

Bull. Acad. Vét. de France, 1986, 59, 149-157

Isolement d'adénovirus de type 1 (FAV-1) chez des dindes atteintes de rhinotrachéite

par G. MEULEMANS* et E. SCHRICKE**

RÉSUMÉ

Des examens virologiques : immunofluorescence directe sur coupes d'organes, essais d'isolement viral sur œufs embryonnés et cellules hépatiques d'embryon de poulet ainsi que des colorations spécifiques destinées à la recherche de *Chlamydia psittaci* ont été effectués dans 12 élevages de dindes atteintes de rhinotrachéite.

Un adénovirus a été isolé des organes respiratoires, du plasma ou des matières fécales dans 7 des 12 exploitations. A l'exception d'un paramyxovirus de type 1 isolé dans une exploitation, aucun autre virus ou chlamydie n'a pu être mis en évidence dans les troupeaux testés.

Le typage sérologique des adénovirus isolés a montré que 6 d'entre eux appartiennent au sérotype FAV-1 (CELO). Une séroconversion contre les virus FAV-1 a été observée dans des troupeaux de dindes ayant présenté des signes cliniques de rhinotrachéite.

Le rôle étiologique éventuel des adénovirus dans la rhinotrachéite de la dinde est discuté.

Mots clés : Dinde - Rhinotrachéite - Adénovirus - Paramyxovirus - *Chlamydia*.

SUMMARY

ISOLATION OF TYPE 1 ADENOVIRUSES (FAV-1) IN TURKEYS AFFECTED BY RHINOTRACHEITIS

Twelve turkey flocks affected by rhinotracheitis were submitted to virological and chlamydial examinations.

Virological examination was performed using direct immunofluorescence procedure on different organ sections, viral isolation attempts in chicken embryonated eggs and inoculation of chicken hepatic cells.

An adenovirus was isolated from the respiratory tract, plasma or faeces from 7 out the 12 flocks. With the exception of one PMV-1, no other virus nor Chlamydiae were observed in the examined flocks.

* Institut National de Recherches Vétérinaires, 99, rue Groeselenberg - 1180 Bruxelles (Belgique).

** Ets Guyomarc'h, B.P. 234 - 56006 Vannes cedex (France).

Serotyping of the isolated adenoviruses showed that 6 out of the 7 isolates belong to the FAV-1 serotype. Seroconversion against FAV-1 viruses was observed in flocks which had recovered from rhinotracheitis. The aetiological role of adenoviruses in turkey rhinotracheitis is discussed.

Key words : Turkey - Rhinotracheitis - Adenovirus - Paramyxovirus - *Chlamydia*.

INTRODUCTION

Une maladie respiratoire épidémique d'étiologie mal définie a fait son apparition chez la dinde en Bretagne au printemps 1981. Depuis cette épizootie initiale, l'affection baptisée rhinotrachéite de la dinde n'a jamais complètement disparu. Elle se manifeste régulièrement, tous les 6 mois environ, par de brusques flambées de caractère épizootique.

La rhinotrachéite a probablement été observée dès 1976 aux Etats-Unis (DILLMAN et SIMMONS, 1977) ; elle a également été signalée en Afrique du Sud, Italie et Israël (HELLER *et al.*, 1984), en Espagne et, récemment, en Angleterre (BVPA, 1985).

D'un point de vue clinique, la rhinotrachéite se caractérise par une diffusion très rapide et une contagiosité élevée. Au sein d'un même élevage, tous les sujets présentent des troubles respiratoires dans un délai de 1 à 5 jours. Lors de l'épizootie initiale, la rhinotrachéite s'est étendue à la quasi-totalité de l'Ouest de la France en 6 à 8 semaines.

Les dindons peuvent être affectés à tous les âges ; la mortalité généralement faible chez les reproductrices, peut atteindre 30 % chez les dindonneaux à l'engraissement. Les taux de mortalité élevés résultent généralement d'infections bactériennes secondaires dues principalement à *Escherichia coli*.

Chez les dindes malades, les symptômes initiaux consistent en œdème sous-maxillaire et toux suivis d'écoulement oculo-nasal, de gonflement du sinus infra-orbitaire et de sinusite. A ce stade, les autopsies révèlent l'existence d'une rhinite séreuse et la présence d'un mucus trachéal abondant qui peut se caséifier et entraîner la mort des animaux par asphyxie. Chez les reproductrices en ponte, on observe, outre les signes et lésions respiratoires, une diarrhée avec sous-consommation d'aliments ; des sinusites qui rétrocedent en 8 à 10 jours et une chute de ponte de 10 à 20 % accompagnée d'une décoloration des œufs.

