

IDENTIFICATION MULTIPLE ET SPECIFIQUE DES PIROPLASMOSES BOVINES (THEILERIOSES ET BABESIOSES) CHEZ L'HOTE ET SES VECTEURS PAR UNE APPROCHE MOLECULAIRE INTEGREE*

O. Sparagano¹, J.M. Gubbels, A. de Vos et F. Jongejan

RESUME : Notre groupe a mis en place un diagnostic permettant d'identifier, en un seul test, plusieurs espèces de Piroplasmidae (*Theileria* et *Babesia*). Ce test est basé sur une technique PCR couplée avec un transfert bidimensionnel sur membrane (« reverse line blotting »). Cette méthode, au stade actuel, est spécifique pour six espèces de *Theileria* (*T. annulata*, *T. parva*, *T. mutans*, *T. velifera*, *T. taurotragi* et *T. buffeli/orientalis*) et pour trois espèces de *Babesia* (*B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens*). Aucune réaction croisée, entre les espèces de référence ou avec d'autres espèces de Piroplasmidae, n'a été enregistrée. Il n'y a pas non plus de résultat positif avec d'autres agents pathogènes rencontrés chez le bétail ou chez les tiques, comme les espèces suivantes : *Anaplasma marginale*, *A. centrale*, *A. ovis*, *Cowdria ruminantium*, *Trypanosoma brucei*, *T. congolense* et *T. vivax*.

Cette méthode a été utilisée en Italie (dans les Pouilles et en Sicile) aussi bien sur des prélèvements sanguins des bovins que sur les tiques. Nous avons ainsi découvert des co-infections entre *Theileria* et *Babesia* et avons pu identifier les vecteurs de certains de ces agents pathogènes en Sicile.

SUMMARY : A molecular diagnosis assay was developed to specifically identify six *Theileria* species (*T. annulata*, *T. parva*, *T. mutans*, *T. velifera*, *T. taurotragi* and *T. orientalis/buffeli*) and three *Babesia* species (*B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens*). No cross-reactivity was observed between these species or with other haemoparasites, such as *Anaplasma marginale*, *A. centrale*, *A. ovis*, *Cowdria ruminantium*, *Trypanosoma brucei*, *T. congolense* and *T. vivax*. The method was successfully applied in the Apuglia and Sicily regions (Italy) on blood samples and ticks. It was shown that *Babesia* and *Theileria* species co-exist in the same host.



I - INTRODUCTION

Les tiques peuvent transporter de nombreux organismes pathogènes tels des protozoaires, des bactéries ou des virus. Ces acariens sont responsables d'importantes pertes financières dans le secteur de la production animale et jouent aussi un rôle dans certaines infections humaines.

Les méthodes traditionnelles d'observation, par frottis sanguins pour les bovins ou par coloration des glandes salivaires pour les tiques, ne peuvent pas identifier de façon spécifique les espèces responsables d'infections.

* Texte de la communication présentée le 7 mai 1999

¹ Division of Parasitology and Tropical Veterinary Medicine, Utrecht University, PO Box 80.165, 3508 TD Utrecht, The Netherlands. Correspondance : Dr O. Sparagano (E-mail : O.sparagano@vet.uu.nl)

Des techniques fondées sur une approche moléculaire, développées ces dernières années, permettent d'identifier l'espèce des agents pathogènes, de les suivre au cours du cycle de reproduction des tiques et, de ce fait, de découvrir les tiques vectrices des maladies associées. Grâce à ces techniques moléculaires, il est aussi possible de révéler des infections naissantes chez des sujets asymptomatiques ou chez des animaux porteurs sains risquant d'infecter d'autres animaux.

De plus, certaines de ces tiques peuvent transporter plusieurs organismes infectieux appartenant à des espèces, voire à des genres différents.

Des études ont montré que les hôtes (bovins, caprins, ovins ou équins) et les vecteurs sont infectés par plusieurs pathogènes et des techniques se mettent en place pour détecter ces infections multiples avec un seul test [4, 5].

II - MATERIEL ET METHODE

1. PRELEVEMENTS

Les souches de référence utilisées sont des échantillons de sang infectés en laboratoire et gardés en azote liquide dans le département de Parasitologie de l'Université d'Utrecht.

