

DETECTION PAR METHODES MOLECULAIRES DE *THEILERIA ANNULATA* CHEZ LE BETAIL : ETUDE COMPARATIVE INTERNATIONALE*

O. Sparagano¹, A. Bouattour², G. Caarelli³, V. Shkap⁴, F. Vitale⁵,
M. Habela⁶, S. Almeria⁷, J. Castella⁷, E. Corchero⁶,
G.R. Loria⁵, T. Molad⁴ et L. Ceci³

RESUME : Sept laboratoires se sont associés pour comparer différentes méthodes d'identification moléculaires (PCR ou RLB) pour la détection de l'hémoprotazoaire *Theileria annulata* dans le sang de bovins. 120 échantillons de sang furent analysés. Le consensus fut total pour les 24 cas cliniques. Parmi les 24 échantillons provenant d'une région où *T. annulata* n'a jamais été observée auparavant, certains laboratoires eurent des résultats positifs pour cinq d'entre eux. Quant aux autres 72 échantillons, le consensus fut obtenu dans 50,7 p. cent des cas. L'étude par RLB donna des taux de détections supérieurs à ceux des laboratoires analysant par PCR seule ainsi que des divergences moindres entre laboratoires pratiquant cette technique.

SUMMARY : Seven laboratories decided to compare their molecular techniques (either PCR or RLB) to identify *Theileria annulata* within 120 cattle blood samples. For clinical samples all the laboratories detected the pathogen. Among the 24 samples originating from an area where *T. annulata* has not been identified, five samples were observed positives from at least one laboratory. For the other 72 samples a unanimous results was observed for 50.7 p. cent samples. RLB gave higher positive rates than PCR and a lower discrepancy between laboratories performing it.



I - INTRODUCTION

L'hétoparasite *Theileria annulata* est responsable d'une theilériose chez le bétail (du Soudan à l'Extrême-Orient en passant par le bassin méditerranéen et le Moyen-Orient). Ce protozoaire est transmis par des tiques principalement du genre *Hyalomma*. Différentes méthodes moléculaires ont été développées, telles la PCR ou la RLB [1, 5] mais aucune comparaison, en terme de spécificité et/ou de sensibilité n'a été effectuée. Ces méthodes de détection moléculaires sont plus sensibles, plus

spécifiques et plus rapides que les méthodes d'identification traditionnelles (comme l'étude sur lame sanguine par exemple). Il n'empêche que le consensus et les gênes visés par ces nouvelles techniques modernes sont très variables. Sept laboratoires décidèrent de comparer leurs méthodes de détection moléculaire pour ce pathogène afin d'analyser les performance de chacune de ces méthodes.

* Communication orale, Journées de l'AEEMA, 18-19 mai 2000

¹ Department of Biological Sciences, Heriot-Watt University, Edinburgh EH14 4AS, Scotland, UK

² Institut Pasteur de Tunis, Tunis, Tunisie

³ Dipartimento di Sanità e Benessere Animale, Facoltà Veterinaria di Bari, Valenzano, Italie

⁴ Kimron Veterinary Institute, Beit Dagan, Israël

⁵ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri", Palermo, Italie

⁶ Facultad Veterinaria de Cáceres, Cáceres, Espagne

⁷ Facultad Veterinaria de Barcelona, Barcelona, Espagne

[§] Correspondance: Dr O. Sparagano, Department of Biological Sciences, Heriot-Watt University, Riccarton Park, Edinburgh EH14 4AS, Scotland, UK (E-mail: O.A.E.Sparagano@hw.ac.uk)

II - MATERIEL ET METHODES

1. PRÉLÈVEMENTS

Cinq laboratoires récoltèrent chacun 24 échantillons de sang de bovin dans des tubes avec anticoagulant (généralement de l'EDTA).

2. EXTRACTION DE L'ADN

L'ADN fut extrait selon un protocole commun envoyé par le laboratoire 4. Comme les moyens financiers des

laboratoires impliqués étaient très différents nous avons utilisé un moyen peu onéreux basé sur la lyse des cellules sanguines et la précipitation de l'ADN.

3. METHODES MOLECULAIRES UTILISEES

Ces ADN furent analysés selon des tests en aveugle par plusieurs laboratoires. La PCR fut pratiquée par quatre laboratoires et la RLB par trois autres (voir tableau I).

TABLEAU I

Liste des participants et des méthodes moléculaires utilisées

Laboratoire	Méthode	Fragment amplifié (bp)	Gène	Concentration de la sonde	Référence bibliographique
1	PCR	727	TAMS	N/A	[3]
2	RLB ^a	450	18S	100-200 picomoles	[1]
3	PCR	721	TAMS	N/A	[2]
4	RLB	450	18S	50-100 picomoles	[1]
5	PCR	721	TAMS	N/A	[2]
6	RLB	450	18S	50-100 picomoles	[1]

^a pour une étude de synthèse de la RLB voir [6].