Les lésions respiratoires initiales observées chez les dindonneaux à l'engraissement sont souvent compliquées par des septicémies dues à des germes secondaires parmi lesquels *E. coli* joue un rôle prépondérant. Les lésions qui en résultent sont celles, classiques, des infec-

tions respiratoires où interagissent plusieurs agents pathogènes : péricardite, périhépatite, péritonite et aéro-sacculite.

Des examens virologiques et sérologiques systématiques ont été effectués en 1981 et 1982 par ANDRAL *et al.* (ANDRAL *et al.*, 1985) qui concluent que *Chlamydia psittaci* serait l'agent étiologique de la rhinotrachéite de la dinde.

Le but de notre communication est de rapporter les résultats des examens virologiques que nous avons effectués dans des troupeaux de dindes atteintes de rhinotrachéite.

MATERIEL ET METHODES

EXAMENS VIROLOGIQUES

Prélèvements

Différents organes : poumon, trachée, foie, rate, bourse de Fabricius, caecums et plasma ont été prélevés dans 12 troupeaux de dindes atteintes ou suspectes de rhinotrachéite infectieuse.

Les prélèvements ont été placés immédiatement dans de la glace et envoyés au laboratoire pour examen virologique.

Les organes destinés aux essais d'isolement viral sont mis en suspension (10 % P/V) dans du PBS additionné d'antibiotiques (Pénicilline 100 U., Streptomycine 100 µg, Gentamycine 80 µg par ml). Après 1 h de contact à température ambiante, les suspensions sont centrifugées et le surnageant est inoculé sur œufs embryonnés et cultures cellulaires.

Des coupes de trachée et de bourse de Fabricius destinées aux examens par immunofluorescence sont réalisées au microtome à congélation.

Inoculation aux œufs embryonnés

Les œufs embryonnés de poule EOPS (Valo, Lohman) sont inoculés par voie allantoïdienne à l'âge de 9 jours. Chaque prélèvement est inoculé à 4 œufs. Deux œufs sont tués après 48 à 72 h et leur liquide allantoïdien est inoculé à une nouvelle série de 4 œufs. Trois passages aveugles sont réalisés selon cette technique, les œufs encore vivants au 20^e jour d'incubation sont tués et les embryons en sont examinés.

Inoculation sur cellules hépatiques d'embryon de poulet

Des cultures d'hépatocytes sont préparées à partir d'embryons de poulets EOPS âgés de 14 jours. Le milieu de croissance utilisé pour la mise en culture des cellules hépatiques consiste en milieu M 199 additionné de 10 % de sérum de veau fœtal. Après inoculation, le

milieu M 199 est remplacé par du milieu de Eagle minimum contenant 2 % de sérum de veau fœtal. Les cellules sont observées durant 7 jours puis le milieu de culture est récolté et après 3 cycles de congélation/décongélation est réinoculé à des cellules fraîches. Trois passages aveugles sont réalisés.

Identification des virus isolés

Le surnageant des cultures présentant un effet cytopathogène est soumis à examen au microscope électronique après coloration négative à l'acétate d'uranyle. Les adénovirus isolés sont caractérisés par séro-neutralisation en présence d'un antisérum FAV-1 (CELO) préparé sur volailles SPF (MEULEMANS *et al.*, 1978).

Le test de séroneutralisation est effectué sur cellules hépatiques d'embryon de poulet selon la méthode α (BEARD, 1980). Les dilutions logarithmiques du virus testé sont réalisées en base 10 et incubées pendant 2 h à 37° C en présence d'un volume égal d'antisérum FAV-1 dilué à 1/10. L'indice de neutralisation (IN) représente la différence entre le titre du virus seul et celui du virus en présence du sérum de référence.

Réactions d'immunofluorescence

Les coupes de trachée sont colorées à l'aide d'immunsérums fluorescents monospécifiques des virus de la bronchite infectieuse aviaire et des paramyxovirus aviaires de type 1.