En Sicile, 56 échantillons de sang furent collectés en avril 1998 et 55 échantillons en novembre 1998. Du sang infecté avec d'autres agents pathogènes servirent soit de contrôles négatifs pour la PCR et l'hybridation (*Anaplasma marginale*, *A. centrale*, *A. ovis*, *Cowdria ruminantium*, *Trypanosoma brucei*, *T. congolense* et *T. vivax*), soit de contrôles positifs pour la PCR et négatifs pour l'hybridation (*Babesia caballi*, *B. major*, *B. microti*, *B. motasi*, *B. ovis* et *Theileria equi*).

2. EXTRACTION DE L'ADN

Pour tous les échantillons sanguins, l'ADN a été extrait grâce au QIAamp Blood Kit de la Société QIAGEN.

3. AMPLIFICATION DE L'ADN

Cinq microlitres d'ADN furent amplifiés après avoir été mélangés avec 45 µl de tampon d'amplification contenant : 35,45 µl d'eau distillée, 0,5 de dNTPs (20 mM chacun), 5 µl de tampon PCR (10X), 3 µl MgCl₂ (25mM), 50 pmol pour chacune des deux amorces, 0,

25 µl de *Taq* Polymerase (5 unités/ µl) [2]. Il est important de noter que l'amorce R est marquée avec de la Biotine. Le mélange fut recouvert d'huile minérale avant les cycles d'amplification comprenant un cycle à 94 °C pendant 10 minutes, puis 40 cycles comprenant 1 minute à 94 °C, 1 minute à 52 °C et 1,5 minute à 72 °C ; enfin, un cycle de 10 minutes à 72 °C et le maintien à 4 °C des réactions d'amplification terminèrent le programme.

4. HYBRIDATION SUR MEMBRANE (Reverse line blotting hybridisation)

Quarante microlitres de produits amplifiés sont mélangés avec 150 microlitres de tampon I (2 X SSPE + 0,1% SDS), puis incubés 10 minutes à 100 °C et refroidis rapidement dans la glace. Au préalable, les sondes spécifiques pour chaque espèce de *Theileria* et de *Babesia*, ainsi que la sonde reconnaissant tous les Piroplasmidae, sont hybridées sur une membrane de Biodyne C. Ces sondes sont déposées en lignes parallèles. Les séquences des amorces et des sondes ont été déjà publiées [5]. Les échantillons d'ADN amplifié sont déposés en ligne sur la membrane, perpendiculairement aux amorces. Après une incubation et des lavages, un conjugué marqué à la streptavidine est déposé et une réaction chimioluminescente est effectuée comme cela a été déjà publiée [5].

III - RESULTATS

1. PCR

Les résultats de PCR sont présentés dans la Figure 1. Les sept espèces de *Theileria* (dont les six espèces de référence pour l'hybridation) et les 8 espèces de *Babesia* (dont les trois espèces de référence pour l'hybridation) ont donné des produits amplifiés alors que toutes les autres espèces et le contrôle PCR négatif (pas d'ADN dans le tampon d'amplification) ne

donnent aucune amplification. La taille des fragments obtenus est conforme à ce qui était attendu.

2. RLB

Les résultats d'hybridation sur membrane sont donnés dans la Figure 2.

FIGURE 1



M Ta Tm Tv Bbo Bd Bma Bmo Te - Trb Trv Am Cr M
 Tp Tt To Bbi Bc Bmi Bo Trc Ac Ao

ADN amplifiés

Abréviations

M :	Marqueur	Bbi :	<i>B. bigemina</i>	- :	négatif
Ta :	<i>T. annulata</i>	Bd :	<i>B. divergens</i>	Trb :	<i>T. brucei</i>
Tb :	<i>T. buffeli</i>	Bc :	<i>B. caballi</i>	Trc :	<i>T. cruzi</i>
Tm :	<i>T. mutans</i>	Bma :	<i>B. major</i>	Trv :	<i>T. vivax</i>
Tt :	<i>T. taurotragi</i>	Bmi :	<i>B. microti</i>	Ac :	<i>A. centrale</i>
Tv :	<i>T. velifera</i>	Bmo :	<i>B. motasi</i>	Am :	<i>A. marginale</i>
To :	<i>T. ovis</i>	Bo :	<i>B. ovis</i>	Ao :	<i>A. ovis</i>
Bbo :	<i>B. bovis</i>	Te :	<i>T. equi</i>	Cr :	<i>C. ruminantium</i>

