 14000xg. Le culot a été lavé par 1ml de tampon de lavage (5M Guanidine de Thiocyanate, 0,1M Tris-HCl pH 6,4) suivi d'une centrifugation à 14000xg pendant 2 min à +4°C. Un second lavage à la guanidine a été réalisé sur le culot obtenu, suivi de deux lavages à l'éthanol à 70% froid et enfin un dernier lavage par de l'acétone pur. Le culot séché, a été élué dans 70 µl de tampon TE (10mM Tris-HCl et 1mM EDTA pH 8.0). Après une centrifugation à 14000xg pendant 5 min à +4°C, le surnageant contenant les ARN a été transféré dans un tube stérile. L'extrait d'ARN a été conservé à -20°C.

**Transcription inverse et amplification génique par PCR (RT-PCR) :** La transcription des ARN en ADNc a été réalisée selon la méthode de Papaventsis D. [18] : 9 µl d'extrait d'ARN ont été ajoutés à 50 pmol/µl d'amorce antisens H1 (5'-GGA AAT GTC TCA GGT ACT TTC TTT G-3') et 20 U de RNase inhibitor (Applied Biosystems). Après chauffage à 70°C pendant 5 min et refroidissement rapide sur

glace, la réaction de transcription inverse a été effectuée dans un volume final de 25 µl contenant 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de chaque dNTP, 50 U Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Applied Biosystems). Le mélange a été incubé pendant 60 min à 42°C et chauffé pendant 5 min à 95°C pour l'inactivation de la Reverse Transcriptase.

L'ADNc synthétisé, a été amplifié par PCR en utilisant les amorces ciblant une portion de la région VP1 du génome viral. Les amorces utilisées sont H1 antisens et H2 sens (5'- GTT TTG CTC CTC TTT ATC ATG CTA TG-3'). Ces amorces permettent d'amplifier un fragment de 247 pb spécifique du gène ciblant une portion de la région VP1 du génome du virus de l'hépatite A. La PCR a été effectuée dans un volume final de 50 µl contenant 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de chaque dNTP 20 pmoles/µl de chaque amorce, 1 U d'ampli

Taq DNA polymérase (Applied Biosystems) et 5 µl d'ADNc.

Les conditions d'amplification comprennent une dénaturation initiale pendant 5 min à 94°C, une étape cyclique répétée 40 fois dont une phase de dénaturation 30 sec à 94°C, une phase de fixation des amorces 30 sec à 50°C et une phase d'élongation 30 sec à 72°C ;

suivi d'une élongation finale pendant 7min à 72°C. Les produits d'amplification ont été identifiés par électrophorèse en gel d'agarose à 1% contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium. L'observation des produits d'amplification a été faite sur une table à UV.

**Analyse statistique :** Les données ont été enregistrées et analysées grâce au logiciel EpiInfo 6.0. Le test de Fischer exact et le test de khi<sup>2</sup> ont été utilisés avec un seuil d'erreur α de 5% (α = 0,05).

## RÉSULTATS

**Enquête épidémiologique :** Un total de 30 enfants a été inclus dans cette étude. Selon l'âge les enfants de moins de 2 ans représentaient 63% (19/30) et les enfants de plus de 2 ans, 37% (11/30). Le sex ratio était de 1,7 avec une prédominance masculine. Les patients présentaient des symptômes variés avec 57% de vomissements (17/30), 50% de douleurs abdominales (15/30) et 30% de fièvre (9/30) (Tableau I). Une diarrhée isolée était retrouvée dans 10% (3/30) des cas et associée à d'autres symptômes dans 90% (27/30) des cas (Tableau II).

**Tableau I :** Fréquence du virus de l'hépatite A par rapport aux signes cliniques isolés

Symptômes	VHA	
	+	-
Fièvre (n=9)	0	9
Vomissements (n=17)	2 (12%)	15 (88%)
Douleurs abdominales (n=15)	5 (33%)	10 (67%)

VHA : Virus de l'hépatite A

Le taux de détection du VHA était plus élevé au cours des douleurs abdominales.

