

## DETECTION DES PARASITES ENTERIQUES (*GIARDIA DUODENALIS*, *TOXOPLASMA GONDII*) DANS LES MOLLUSQUES BIVALVES DE LITTORAL TUNISIEN

**Khemissa GHOZZI<sup>1</sup>, Annunziata GIANGASPERO<sup>2</sup>, Hamouda BABBA<sup>3</sup>**

1. Laboratoire de Biodiversité et de Biotechnologie Marine, Institut National des Sciences et Technologies de la Mer, Monastir, Tunisia

2. Department of Science of Agriculture, Food and Environment, University of Foggia, 71121 Foggia, Italy

3. Laboratoire de Parasitologie-Mycologie Médicale et Moléculaire (code LR12ES08), Faculté de Pharmacie de Monastir, Université de Monastir, Monastir, Tunisia

**Email :** Khmyssa@yahoo.fr

### RESUME

Dans le but d'évaluer le niveau de contamination de milieu marin des cotes tunisiennes par les parasites entériques (*Giardia duodenalis* et *Toxoplasma gondii*) nous avons utilisé quatre espèces de mollusques bivalves (*Ruditapes decussatus*, *Mytilus galloprovincialis*, *Pinctada radiata*, *Perna perna*) comme espèces bio indicateurs. Ainsi, 1255 individus de bivalves sauvages ont été collectés à différents points des cotes tunisiennes et testés par la méthode de PCR quantitative afin de détecter et quantifier ces parasites entériques ciblés. *Toxoplasma gondii* et *G. duodenalis* ont été détectés dans 5,7% (99% CI=1.6–12.2%) de pools de *Ruditapes decussatus*. Parmi ces pools infectés, 6,6% ont été positives pour la détection de *T. gondii* Type I alors que 1,6% ont été infectées par le protozoaire intestinal *G. duodenalis* assemblage A. Parmi les spécimens de *Ruditapes decussatus* infectés, nous avons noté que cette espèce de mollusque héberge jusqu'à 77500 oocystes/échantillon de *T. gondii* et 395 kystes/ échantillon de *G. duodenalis*. Ces résultats confirment la présence des parasites entériques dans les côtes tunisiennes, ce qui pourra constituer un risque direct ou indirect sur la santé humaine.

**Mots Clés :** Bivalve mollusques, *Giardia duodenalis*, *Toxoplasma gondii*, qPCR

### ABSTRACT

In Tunisia, to date, no studies have been carried out to establish the sea contamination by emerging protozoan parasites in shellfish. In order to estimate sea water contamination by emerging protozoan parasites we used qPCR to molecularly characterize and evaluate the parasitic burden of *Giardia duodenalis* and *Toxoplasma gondii* in four species of bivalve mollusks (*Ruditapes decussatus*, *Mytilus galloprovincialis*, *Pinctada radiata*, *Perna perna*). So, 1255 individuals of wild bivalves were collected along Tunisian coasts and tested to detect and quantify these parasites. *G. duodenalis* and *Toxoplasma gondii* were detected in 5,7% (99% CI=1.6–12.2%) pools of *Ruditapes decussatus*. Among these infected pools, 6,6 % were positive for the detection of *T. gondii* Type I while 1,6 % were infected by the protozoon *G. duodenalis* assemblage A. Among the specimens, *R. decussatus* harbored up to 77500 oocysts/sample of *T. gondii* and up to 395 cysts/sample of *G. duodenalis*. These results confirm the presence of the zoonotic protozoan parasites in the Tunisian coasts that can constitute a direct or indirect risk for human health.

### INTRODUCTION

De nos jours, les autorités responsables de protéger l'environnement naturel et la santé humaine sont de plus en plus intéressées par la qualité d'eau de mer. En effet, les écosystèmes marins sont menacés par les activités humaines engendrant des rejets agricoles, urbains et industriels qui peuvent conduire à de hauts niveaux de pollution. Les organismes marins comme les mollusques bivalves sont des filtreurs qui peuvent concentrer des pathogènes tels que les bactéries, les virus et les parasites. Les protozoaires entériques, *Giardia duodenalis* et *Toxoplasma gondii*, ont été détectés dans le coquillage cultivé ou sauvage dans des lagunes et les milieux marins (ROBERTSON, 2007). *Giardia* est le protozoaire pathogène entérique le plus fréquent chez l'homme ainsi que chez les animaux sauvages et domestiques. Il est estimé pour