Chaque souche de référence pour les Piroplasmidae (6 *Theileria* et 3 *Babesia*) est détectée par la sonde qui lui correspond et par la sonde reconnaissant tous les Piroplasmidae. Les espèces de *Babesia* et de *Theileria*, qui n'ont pas leur sonde sur la membrane, ne sont reconnues que par la sonde des Piroplasmidae. Quant aux autres espèces (*Anaplasma*, *Trypanosoma* et *Cowdria*), elles ne sont reconnues par aucune des sondes présentes sur la membrane.

Les résultats de l'hybridation moléculaire pour les échantillons de Sicile sont donnés dans le Tableau I. Ces résultats montrent que les infections multiples

représentent 60,7% en avril 1998 et 85,5% en novembre 1998. Les co-infections chez les bovins de Sicile sont donc majoritaires. Il faut cependant ajouter que la campagne d'automne montre clairement l'émergence des *Babesia* qui ne représentent que 1,8% des infections en avril alors qu'elles atteignent 29,1% en novembre. Les espèces trouvées en avril 1998 furent *Theileria annulata* (82,1%), *T. buffeli/orientalis* (80,4%) et *Babesia bovis* (1,8%) alors qu'en novembre 1998 nous avons trouvé : *Theileria annulata* (78,2%), *Theileria buffeli/orientalis* (94,5%), *Babesia bigemina* (16,4%) et *B. bovis* (12,7%).

TABLEAU I

Résultats de l'hybridation moléculaire sur les échantillons sanguins récoltés en Sicile en 1998

Prélèvements	1 seule <i>Theileria</i> ^a	2 espèces de <i>Theileria</i> ^b	2 <i>Theileria</i> + 1 <i>Babesia</i> ^d	1 <i>Theileria</i> ^c + 1 <i>Babesia</i> ^d	Négatifs	Total
Avril 1998	22	33	0	1	0	56
Novembre 1998	5	31	12	4	3	55

^a: *Theileria annulata* ou *Theileria buffeli/orientalis*

^b: *Theileria annulata* et *Theileria buffeli/orientalis*

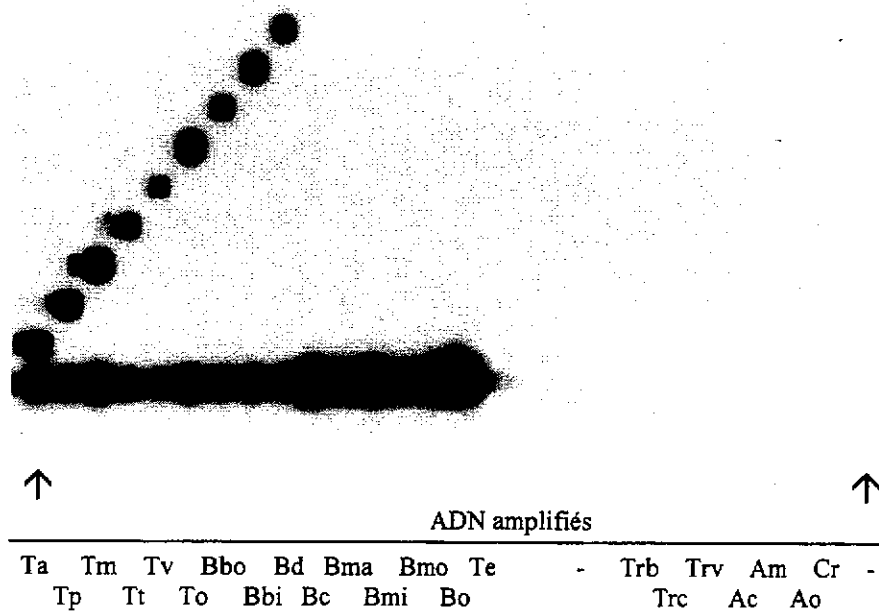
^c: *Theileria buffeli/orientalis*

^d: *Babesia bigemina* ou *Babesia bovis*

FIGURE 2

Spécificité des sondes

- Babesia divergens*
- Babesia bigemina*
- Babesia bovis*
- Theileria orientalis*
- Theileria velifera*
- Theileria taurotragi*
- Theileria mutans*
- Theileria parva*
- Theileria annulata*
- Theileria/Babesia*