Les coupes de bourse de Fabricius sont colorées à l'aide d'immunsérum fluorescent spécifique de la maladie de Gumboro. Les techniques utilisées pour la préparation des immunsérums fluorescents et pour la réalisation des réactions d'immunofluorescence directe ont été décrites antérieurement (MEULEMANS *et al.*, 1978).

RECHERCHE DE CHLAMYDIA PSITTACI

Des décalques de foie, rate et poumon sont colorés selon la méthode de Koster-Stamp et observés au microscope optique (grossissements 500 et 1 000).

EXAMENS SÉROLOGIQUES

Des sérums ont été prélevés dans 4 troupeaux de dindes dont 2 étaient indemnes de rhinotrachéite et 2 autres avaient présenté des signes cliniques 2 mois plus tôt.

Test de double diffusion en milieu gélosé

Les tests de double diffusion en milieu gélosé sont effectués selon la technique classique en utilisant la souche CELO comme antigène.

Test de séroneutralisation

Le test de séroneutralisation est effectué en méthode β (BEARD, 1980). Une dose constante (100 DICT 50) de virus FAV-1 isolé dans l'élevage Monnier est mise en présence de dilutions des sérums à tester. Après 2 h de contact à 37° C, les mélanges sérum-virus sont inoculés sur cellules hépatiques d'embryon de poulet. Le titre des sérums correspond à l'inverse de la dernière dilution sérique qui empêche totalement l'expression de l'effet cytopathogène viral.

RESULTATS

Dans tous les élevages, les réactions d'immunofluorescence sont restées négatives à la fois pour les paramyxovirus aviaires de type 1, la bronchite infectieuse aviaire et la maladie de Gumboro.

De même, la recherche de *Chlamydia psittaci* fut également négative.

A l'exception d'un paramyxovirus de type 1, aucun autre virus n'a été isolé sur œufs embryonnés. Par contre, dans 7 des 12 exploitations examinées, nous avons isolé un adénovirus sur cultures d'hépatocytes (tab. 1). Ces adénovirus furent isolés de la trachée, du plasma ou des matières fécales. Aucun de ces virus ne fut directement cytopathogène, deux passages aveugles étant généralement nécessaires avant que les

TABLEAU I
Identification des adénovirus isolés

Souche	Date isolement	Organe d'origine	Indice de neutralisation*
630	juin 1985	plasma	7
631	juin 1985	plasma	7
632	juin 1985	faeces	5,33
633	juin 1985	faeces	5,33
635	juin 1985	poumon/trachée	7
1 620	novembre 1985	trachée	5,88
1 621	novembre 1985	trachée	1,25

* L'antisérum utilisé est un sérum anti-FAV-1.

lésions cellulaires typiques des adénovirus n'apparaissent. L'identification des virus isolés fut confirmée par examen au microscope électronique du surnageant des cultures cellulaires positives après coloration à l'acétate d'uranyle. De nombreuses particules virales non enveloppées, d'un diamètre moyen de 75 nm, à symétrie icosaédrique, typiques des *Adenoviridae* étaient présentes dans le surnageant des cultures d'hépatocytes présentant des effets cytopathogènes. Les tests de séroneutralisation effectués sur chacun des adénovirus isolés démontrent que 6 de ces virus appartiennent au sérotype FAV-1.

Les examens sérologiques pratiqués tant par double diffusion en milieu gélosé que par séroneutralisation permettent d'objectiver une séroconversion évidente dans les troupeaux ayant présenté des signes cliniques de rhinotrachéite (tab. 2).

TABLEAU II
Résultats des examens sérologiques

Troupeau	Signes cliniques	Anticorps précipitants	Anticorps séro-neutralisants
Blain	+	15/15*	2560**
Duchesne	—	0/19	0
Gaec	—	0/20	N.T.
Jollivet	+	20/20	2560

* Nombre positifs / Nombre examinés.

** Titre moyen évalué sur 4 pools de sérums.

DISCUSSION

Jusqu'à présent l'agent étiologique responsable de la rhinotrachéite n'a pas été formellement identifié. Bien que certains auteurs soupçonnent une étiologie bactérienne : *Alcaligenes fecalis* (JACKWOOD *et al.*, 1985), *Chlamydia psittaci* (ANDRAL *et al.*, 1985), de nombreux scientifiques considèrent qu'une étiologie virale est la plus probable (BVPA, 1985).