causer  $2.8 \times 10^8$  cas de maladies intestinales globalement par an (SQUIRE AND RYAN, 2017). Le protozoaire, *Toxoplasma gondii*, est de plus en plus étudié du fait des nombreux cas de contamination hydrique liée aux oocystes de *T. gondii* (JONES ET DUBEY, 2010). Pour mettre en évidence les protozoaires dans le milieu marin, des invertébrés aquatiques, et notamment des organismes filtreurs ont été utilisés depuis quelques années dans la littérature (WILLIS ET AL. 2013). Les bivalves sont des organismes vecteurs peuvent également représenter une aide significative pour comprendre la dissémination des pathogènes dans l'environnement aquatique. L'état de pollution parasitaire des cotes tunisiennes n'ont encore été évaluée malgré les efforts fournis pour gérer les risques encourus. Ainsi, le but de cette étude est de fournir une première évaluation de la pollution parasitaire d'eaux côtières

tunisiennes via la détection et la caractérisation moléculaire de parasites protozoaires intestinaux tels que *Giardia. duodenalis* et *Toxoplasma. gondii* en utilisant des bivalves collectés le long du littoral tunisien comme espèces bioindicateurs

## MATERIEL ET METHODES

### Zone d'étude

L'étude a été réalisée du nord au sud sur quatre zones côtières: la Lagune de Bizerte au nord, la Baie Monastir, et Chebba au centre et enfin le Golfe de Gabes au sud.

- Site Menzel Jemil : au nord-est de la lagune de Bizerte situé dans une zone relativement confinée recevant des rejets urbains et industriels.

- Site Chebba (35°13'N/11°09' E) est situé dans la zone centrale sud de la Tunisie, où plus de 200 ha sont utilisés pour l'élevage intensif de poisson bleu. Des espèces de bivalves se trouvent dans cette zone telles que *R. decussatus*, *P. nobilis* et *P. radiata*.

- Baie de Monastir : La baie de Monastir (35°47'N et 35°37'N /10°45'E et 11°50'E) appartient à la partie centrale de la côte Est du littoral tunisien.

\* Le site de Khniss est hautement influencé par les rejets industriels de la zone industrielle de Monastir et les sources évidentes de décharges urbaines.

\* Les fermes aquacoles sont implantées au large de la baie de Monastir, ainsi des espèces de moules et des huitres sont trouvées attachées dans les cages submersibles d'élevage des poissons.

- Le Golfe de Gabès (33°50 'N/10°44 'E) est situé sur les côtes Sud-est de la Tunisie, limitée par les Îles Kerkennah au nord-est et par l'Île Djerba au sud-est. Cette zone d'étude abrite un nombre important d'espèces de coquillages dont la plus exploitée est la palourde *Ruditapes decussatus*. Quatre sites sont étudiés dans cette zone : El Hicha, Akarit, Zarrat et Chatt Elawamer.

### Echantillonnage et procédures

- **Prélèvement, dissection et extraction d'ADN** ; Un nombre total de 1255 de bivalves appartenant à quatre espèces a été collecté (2013- 2016) des zones côtières: *Ruditapes decussatus* (n = 1020), *Pinctata radiata* (n = 135), *Mytillus galloprovincialis* (n=54) et *Perna perna* (n=46). Au laboratoire, les bivalves sont rassemblés en des pools de 9 à 18 individus selon l'espèce et la taille de l'individu. Les bivalves collectés sont ensuite disséqués afin d'extraire les branchies, et les glandes digestives. Le broyage a été réalisé à l'aide d'un ultra-Turrax IKA (T25 basic). Pour chaque pool, les tissus broyés sont traités dans un tampon phosphate (PBS) 0.04 M (pH 7.2-7.4) puis filtrés sur une double couche de gaze et centrifugés pendant 10 minute à 1000g. Le culot est ensuite lavé deux fois avec le tampon TE (1000 g, 4

°C, 10 minutes et ensuite 13,000 g, 4 °C, 15 minutes). 500 µ L de culot a été soumis à trois cycles congélation/ décongélation (-80 °C / + 80 °C pendant 5 minutes). L'ADN a été extrait en utilisant le kit QIAamp® DNA (QIAGEN GmbH, Allemagne) selon le protocole de la fabrication. L'ADN génomique a été stocké à -20 °C jusqu'à analyse moléculaire