III - RESULTATS

Cinq cent deux résultats furent obtenus pour les 120 échantillons (240 résultats par RLB et 262 par PCR) (tableau II).

Vingt quatre échantillons, tous positifs, furent détectés comme tels par tous les laboratoires impliqués. Vingt quatre échantillons négatifs furent considérés unanimement comme tels dans 79,2 p. cent des cas. Les deux laboratoires ayant analysé le plus

d'échantillons par PCR eurent 66,2 p. cent de résultats similaires. Pour les deux laboratoires ayant analysé le plus d'échantillons par RLB, ceux-ci eurent 76,4 p. cent de résultats identiques. La RLB a donné un taux de résultats positifs plus important par rapport à la PCR et avec un peu moins de résultats isolés par rapport aux autres laboratoires (3,3 p. cent au lieu de 6,9 p. cent).

TABLEAU II

Nombre de tests effectués et résultats contradictoires

Laboratoire	Tests effectués	Résultats contradictoires par rapport à l'ensemble des autres laboratoires
1	119	5,0 %
2	120	0,8 %
3	119	9,2 %
4	96	4,2 %
5	24	4,2 %
6	24	8,3 %

IV – DISCUSSION

La mise en place de ce réseau a rencontré des problèmes logistiques. trois autres laboratoires ne purent y participer à cause des problèmes suivants : (1) un laboratoire n'eut pas assez d'argent pour effectuer les tests, (2) un laboratoire n'eut pas le personnel pour faire les tests et (3) impossibilité de communiquer avec un troisième laboratoire. De plus, les échanges entre certains pays politiquement très éloignés ont considérablement ralenti les échanges d'échantillons et ils durent être envoyés au laboratoire 4 pour être ré-expédiés et éviter leur destruction par certains services des douanes.

Certains échantillons considérés comme négatifs pour *T. annulata* étaient issus de sang infecté avec une autre *Theileria*: *T. buffeli/orientalis* et chaque laboratoire devra évaluer la spécificité de son test. La nomenclature pour les espèces de *Theileria* n'est pas encore unanime [4] et d'autres études seront nécessaires pour clarifier la situation. Notre objectif est

d'obtenir une méthode consensuelle qui donnera les meilleurs résultats en terme de sensibilité et de spécificité. La technique de RLB mise en place par les laboratoires 2, 4 et 6 est très spécifique [1, 5]. Elle est plus sensible que la technique de PCR seule [1], ce qui explique peut-être pourquoi les laboratoires ayant utilisé la RLB trouvèrent des résultats positifs plus importants, et souvent en désaccord avec les laboratoires pratiquant la PCR. La concentration de la sonde est aussi un paramètre très important, car en utilisant une concentration plus importante que pour les laboratoires 4 et 6, le laboratoire 2 obtint de meilleurs résultats. Des méthodes de détection pour d'autres pathogènes vont pouvoir être aussi évaluées prochainement, aussi bien chez les hôtes que chez les tiques vectrices. Notre groupe est aussi en train d'étudier les méthodes d'identification des tiques, en zone méditerranéenne, pour évaluer les classifications taxonomiques des différents laboratoires.

V – BIBLIOGRAPHIE

- 1 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, **37**, 1782-1789.
- 2 D'OLIVEIRA C., VAN DER WEIDE M., HABELA M.A., JACQUIET P and JONGEJAN, F. - Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, **33**, 2665-2669.
- 3 SHIELS B., D'OLIVEIRA C., MCKELLAR S., BEN-MILED L., KAWAZU S and HIDE G. - Selection of diversity at putative glycosylation sites in the immunodominant merozoite/piroplasm surface antigen of *Theileria* parasites. *J. Mol. Biochem. Parasitol.*, 1995, **72**, 149-162.
- 4 SPARAGANO O. - *Theileria* species: Biodiversity? *Trop. An. Hlth. Prod.*, 1998, **30**, 141-142.
- 5 SPARAGANO O.A.E., ALLSOPP M.T.E.P., MANK R.A., RIJPKEMA J.V., FIGUEROA and JONGEJAN F - Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari: Ixodidae): A review. *Exper. Appl. Acarol.*, 1999, **23**, 929-960.
- 6 SPARAGANO O., GUBBELS, J.M., DE VOS A and JONGEJAN F - Identification multiple et spécifique des piroplasmoses bovines (theilérioses et babésioses) chez l'hôte et ses vecteurs par une approche moléculaire intégrée. *Epidémiol. Santé Anim.*, 1999, **35**, 81-85.

