

O. Bel Haj Amor¹; N. Khemakhem¹; H. Trabelsi¹; S. Neji¹; H. Sellami¹; F. Makni¹; A. Ayadi¹
1- Laboratoire de Parasitologie-Mycologie - CHU Habib Bourguiba - Sfax

Introduction:

- * Champignons contaminants : diversité morphologique et phylogénétique.
- * Leur identification était basée sur les méthodes phénotypiques qui manquent de sensibilité.
- * Les méthodes moléculaires: développées pour surmonter ces problèmes.

Objectif:

Étudier l'apport de la PCR-séquençage dans l'identification des champignons contaminants dans des prélèvements cliniques et environnementaux.

Matériel & méthodes:



Souches isolées de :

50 prélèvements cliniques : 43 cultures + 7 biopsies
(sinusaux : 38%, auriculaires : 34%, cutanés : 6%, palais : 2%, cérébraux : 4%, cornéens : 6%, cavum : 2%, hémoculture : 2%, prélèvements d'ongles : 6%)

32 prélèvements environnementaux :
* 29 souches d'*Aspergillus* : environnement de patients asthmatiques
* 3 souches de *Rhizopus oryzae* : environnement hospitalier (air, sol, surfaces...)

- ✓ **Extraction de l'ADN:** Protéinase K + Kit DNeasy® (QIAGEN)
- ✓ **Analyse par PCR – Séquençage:**
 - **PCR:** amorces ITS1-ITS4
 - **Séquençage:** séquenceur ABI 310 (Applied Biosystems)
- ✓ **Analyse des résultats:** logiciels: BioEdit, Blastn, ClustalX V2.1
- ✓ **Analyse phylogénétique:** MEGA 6.1, méthode UPGMA

Résultats:

Identification :

Phénotypique : 80% des souches	Moléculaire par PCR-séquençage 100% des souches
-----------------------------------	--

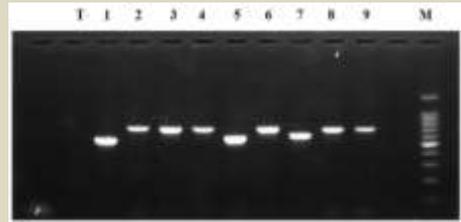
Pourcentage de similarité ≥ 98%)

- Concordance entre identification phénotypique et moléculaire : **33 cas (40,2%)**
- Identification exacte de l'espèce de contaminant : **36 cas (43,9%)**
- Rectification des résultats de l'identification mycologique : **13 souches (15,9%)**

➔ **prélèvements cliniques:** identification de champignons jamais identifiés auparavant dans notre pays:

Sakseneae vasiformis

➔ **prélèvements environnementaux:** identification d'espèces nouvelles et rares d'*Aspergillus* : *A. chevaleri*

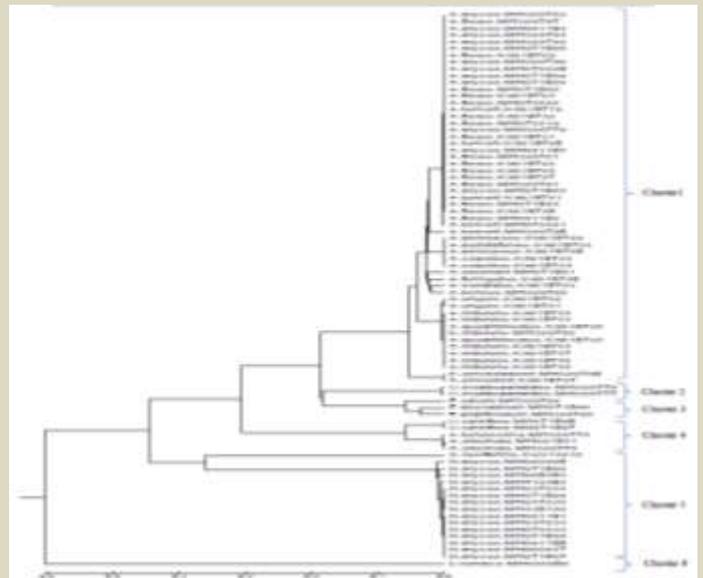


Exemples d'amplification par PCR de la région ITS1- 5,8s-ITS2 (9 souches)

(M: marqueur de taille 100 pb; 1: *Alternaria alternata* (TN594D/17); 2: *Alternaria tenuissima* (TN221D/15); 3: *A. oryzae* (TN602AUR/17); 4: *Curvularia spicifera* (TN290D/12); 5: *A. flavus* (TN537AUR/17); 6: *Rhizopus oryzae* (TN344D/11); 7: *R. oryzae* (TN54D/11); 8: *Sakseneae vasiformis* (TN254AUR/15); 9: *Fusarium oxysporum* (TN593Hc/13)

Analyse phylogénétique de nos souches:

- * Identification de groupes génétiques distincts parmi nos isolats
- * Grande diversité intra-espèce: *Aspergillus* et *Rhizopus*++



Arbre phylogénétique (méthode UPGMA), représentant les souches de contaminants collectées à partir des prélèvements cliniques et environnementaux

Conclusion:

- Identification précise des champignons importante: ➔ déterminer l'étiologie de la maladie et détecter de nouvelles espèces pathogènes.
- Séquençage des régions ITS : "gold standard" (notre étude:100% des souches identifiées)
- ➔ Notre étude : identification de champignons jamais identifiés auparavant dans notre laboratoire ou même dans notre pays.