IV – DISCUSSION

Les résultats de PCR montrent clairement la spécificité de notre méthode. Cependant, comme le montre la Figure 1, à ce stade, il n'est pas possible de différencier les différentes espèces de *Theileria* et de *Babesia*. Ceci se fait grâce à l'élaboration d'une hybridation spécifique au niveau des espèces comme cela est représenté dans la Figure 2.

La mise en évidence de *Theileria annulata* et *Theileria buffeli/orientalis* en Sicile n'est pas surprenante. Cependant, une étude similaire dans les Pouilles italiennes n'a pu mettre en évidence que la présence de *Theileria buffeli/orientalis* par sérologie [2] ou par hybridation moléculaire [3].

Aucune réaction croisée n'a été observée aussi bien pour les résultats de PCR que pour ceux avec l'hybridation moléculaire. Il est donc imaginable, et ceci est en préparation dans notre laboratoire, d'augmenter le nombre de sondes spécifiques sur la membrane pour reconnaître encore plus d'espèces. Cette approche peut évidemment se faire pour d'autres agents pathogènes transportés par les tiques comme *Ehrlichia* ou *Anaplasma*.

La limite de détection de notre test est de 10^{-6} % de parasitémie pour *Theileria annulata* et *B. bigemina*. En revanche, il n'existe pas encore de méthode moléculaire pour détecter les porteurs sains pour *B. bovis* [5] et *B. divergens*. De ce fait, il est possible que bon nombre d'études moléculaire ne détectent pas un certain nombre d'infections avec des parasitémies très faibles.

Les approches épidémiologiques ne peuvent plus être monospécifiques mais doivent prendre en compte la multitude d'agents pathogènes présents en même temps. Ceci aidera à comprendre le rôle opportuniste de certains agents pathogènes qui ne se développent chez le bétail que lorsque ceux-ci sont déjà infectés par d'autres agents qui affaiblissent leur système immunitaire.

Devant la nécessité d'avoir une approche globale, recommandée, bien souvent, par les agences donatrices (comme la Communauté Européenne), cette méthode moléculaire semble adaptée à l'identification de nombreux agents pathogènes sur le terrain.

V – BIBLIOGRAPHIE

1. CALDER J.A.M., REDDY G.R., CHIEVES L., COURTNEY C.H., LITTELL R., LIVENGOOD J.R., NORVAL R.A.I., SMITH C and DAME J.B. ~ Monitoring *Babesia bovis* infections in cattle by using PCR-based tests. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, 34, 2748-2755.
2. CECI L., KIRVAR E., CARELLI G., BROWN D., SASANELLI M. and SPARAGANO O. ~ Evidence of *Theileria buffeli* infection in cattle in southern Italy. *Vet Record*, 1997, 140, 581-583.
3. CECI L., CARELLI G., JONGEJAN F and SPARAGANO O. ~ Identification of *Theileria buffeli/orientalis* and *Babesia bigemina* in Apulian cattle using molecular techniques and study of changes in blood parameters. *Parassitologia*, 1999, (in press).
4. FIGUEROA J.V., CHIEVES L.P., JOHNSON G.S. and BUENING G.M. ~ Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet. Parasitol.*, 1993, 50, 69-81.
5. GUBBELS J.M., DE VOS A.P., VAN DER WEIDE M., VISERAS J., SCHOULS L.M., DE VRIES E. and JONGEJAN F. ~ Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species using reverse line blot hybridization. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, (in press).



REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par un contrat Marie Curie de la Communauté Européenne (ERBFMBICT 983200). Les auteurs remercient le Dr Loria de l'IZS de Palerme pour son aide dans l'obtention d'échantillons de sang.