Des adénovirus ont déjà été isolés aux U.S.A. (BLALOCK *et al.*, 1975 ; CHO, 1976 ; SIMMONS *et al.*, 1976) et en Irlande (SCOTT et Mc FERRAN, 1972) chez des dindes atteintes de troubles respiratoires.

Les signes cliniques et lésions décrits dès 1976 par DILLMAN et SIMMONS aux États-Unis chez des dindes infectées naturellement par

des adénovirus sont similaires à ceux observés à l'heure actuelle en Europe. Cependant les résultats d'infections expérimentales pratiquées en laboratoire au moyen de divers adénovirus isolés chez les dindes sont contradictoires. Ainsi BLALOCK *et al.* et CHO (1976) ont-ils réussi à reproduire des troubles respiratoires alors que SIMMONS *et al.* (1976) considèrent que leur souche d'adénovirus ne cause aucune maladie clinique lors d'infection expérimentale. Paradoxalement, les souches d'adénovirus isolées par ces différents auteurs, bien que différentes du point de vue de leur pouvoir pathogène, appartiennent toutes au même groupe sérologique (Adéno type 1). Six des sept adénovirus que nous avons isolés appartiennent également à ce même sérotype et les examens sérologiques préliminaires que nous avons réalisés ont montré l'existence d'une séroconversion contre les adénovirus de type 1 dans des troupeaux atteints de rhinotrachéite.

Au vu de nos résultats et des données de la littérature, il nous semble raisonnable de penser que les adénovirus de type 1 que nous avons isolés pourraient jouer un rôle important dans la rhinotrachéite de la dinde. Des études sérologiques plus extensives, des épreuves d'infection expérimentale et des essais de vaccination à l'aide de vaccins inactivés seront cependant nécessaires pour démontrer formellement le rôle étiologique des adénovirus de type 1 dans cette affection.

D'autre part, l'intervention de certains paramyxovirus de type 1 ne peut être sous-estimée. Une caractérisation sommaire, effectuée à l'aide d'anticorps monoclonaux, tend à démontrer que le PMV1 que nous avons isolé appartient au groupe des souches lentogènes sans qu'il s'agisse cependant d'une souche vaccinale de type Hitchner ou La Sota.

Des souches lentogènes de PMV1 ont déjà été antérieurement isolées en France chez des dindes malades (DURAND, communication personnelle). De plus, des séro-conversions à PMV1 ont été observées aux Etats-Unis dans des troupeaux de dindes non vaccinées contre la maladie de Newcastle et atteintes de rhinotrachéite (PAGE *et al.*, 1978). En conclusion, les PMV1 pourraient au moins jouer le rôle d'agents secondaires.

REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans l'aide technique compétente et enthousiaste de Mlle M.C. CARLIER, Mmes M. GONZE et P. PETIT, M. M. VANDENBROECK que nous remercions.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANDRAL (B.), LOUZIS (C.), EDLINGER (E.), NEWMAN (J.A.), TOQUIN (D.), BENNEJEAN (G.). — Respiratory disease (Rhinotracheitis). In Turkeys in Brittany, France, 1981-1982. II. Laboratory findings. *Avian Dis.*, 29, 35-42, 1985.

- [2] BEARD (C.W.). — Serologic procedures. In Isolation and identification of avian pathogens. American Association of Avian Pathologists. Creative Printing Company New York, p. 129-135, 1980.
- [3] BLALOCK (H.G.), SIMMONS (D.G.), MUSE (K.E.), GRAY (J.G.), DERIEUX (W.T.) — Adenovirus respiratory infection in turkey poults. *Avian Dis.*, 19, 707-713, 1975.
- [4] BRITISH VETERINARY POULTRY ASSOCIATION (B.V.P.A.). — Turkey rhinotracheitis of unknown aetiology in England and Wales. *Vet. Rec.*, 653-654, 1985.
- [5] CHO (B.R.). — An adenovirus from a turkey pathogenic to both chicks and turkey poults. *Avian Dis.*, 20, 714-723, 1976.
- [6] DILLMAN (R.C.), SIMMONS (D.G.). — Histopathology of a rhinotracheitis of turkey poults associated with adenoviruses. *Avian Dis.*, 21, 481-491, 1977.
- [7] HELLER (E.D.), WEISMAN (Y.), AHARONOVITCH (A.). — Experimental studies on turkey coryza. *Avian Path.*, 13, 137-143, 1984.
- [8] JACKWOOD (M.F.), SAIF (Y.M.), MOORHEAD (P.D.), DEARTH (R.N.). — Further characterization of the agent causing coryza in turkeys. *Avian Dis.*, 29, 690-705, 1985.
- [9] MEULEMANS (G.), ANTOINE (O.), HALEN (P.). — Préparation d'antisérums conjugués à la fluorescéine pour le diagnostic des principaux virus aviaires. *Ann. Méd. Vét.*, 122, 45-50, 1978.
- [10] PAGE (R.K.), FLETCHER (O.J.), LUKERT (P.D.), RIMLER (R.). — Rhinotracheitis in turkey poults. *Avian Dis.*, 22, 529-534, 1978.
- [11] SCOTT (M.), Mc FERRAN (J.B.). — Isolation of adenoviruses from turkeys. *Avian Dis.*, 16, 413-420, 1972.
- [12] SIMMONS (D.G.), MILLER (S.E.), GRAY (J.G.), BLALOCK (H.G.), COLWELL (M.). — Isolation and identification of a turkey respiratory adenovirus. *Avian Dis.*, 20, 65-74, 1976.