**Tableau II :** Fréquence du virus de l'hépatite A par rapport à l'association des signes cliniques.

Symptômes	Effectifs N	Virus hépatite A	
		Positif	Négatif
Diarr. isolées	3	0	3
Diarr. + F°	3	0	3
Diarr. + vomiss	6	1	5
Diarr. + Doul. abdom	4	4	0
Diarr. + F° + vomiss	3	0	3
Diarr. + Vomiss. + Doul. abdom.	3	0	3
Diarr. +	8	1	7
Diarr. + F° + vomiss + Doul. abdom	-	0	0
Diarr. +	30	6	24

Diarr = Diarrhée,

F°= Fièvre,

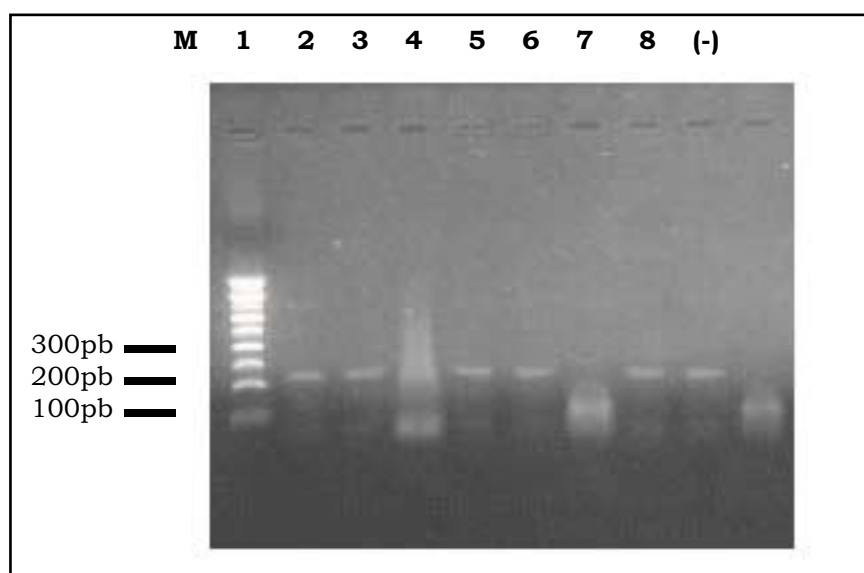
Vomiss. = Vomissements,

Doul. Abdom. = Douleurs abdominales

Sur les 6 patients positifs, 4 avaient une diarrhée associée aux douleurs abdominales.

### Analyse virologique

Le fragment de 247pb (figure 1), portion du génome du virus de l'hépatite A, a été détecté dans 6 selles sur 30, soit une fréquence de détection de 20%. Parmi ces 6 selles positives pour le virus de l'hépatite A, 2 provenaient d'enfants âgés de moins de 6 mois et 4 enfants âgés de 2 ans et plus. Le taux de détection du virus de l'hépatite A était de 12% [2/17] chez les patients qui avaient des vomissements et de 33% [5/15] chez les patients qui se plaignaient de douleurs abdominales. Parmi les 6 enfants positifs pour le VHA, aucun cas de fièvre n'a été notifié. Le génome du virus de l'hépatite A a été retrouvé dans 3 selles sur 6 chez les enfants de sexe masculin et dans 3 selles sur 6 chez les enfants de sexe féminin. La recherche de relation entre la présence de virus et les signes cliniques n'a pas montré une différence significative ( $p > 0,05$ ).



**Figure 1** : Electrophorèse en gel d'agarose à 2% contenant du bromure d'Ethidium à 0,5 $\mu$ g/ml des produits d'amplification par RT-PCR du gène VP1 du virus de l'Hépatite A à partir des échantillons de selles analysés.

Piste M : Marqueur de poids moléculaire «Smart Ladder» (Eurogentec) ; piste 1 et 7 : Prélèvement de selles des patients de 2 ans et demi ; piste 2 : Prélèvement de selles d'un patient de 5 ans ; piste 3 : Prélèvement de selles d'un patient de 10 mois ; piste 4 : Prélèvement de selles d'un patient de 6 mois ; piste 5 : Prélèvement de selles d'un patient de 5 mois ; piste 6 : Prélèvement de selles d'un patient de 1 an et demi ; piste 8 : Prélèvement de selles d'un patient de 4 ans ; piste (-) Contrôle négatif (eau distillée stérile).

### DISCUSSION

Cette étude a permis de détecter le génome du virus de l'hépatite A dans les selles à un taux de 20% (6/30). Ce taux correspond à l'excrétion du virus de l'hépatite A dans les selles.

Au cours du cycle de l'infection du virus de l'hépatite A, le virus commence à être excrété dans les selles environ une semaine avant l'apparition des signes cliniques.