- **qPCR** : La PCR quantitative en temps réel a été exécuté comme décrit in MARANGI ET AL. (2015). Brièvement, les PCR ont été effectués dans un volume final de 20 µ L, cinq µl de l'ADN extrait des échantillons sont ajoutés à 15µl de mix contenant 5× SsoFast EvaGreen ® (cat.no. 172-5201; Bio-Rad, Italie) et 0.5 µM de chaque amorces sens et anti sens, gène B1 pour *T. gondii* (TOXB41-F: 5'-CGAAGCTGAGATGCTCAAAGTC-3' et TOXB169-R: 5'-AATCCACGTCTGGGAAGAACTC-3') (BURG ET AL., 1989) et gène beta giardin pour *G. duodenalis* (GGL-F: 5'-AGTGCGTCAACGAGCAGCT-3' et GGR-R: 5'-AGTGCTTTGTGACCATCGA-3') (HOLBERTON AND MARSHALL, 1995). Des témoins négatifs sans ADN ont été ajoutés à chaque plaque de qPCR. Le programme d'amplification pour les deux parasites (*Giardia duodenalis*, *Toxoplasma gondii*) est composé d'une étape de dénaturation initiale (98° C pendant 2 minutes); suivie par 40 cycles : « dénaturation à 98° C pendant 5 secondes et hybridation pendant une minute à une température 61° C pour *G. duodenalis* ; 62° C pour *T. gondii* ; 59° C.

- **Analyse quantitative** : la quantité d'ADN (nombre de copies/µL) a été calculé en relatant la valeur moyenne de cycle seuil (Ct) de chaque échantillon positif à une courbe standard obtenue d'un contrôle positif pour *G. duodenalis* et *T. gondii*. Le nombre des oocystes et des kystes a été calculé pour *T. gondii* selon LASS ET AL. (2012) et pour *G. duodenalis* selon ERLANDSEN ET RASCH (1994).

- **Séquençage** : Les échantillons positifs trouvés pour *T. gondii* et *G. duodenalis* ont été purifiés en utilisant EXO I et des enzymes FASTAP (ThermoFisher Scientifique, Pays-Bas) selon le protocole du fabricant. Les produits purifiés de PCR ont été séquencés dans les deux sens en utilisant le kit de séquençage Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) selon les instructions du fabricant et par l'utilisation des mêmes amorces que les réactions de PCR respectives. Un analyseur Génétique ABI PRISM 3130(AppliedBiosystem, Foster City, California, USA) a été utilisé pour déterminer les séquences. Chaque séquence a été comparée aux séquences nucléotidiques disponibles dans des bases de données GenBank publiquement accessibles en utilisant le logiciel BLASTn (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) et par la suite

alignées par le programme ClustalW (BioEdit le logiciel v.7.2.5).

## RÉSULTATS

L'analyse par PCR quantitative des bivalves collectés a montré que parmi les 87 pools de mollusques bivalve marins testés, cinq de 87 (5.7 %, 99 % CI=1.6-12.2 %) ont été contaminés avec au moins une espèce protozoaire intestinale. Tous les

échantillons positifs sont collectés de site de khniss sauf un seul échantillon collecté de Jaboussa site (Golf de gabes). Seulement deux pools (2,29%) ont été trouvés contaminés par le protozoaire intestinal *Giardia duodenalis*. Il s'agit de pools de palourde de l'espèce *R. decussatus* collecté de site de khniss. Un seul pool a été trouvé contaminé par les deux parasites au même temps ; *G. duodenalis* et *T. gondii* (voir Tableau.I).

**Tableau I:** Distribution du nombre, fréquence (%), intervalle de confiance de 99 % (99 % CI) et nombre total des pools de bivalve marins collectés le long de côtes tunisiennes, examinées et trouvé contaminé par *T. gondii* Type I, *G. duodenalis* assemblage A.