**

INTERVENTION DE M. DURAND

Je tiens à souligner l'importance de cette communication qui, je l'espère, mettra fin à une controverse qui s'est installée dès l'apparition de cette maladie en France.

En effet, dès l'apparition de la maladie en Bretagne, une controverse, parfois passionnelle, s'est installée entre les tenants d'une étiologie chlamydienne et ses opposants.

Dès 1981, ANDRAL *et al.* [1, 2, 3], aux résultats d'une sérologie positive faite en fixation du complément suivant une technique de réalisation délicate, affirmaient le rôle de la chlamydie dans cette affection ; des chlamydies même auraient été isolées ; il s'en est suivi des conséquences dommageables, tant au point de vue aspect zoonose (la chlamydie est contagieuse pour l'homme), que du point de vue aspect commercial (par la difficultés d'exporter nos dindes), la chlamydie étant « maladie réputée légalement contagieuse », donc soumise à déclaration.

L'autre thèse a été défendue par SCHRICKE et DURAND qui, alertés par les éleveurs bretons inquiets des conséquences sanitaires, économiques et commerciales de cette déclaration de chlamydie, ont mis au point le Test Elisa chlamydie sur le dindon, ont montré que cette technique sérologique était plus fiable que la fixation du complément chez cet animal, n'ont pas observé de séro-conversions anormales chez les éleveurs et ont émis l'opinion d'une étiologie virale spécifique dans cette affection ;

les chlamydie n'intervenant que comme germe de surinfection, tout comme probablement certains PMV-1 qu'ils ont isolés et que le Dr MEULEMANS a isolé et décrit dans sa communication.

L'ensemble de ces recherches avait fait l'objet d'une communication à cette Académie (DURAND [4]).

Je me félicite donc de cette découverte du Dr MEULEMANS ; connaissant l'étiologie, il sera dès lors, plus facile de préparer un vaccin nécessaire pour l'aviculture bretonne, si l'on parvient à cultiver industriellement le virus.

Je tiens, à cette occasion, à rendre hommage à la mémoire de M. HERVIEU (Guyomarc'h Cidef) qui a été l'élément dynamique du début des recherches sur cette nouvelle maladie et je vous remercie, Dr MEULEMANS, de l'aide précieuse que vous nous avez apportée.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANDRAL (B.). — L'étiologie de la rhinotrachéite de la dinde. *L'Aviculteur*, 423, 71-74, 1982.
 - [2] ANDRAL (B.), LOUZIS (C.). — La rhinotrachéite de la dinde en Bretagne. *Bull. Lab. Vét.*, 7, 33-43, 1982.
 - [3] ANDRAL (B.), LOUZIS (C.), TRAP (D.) *et al.* — Respiratory disease in turkeys, in Brittany (France) 1981-1982. I. Field observations and serology. *Avian Dis.*, 29, 26-34, 1985.
 - [4] DURAND (M.), LIMOUZIN (C.), SCHRICKE (E.). — Contribution de la méthode Elisa au diagnostic sérologique de la chlamydiose aviaire ; application au cas de la rhinotrachéite infectieuse de la dinde en Bretagne. *Bull. Ac. Vét. France*, 56, 353-362, 1983.
-