

Bull. Acad. Vét. de France, 1985, 58, 323-335

COMMUNICATIONS

Caractérisation d'une nouvelle souche de coronavirus de la bronchite infectieuse aviaire

par J.P. PICAULT*, G. BENNEJEAN*, P. DROUIN*, R. L'HOSPITALIER*,
J.P. GILLET**, M. GUITTET*, J. LAMANDE* et A. LE BACHELIER*

RÉSUMÉ

Un coronavirus a été isolé chez des poules pondeuses présentant des signes cliniques sévères évoquant la bronchite infectieuse aviaire, maladie contre laquelle, elles avaient été immunisées avec un vaccin préparé à partir du sérotype dominant Massachusetts ; ce virus présente des différences antigéniques avec les sérotypes Massachusetts et Connecticut ainsi qu'avec les quatre sérotypes « variants » isolés par l'Institut de Doorn aux Pays-Bas. La maladie a été reproduite chez le poulet et la poule : les symptômes respiratoires ont été sévères dans les deux cas et la chute de ponte a été intense et persistante chez les pondeuses. Le fait de développer une prophylaxie médicale adaptée est discuté.

Mots clés : Bronchite infectieuse - Coronavirus - Sérotype - Variant - Poule - Pathogénicité - Vaccin.

SUMMARY

CHARACTERIZATION OF A NEW CORONAVIRUS STRAIN OF POULTRY INFECTIONS BRONCHITIS

A coronavirus was isolated in an infectious bronchitis (IB) vaccinated (Massachusetts strain) layers flock showing severe IB-like clinical signs.

Ministère de l'Agriculture, Direction de la Qualité, Services Vétérinaires :

- * Laboratoire National de Pathologie Aviaire et Station Expérimentale d'Aviculture, B.P. 9 - 22440 Ploufragan.
- ** Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires, B.P. 67 - 94703 Maisons-Alfort cedex.

The isolate is antigenically different from the Massachusetts and the Connecticut serotypes and from the four « variant » serotypes isolated by the Doorn Institute in Holland. The disease was reproduced in chickens and layers. Respiratory signs were severe in both groups. In layers, egg drop was intense and long-lasting. The eventual need for a suitable medical prophylaxy is discussed.

Key words : Infectious bronchitis - Coronavirus - Serotype - Variant - Hen - Pathogenicity - Vaccine.

INTRODUCTION

La bronchite infectieuse est une des dominantes pathologiques actuelles de l'espèce poule. La prévention de cette coronavirose, qui fait appel à l'utilisation de vaccins préparés avec le sérotype dominant Massachusetts, connaît certains échecs attribués auparavant aux conditions d'utilisation du vaccin. Enre 1976 et 1981, des auteurs étrangers [1, 2, 3, 4] ont isolé et caractérisé des coronavirus dits « variants » qui seraient impliqués dans cette pathologie. Une enquête sérologique réalisée en France a révélé la présence, dans les troupeaux de poules et poulets [5], d'anticorps neutralisant plusieurs de ces virus « variants », mais n'a pas permis de leur attribuer un rôle étiologique certain dans les cas cliniques étudiés [6]. Les essais d'isolement de coronavirus ont concerné des cas évidents de rupture d'immunité vaccinale afin d'augmenter la probabilité d'isoler un virus plus ou moins différent du sérotype Massachusetts. La présente note rapporte les conditions d'isolement en France et la caractérisation d'un coronavirus intéressant, de par ses propriétés antigéniques et son pouvoir pathogène.

ETUDE CLINIQUE

Le cas clinique qui a permis l'isolement de ce coronavirus a été observé en février 1984 dans un troupeau de 6 100 poules appartenant à plusieurs variétés génétiques de pondeuses en cours de testage à la Station Expérimentale d'Aviculture de Ploufragan. Ces poules avaient bénéficié au cours de la période d'élevage des interventions thérapeutiques et prophylactiques classiques, comportant notamment la vaccination contre la bronchite infectieuse aviaire selon le programme suivant : vaccin à virus vivant Massachusetts H120, administré par nébulisation à 1 et 28 jours, puis rappel avec un vaccin à virus Massachusetts inactivé administré par injection intramusculaire à 19 semaines d'âge.

1. *Sur le plan clinique*, au cours de la 40^e semaine d'âge, les poules ont montré des signes évidents de trachéite avec détresse respiratoire allant jusqu'à la suffocation, et une inspiration se faisant

le bec ouvert avec extension du cou. Ces signes étaient accompagnés de mouvements de tête saccadés et de déglutitions dans le but d'éliminer les bouchons muqueux trachéaux. En « bruit de fond » s'entendaient des râles gras et des « chants » trachéaux. A part quelques exceptions, il n'y avait ni jetage nasal traduisant une rhinite, ni diarrhée. La morbidité fut, entre 40 et 44 semaines d'âge, de 100 % et la mortalité, suivant les souches, de 0 % à 2,6 %.