| Zones Géographiques | Sites            | Espèces examinées (no. de spécimens)    | No. pools examinés | No. pools positifs (% , 99% CI) |   |                                   |
|---------------------|------------------|---|--------------------|---------------------------------|---|-----------------------------------|
|                     |                  |   |                    | <i>T. gondii</i> Type I         | <i>T. gondii</i> Type I/G. <i>duodenalis</i> assemblage A | <i>G. duodenalis</i> assemblage A |
| Nord                |                  |   |                    |                                 |   |                                   |
|                     | Bizerte          | <i>Ruditapes decussatus</i> (n=138)     | 9                  | 0                               | 0 (0%, 0-0%)  | 0                                 |
| Centre-nord         | Baie de Monastir | <i>Mytilus galloprovincialis</i> (n=54) | 6                  | 0                               | 0 (0%, 0-0%)  | 0                                 |
|                     |                  | <i>Perna perna</i> (n=46)               | 5                  | 0                               | 0 (0%, 0-0%)  | 0                                 |
|                     |                  | <i>Pinctada radiata</i> (n=135)         | 15                 | 0                               | 0 (0%, 0-0%)  | 0                                 |
|                     |                  | <i>Ruditapes decussatus</i> (n=504)     | 28                 | 3 (10.7%, 0-25.7%)              | 1 (3.6%, 0-12.6%)   | 1 (3.6%, 0-12.6%)                 |
| Centre-sud          | Chebba           | <i>Ruditapes decussatus</i> (n=108)     | 6                  | 0                               | 0 (0%, 0-0%)  | 0                                 |
| Sud                 | Golf of Gabès    | <i>Ruditapes decussatus</i> (n=270)     | 18                 | 1 (5.6%, 0-19.5%)               | 0 (0%, 0-0%)  | 0                                 |

La quantification de la charge parasitaire de *Giardia duodenalis* au niveau de ces deux pools positifs a montré qu'elle était de 62 et 395 kystes par échantillon pour les pools de palourde Pf2 et PN2 respectivement.

La charge parasitaire de protozoaire *T. gondii* au niveau de pools positifs varie entre 1250 et 77,500 oocystes/pool.

La caractérisation moléculaire par séquençage du parasite *T. gondii* détecté au niveau de ces cinq pools a montré qu'il s'agit du seul génotype *T. gondii* type I. Les séquences obtenues ont été déposées dans la base de données GenBank sous les numéros d'accèsion

KY510286-KY510291. Les deux pools contaminés par *G. duodenalis* ont été caractérisés en tant que *G. duodenalis* Assemblage A. les deux séquences de ce génotype ont été déposées dans la base de données GenBank sous les numéros d'accèsion KY510283 et KY510284.

## DISCUSSION

Ceci est la première étude environnementale examinant la contamination fécale par des parasites entériques des côtes tunisiennes et le premier rapport qui confirme la présence de *T. gondii* et *G.*

*duodenalis* dans les bivalves de l'Afrique du Nord. Deux sites parmi neuf ont été trouvés contaminés par ces protozoaires : Baie de Monastir et Jaboussa dans le golfe de Gabes. *R. decussatus* était la seule espèce trouvée contaminée par *T. gondii* et *G. duodenalis* seul, ou en association (*T. gondii*/*G. duodenalis*). Dans des pays méditerranéens, *T. gondii* a été rapporté dans l'huître cultivée (*Crassostrea des giga*) et le mollusque (*R. decussatus*) (PUTIGNANI ET AL., 2011) et aussi dans le moule (*M. galloprovincialis*) en Turquie (AKSOY ET AL., 2014). *G. duodenalis* a été détecté dans des mollusques (*Chamelea gallina*) (GIANGASPERO ET AL., 2004) et le moule *M. galloprovincialis* cultivé le long de la côte Adriatique italienne (GIANGASPERO ET AL., 2014) et en Espagne (G O MEZ-COUSO ET AL., 2005). *T. gondii* type I est le type le plus pathogène. Il a été détecté au cours de cette étude avec un nombre des oocystes très élevé (jusqu'à 77.500 oocystes/ pool). En effet, En Tunisie, le niveau de séroprévalence humaine pour la toxoplasmose est haut et les Types I, et I/II et I/III ont été enregistrés dans des humains (BOUGHATTAS ET AL., 2010). Le niveau très élevé de contamination environnementale par les oocystes de *Toxoplasma* en Tunisie peut être expliqué par le nombre élevé de chats dans le pays. *G. duodenalis* détecté dans deux échantillons de bivalve seulement est un protozoaire très répandu dans des patients symptomatiques et des enfants (BOURATBINE ET AL., 2000). Tandis que les assemblages de *G. duodenalis* circulant dans des humains reste inconnu, *G. duodenalis* assemblages AI, AII, B et E ont été détectés dans les stations de traitement (BEN AYED ET AL., 2012).

## CONCLUSION

Les bivalves collectés le long des côtes de la Tunisie peuvent héberger l'ADN génomique de *T. gondii* Type I et *G. duodenalis* assemblage A dans certains sites. Une attention doit être alors attribuée pour contrôler la contamination de milieu marin par ces pathogènes et éviter le risque sanitaire qui peuvent provoquer.

