

## PCR temps réel : outil de diagnostic en pathologie bovine

### Real Time PCR : diagnostic tool for bovine diseases

B. CHEVALLIER, B. CIVELLI, B. BLANCHARD  
Adiagène, 38, rue de Paris, 22000 SAINT-BRIEUC

#### INTRODUCTION

La grande sensibilité et rapidité de la technologie PCR a déjà permis ces dernières années la réalisation de pools de prélèvements, la réduction des délais d'analyse et une meilleure qualification de certains animaux infectés. La nouvelle technologie PCR "temps réel" ou "Real Time" permet maintenant la quantification des cibles ADN recherchées. Elle apporte aussi des possibilités d'automatisation et de réduction des risques de contamination qui seront fortement appréciés par les laboratoires d'analyses.

Les kits PCR Adiavet® PARATB et Adiavet® BVD permettant respectivement la détection de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* et du virus de la Diarrhée Virale Bovine (BVD) chez les bovins sont déjà utilisés en routine depuis plusieurs années en laboratoire. Nos travaux ont consisté à développer une version PCR temps réel de ces deux tests.

#### 1. MATERIEL ET METHODES

Le test PCR Adiavet® PARATB REALTIME utilise deux amorces et une sonde Taq Man® spécifiques de *M. paratuberculosis* (IS900). Un ADN témoin synthétique appelé "contrôle interne" présent dans chaque réaction permet de confirmer le bon déroulement de la réaction PCR. La sensibilité du test PCR Real Time a été évaluée sur des ADN extraits de fèces de bovins par comparaison avec le test PCR "classique". 179 échantillons ont ainsi été caractérisés lors de cette étude. Le test PCR Adiavet® BVD Real Time utilise deux amorces et une sonde spécifiques de la séquence 5' terminale du gène codant pour le virus BVD. La sensibilité du test a été évaluée par comparaison avec le test BVD "classique" (Civelli *et al.*, 2001). Au total, 170 extraits d'ARN obtenus à partir de sérums, de pools de sérums (environ 20 sérums individuels ou mélangés), de laits individuels et de laits de tank, d'organes, et d'écouvillons nasaux individuels ou poolés par 5 ont été testés.

#### 2. RESULTATS

##### 2.1. ADIAVET® PARATB REALTIME

Evaluation de la spécificité du test sur 117 souches

Souches testées	Nbre de souches	Nbre de souches PCR temps réel positives
<i>M. paratuberculosis</i>	37	37
Autres mycobactéries	25	0
Autres bactéries, champignons et virus bovins	55	0

Evaluation de la sensibilité sur 179 échantillons

		PCR temps réel			
		positive	négative	Ind.	total
PCR	positive	33	2	1	36
	négative	1	138	1	140
qualitative	indéterminé	1	1	1	3
	TOTAL	35	141	3	179

##### 2.2. ADIAVET® BVD REALTIME

Evaluation de la spécificité sur 26 souches

Souches testées	Nbre de souches	Nbre de souches PCR temps réel positives
BVD	4	4
Autres virus bovins	10	0
Bactéries et champignons bovins	12	0

Evaluation de la sensibilité sur 170 échantillons

		PCR temps réel			
		positive	négative	Ind.	total
PCR	positive	105	0	1	106
	négative	2	55	1	58
qualitative	indéterminé	0	1	5	6
	TOTAL	107	56	7	170

#### 3. DISCUSSION

Les tests PCR développés pour la détection de *M. paratuberculosis* et du virus BVDV s'avèrent spécifiques des pathogènes recherchés.

Le test Adiavet® PARATB REALTIME s'est révélé aussi sensible que le test qualitatif utilisé en routine dans les laboratoires français, lui-même d'une sensibilité équivalente (50 UFC/g de fèces) aux méthodes de coproculture (Chevallier *et al.*, 2002). Le test PCR temps réel offre en outre l'avantage d'être beaucoup plus rapide puisque les résultats peuvent être obtenus dès la fin de l'amplification. Ce test PCR temps réel couplé avec l'extraction automatisée des fèces permettra désormais au laboratoire d'avoir une solution automatisée de la recherche de *M. paratuberculosis* et ainsi de pouvoir traiter les grandes séries d'échantillons.

Le test PCR Adiavet® BVD REALTIME permet la détection des animaux virémiques par détection d'un fragment d'ARN spécifique des virus BVDV1, BVDV2 et BDV. Ce test est utilisable sur une gamme d'échantillons variés et sa sensibilité permet de pooler les prélèvements. La technique PCR BVD s'avère donc un outil efficace et automatisable pour contrôler la présence du virus BVD dans les élevages laitiers ou allaitants.

#### CONCLUSION

Les performances des kits Adiavet® PARATB et BVD REALTIME sont comparables à celles des kits Adiavet® "qualitatifs". Ils vont permettre aux laboratoires d'utiliser facilement la PCR temps réel pour la réalisation de grandes séries d'analyses.

*Nous remercions le LDA 22, le laboratoire Franck Duncombe, le LVD 64 ainsi que le laboratoire ARSIA (Belgique) pour leur collaboration.*

**Chevallier, B., Versmisse, Y., Blanchard, B. 2002.** proceedings of the seventh International colloquium on paratuberculosis.

**Civelli, B., Roy, A.M., Chevallier, B. 2001.** Journée Bovine nantaise.p92