Cette excrétion correspond à la période de contagiosité du sujet qui peut se prolonger pendant plusieurs mois et précède aussi l'apparition des IgM et des IgG dans le sang. Nos résultats sont proches à ceux de Coulepis en 1980, en Australie avec un taux de 29,5% [9].

Dans les pays en développement, plusieurs études ont été menées sur la séroprévalence du VHA avec des taux variables. Ainsi en Guinée, le taux de détection était de 67% [14], au Sénégal 62% [4], 80% en Afrique du sud [1] et 52,9% en Côte d'Ivoire [2]. Par contre, on note une baisse de ces taux dans les pays développés. En France, la séroprévalence est passée en 20 ans, de 50% en 1978 à 10% en 1997 [15] chez les jeunes recrues du service national. Cette différence pourrait s'expliquer par l'amélioration des conditions sanitaires, en particulier en matière d'assainissement public. Cela fait diminuer la circulation du virus et la fréquence des contaminations par le VHA.

Dans notre étude, le génome du VHA a été détecté chez 2 enfants âgés de moins de 6 mois. Cette précocité de détection du VHA est également signalé par Ahoussou [2]. Ces résultats rejoignent l'assertion selon laquelle dans les pays en développement, les jeunes enfants sont exposés très tôt au VHA. Dans les zones de haute endémicité, le taux de séroprévalence est proche de 100% chez les enfants de moins de 5 ans [12]. Les manifestations cliniques au cours de notre étude par rapport à la détection du génome du VHA étaient variées. En effet, 12% des patients signalaient des vomissements et 33% se plaignaient de douleurs abdominales. Par contre tous les patients avaient la diarrhée mais aucun n'était fébrile. Ces éléments nous emmènent à discuter de la signification réelle de la détection virale du VHA dans les selles. En effet, il pourrait s'agir de porteurs sains. Comme cela fut démontré par De Filippis en 1987 [10] et d'autres auteurs qui ont pu détecter le VHA dans les selles d'individus apparemment sains [13, 22]. Des données qui montrent le rôle que joue les selles dans la propagation du virus de l'hépatite A. Néanmoins, ces symptômes

non spécifiques (douleurs abdominales, vomissements, diarrhées, asthénie, anorexie, myalgies) peuvent précéder de quelques jours l'apparition d'un ictère et par conséquent échapper au diagnostic. Nos résultats rejoignent certains auteurs qui ont montré l'importance de la RT-PCR dans le diagnostic précoce de l'infection à hépatite A [16, 21]. Ces différentes études montrent que la détection du VHA dans les selles par RT-PCR peut être considérée comme une seconde option pour le diagnostic de l'hépatite A aiguë.

Les enfants de moins de cinq ans de par leurs activités ludiques constituent un réservoir de virus important dans nos pays en développement. Ils peuvent excréter le VHA de manière prolongée dans les selles parfois plusieurs mois. Ainsi, le virus de l'hépatite A très résistant dans le milieu extérieur ainsi qu'aux agents physiques et chimiques va persister longtemps dans le sol, l'eau et les aliments. Dans les pays en développement, le manque d'eau potable, d'hygiène et d'assainissement sont surtout autant de facteurs de risque.

En France, les hépatites virales dont l'hépatite A sont inscrites au tableau des maladies professionnelles du régime général (décret du 22 juin 1984) pour les professions en contact avec le sang et les produits biologiques en particulier les selles.

Compte tenu de la dangerosité du VHA et des nombreuses formes inapparentes dans les pays endémiques les selles doivent être manipulés avec beaucoup de précaution.

En conclusion, cette étude a permis de montrer l'importance de la RT-PCR dans la recherche du VHA dans les selles. Le niveau de circulation du VHA est élevé au niveau de la population infantile qui constitue un réservoir non négligeable. Cette étude met également en exergue l'intérêt de la surveillance environnementale par la méthode RT-PCR afin d'améliorer le niveau d'hygiène de la population.