## BIBLIOGRAPHIE

- AKSOY, U., MARANGI, M., PAPINI, R., OZKOC, S., BAYRAM DELIBAS, S., GIANGASPERO, A., 2014. Detection of *Toxoplasma gondii* and *Cyclospora cayetanensis* in *Mytilus galloprovincialis* from Izmir Province coast (Turkey) by real time PCR/high resolution melting analysis (HRM). *Food Microbiol.* 44, 128–135.
- BEN AYED, L., YANG, W., WIDMER, G., CAMA, V., ORTEGA, Y., 2012. Survey and genetic characterization of wastewater in Tunisia for *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, *Enterocytozoon bienersi*, *Cyclospora cayetanensis* and *Eimeria* spp. *J. Water Health* 10, 431–444.
- BURG, J.L., GROVER, C.M., POULETTY, P., BOOTHROYD, J.C., 1989. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27, 1787–1792.
- BOUGHATTAS, S., BEN-ABDALLAH, R., SIALA, E., SOUISSI, O., AOUN, K., BOURATBINE, A., 2010. Direct genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with congenital Toxoplasmosis in Tunisia (North Africa). *Am.J.Trop. Med. Hyg.* 82, 1041–1046.
- BOURATBINE, A., AOUN, K., SIALA, E., CHAHED, M.K., BEN HASSINE, L., MEHERZI, A., 2000. Pour une meilleure estimation de la prévalence du parasitisme intestinal dans la région de Tunis. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 93.
- ERLANDSEN, S.L., RASCH, E.M., 1994. The DNA content of trophozoites and cysts of *Giardia lamblia* by microdensitometric quantitation of Feulgen staining and examination by laser scanning confocal microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 42, 1413–1416.
- GIANGASPERO, A., PAPINI, R., MARANGI, M., KOEHLER, A.V., GASSER, R.B., 2014. *Cryptosporidium parvum* genotype IIa and *Giardia duodenalis* assemblage A in *Mytilus galloprovincialis* on sale at local food markets. *Int. J. Food Microbiol.* 171, 62–67.
- GOMEZ-COUSO, H., MENDEZ-HERMIDA, F., CASTRO-HERMIDA, J.A., ARES-MAZA, S., E., 2006. *Cryptosporidium* contamination in harvesting areas of bivalve molluscs. *J. Food Prot.* 69, 185–190.
- HOLBERTON, D.V., MARSHALL, J., 1995. Analysis of consensus sequence patterns in *Giardia* cytoskeleton gene promoters. *Nucleic Acids Res.* 23, 2945–2953.
- JONES, J.L. AND DUBEY, J.P., 2010. Waterborne toxoplasmosis--recent developments. *Experimental parasitology*, 124 (1), 10–25.
- LASS, A., PIETKIEWICZ, H., SZOSTAKOWSKA, B., MYJAK, P., 2012. The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental fruits and vegetables samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31, 1101–1108.
- MARANGI, M., GIANGASPERO, A., LACASELLA, V., LONIGRO, A., GASSER, R.B., 2015. Multiplex PCR for the detection and quantification of zoonotic taxa of *Giardia*, *Cryptosporidium* and *Toxoplasma* in wastewater and mussels. *Mol. Cell. Probes.* 29, 122–125.

- PUTIGNANI, L., MANCINELLI, L., DEL CHIERICO, F., MENICHELLA, D., ADLERSTEIN, D., ANGELICI, M., MARANGI, M., BERRILLI, F., CAFFARA, M.D., DI REGALBONO, A.F., GIANGASPERO, A., 2011. Investigation of *Toxoplasma gondii* presence in farmed shellfish by nested-PCR and realtime PCR fluorescent amplicon generation assay (FLAG). *Exp. Parasitol.* 127, 409–417.
- OBERTSON, L.J., 2007. The potential for marine bivalve shellfish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in humans: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 120, 201–216.
- SQUIRE, S. A., AND RYAN, U. 2017. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Africa: current and future challenges. *Parasit. Vectors* 10:195. doi: 10.1186/s13071-017-2111
- WILLIS, J.E., MCCLURE, J.T., MCCLURE, C., SPEARS, J., DAVIDSON, J., GREENWOOD, S.J., 2014. Bioaccumulation and elimination of *Cryptosporidium parvum* oocysts in experimentally exposed Eastern oysters (*Crassostrea virginica*) held in static tank aquaria. *Int. J. Food Microbiol.* 173, 72