Par ailleurs, il est nécessaire de mener des études dans les eaux (environnementales) pour déterminer le niveau de circulation du VHA dans l'environnement.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- ABDOOL KARIM S.S. and COUTSOUDIS A. 1993. Sero epidemiology of hepatitis A in black South African children. *S. Afr. Med. J.*; 83(10): 748-50
- 2- AHOUSSOU E. 2005. Etude de la séroprévalence de l'hépatite A chez l'enfant à Abidjan. *Thèse*. UFR des Sciences Pharmaceutiques. Université de Cocody. 2004-2005. 128P
- 3- BAIN V.G. et MA M. Hépatite virale aigüe. In *Principes fondamentaux de gastro-entérologie*. Ch. 14 Sect. 4 pp. 539-553.
- 4- BARIN F., DENIS F., CHOTARD J., PAULIN R., DIOP MARI., CHIRON J.P. et coll. 1980. Etude séro épidémiologique de l'hépatite A chez l'enfant sénégalais. *Ann. Pediatr.* 27(8) : 539-4.
- 5- BIZIAGOS E., DIVIZA M., CRANCE J.M., DELOINCE R., PANAA. 1991. Techniques de mise en évidence des virus des hépatites. In *virologie des milieux hydriques*. Louis SCHWARTZBROD. Tec et Doc-Lavoisiers Ch. 7 P. 187-211.
- 6- BOOM R., SOL C. J. A., SALIMANS M.M.M., JANSEN C.I., WERTHEIM VAN DILLEN P. M.E. AND VAN DER NOORDAA J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28 : 495-503.
- 7- CLEMENTI M., MENZO S., BAGNARELLI P. et al. 1993. Quantitative PCR and RT-PCR in virology. *PCR Methods Applied* ; 2 : 191-6.
- 8- CLIVER D.O. 1985. Vehicular transmission of hepatitis A. *Public. Health Rev.*, 13, 235-292.
- 9- COULEPIS A.G., LOCARNINI S.A., LEHMANN N.I., GUST I.D. 1980. Detection of hepatitis A virus in feces of patients with naturally acquired infections. *J. Infect. Dis.* 1980 Feb. 141(2) : 151-6.
- 10- DE FILIPPIS P., DIVIZIA M., MELE A., ADAMO B. and PANA A. 1987. Detection of hepatitis A virus in the stools of healthy people from endemic areas. *European Journal of Epidemiology*. Vol. 3, N° 2, June 1987.
- 11- HADLER SC. Global Impact of Hepatitis A virus infection : changing patterns. In *Hollinger FB* ; Lemon SM, Margolis HS eds viral hepatic.
- 12- JOUSSEMET M., NICAND E., DEPAQUIT J., TEYSSOU R., JANUS G., BUISSON Y. 1997. Seroprevalence of HAV antibodies in French recruits falls dramatically. *17th RICA*, 1997 Paris France 4-5 décembre.
- 13- KITAHASHI T., TANAKA T., HASEGAWA S. 1998. An outbreak caused by hepatitis A virus in an institution for the mentally handicapped detection of hepatitis A virus RNA using CTAB method. *Kansenshogaku Zasshi*. 1998. aug ; 72 [8] : 794-800.
- 14- MAST E.E. and ALTER M.J. 1993. Epidemiology of viral hepatitis : an overview. *Semin. Virol.* 4 : 273-283.
- 15- PAPAVENTSIS D., N. SIAFAKAS, P.MARKOULATOS, G.T. PAPAGEORGIOU, C. KOURTIS, E. CHATRICHISTON, C. ECONOMOU AND S. LEVIDIOTOU. 2005 Membrane adsorption with direct cell culture combined with reverse transcription PCR as a fast method for identifying enteroviruses from sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 : 72-79.
- 16- ROSS B.C. et ANDERSON D.A. 1991. Characterization of hepatitis A virus capsid proteins with antisera raised to recombinant antigens. *J. Virol. Methods*. 32, 213-220.
- 17- SHAPIRO C.N. and MARGOLIS 1993. Worldwide epidemiology of hepatitis A virus infection. *J. Hepatol.* 18 (Suppl.2) : s11-s14.
- 18- STENE-JOHANSEN K., JENUM P.A., HOEL T., BLYSTAD H., SUNDE H. and SKAUG K. 2002. An outbreak of hepatitis A among Homosexuals linked to a family outbreak. *Epidemiology and Infection* 2002. 129 : 113-117. Cambridge University Press.
- 19- YOTSUYANAGI H., KOIKE K., YASUDA K., MORIYA K., SHINTANI Y., FUJIE H., KUROKAWA K., LINO S. 1996. Prolonged faecal excretion of hepatitis A virus in adult patients with hepatitis A as determined by polymerase chain reaction. *Hepatology* 24 [1] : 10-3.