2. *Sur le plan anatomo-pathologique*, les autopsies des sujets morts ont révélé :

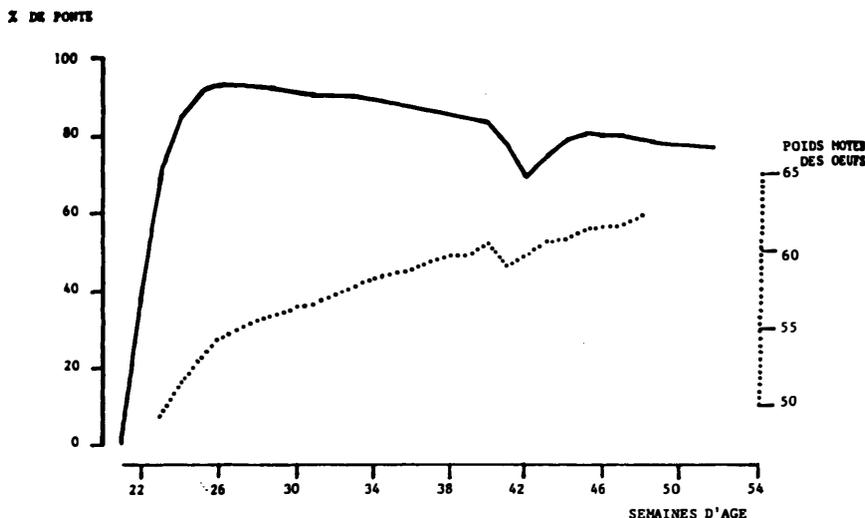
- D'une manière constante :
 - une crête violacée ;
 - une cloacite catarrhale ;
 - une trachéite avec inflammation catarrhale sur toute la longueur de la trachée, avec présence de pétéchies et d'exsudats mucopurulents ;
 - des poumons congestionnés et œdémateux ;
 - des reins congestionnés, hypertrophiés.
- D'une manière inconstante, au niveau de l'appareil génital :
 - la présence d'un ou deux ovules flasques déformés, parfois congestionnés ;
 - une vaginite catarrhale ;
 - l'existence d'un œuf dans l'oviducte n'était pas rare.

Entre les 44^e et 48^e semaines d'âge, est apparue une série de pontes abdominales et de salpingites purulentes.

3. *Sur le plan des conséquences zootechniques*, il a été observé une légère baisse de consommation d'aliment, et surtout une altération des performances des pondeuses, aussi bien en ce qui concerne le nombre que le poids et la qualité des œufs (graphique 1). La coloration des coquilles a diminué tandis que la proportion d'œufs à coquilles fêlées a considérablement augmenté.

ETUDE ETIOLOGIQUE

L'ISOLEMENT DU VIRUS a été obtenu sur œufs de poules exemptes d'organismes pathogènes spécifiés (E.O.P.S.) inoculés avec le surnageant de centrifugation des broyats de trachée et poumons de poules malades depuis 3 jours. Après 3 passages « aveugles », une mortalité embryonnaire a été enregistrée 72 h après l'inoculation. Une partie des embryons morts et des survivants ont présenté des lésions reconnues comme typiques des coronavirus, à savoir



Graphique 1

Courbe de ponte et poids moyen des œufs du troupeau contaminé.

embryons, encapsulés, momifiés, nains, sans duvet... Par ailleurs, la recherche d'autres agents susceptibles de provoquer les symptômes observés notamment les para et orthomyxovirus ainsi que le virus de la laryngo-trachéite infectieuse, s'est avérée négative.

Un antigène précipitant a été préparé à partir des membranes chorioallantoïdiennes des œufs morts. La séroprécipitation, qui est une réaction de groupe ne permettant pas de différencier les sérotypes entre eux, réalisée à l'aide de cet antigène et d'un sérum hyperimmun monospécifique anti-virus Massachusetts de la bronchite infectieuse aviaire a donné une réaction positive.

L'observation au microscope électronique à transmission, après coloration négative à l'acide phosphotungstique des liquides allantoïdiens prélevés dans les œufs morts a révélé la présence de particules présentant la morphologie caractéristique des coronavirus.

A la suite de ces travaux préliminaires, l'isolat a été baptisé PL-84084 (Ploufragan, L.N.P.A., année 1984, prélèvement n° 084).

LE DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE a pu être effectué sans équivoque grâce à la présence dans le poulailler atteint, de quelques poules E.O.P.S. introduites habituellement au moment du transfert des autres poules en bâtiment de ponte dans le but de dépister les

TABLEAU I

Séroconversion des poules malades : anticorps précipitants et anticorps inhibant l'hémagglutination

Nombre de semaines avant (—) et après (+) les premiers symptômes		— 6	— 4	+ 0,5	+ 2	+ 4	+ 10,5
Nombre de sujets présentant des anticorps précipitants (poules non E.O.P.S.)		1 sur 15		2 sur 19	19 sur 19	14 sur 17	
Titres en anticorps inhibant l'hémagglutination : (1)	poules non E.O.P.S.		22 10 à 80	89 20 à 320	154 40 à 640	45 20 à 80	38 20 à 80
	poules E.O.P.S.		8 5 à 10		98 40 à 320		17 10 à 40

(1) *Moyenne géométrique* et titres individuels minimaux et maximaux exprimés en inverses des dilutions de sérum.

contaminations éventuelles. Ces poules E.O.P.S. n'ayant reçu aucun vaccin ne présentaient pas d'anticorps au moment de l'épisode clinique de bronchite. Leur séroconversion, de même que celle des autres poules, a été démontrée en recherchant les anticorps précipitants non sérotypiques (antigène de groupe coronavirus), les anticorps inhibant l'hémagglutination (antigène hémagglutinant Massachusetts, peu sérotypique) et les anticorps neutralisants sérotypiques, selon la méthode bêta (antigènes viraux PL-84084 et Massachusetts) : tableaux 1 et 2.

TABLEAU II

Séroconversion des poules malades : anticorps neutralisants (indices de séroneutralisation) chez les poules d'origine E.O.P.S. 10,5 semaines après les premiers symptômes

Sérum	Virus PL 84084	Massachusetts
des poules d'origine E.O.P.S.	≥ 6,11	< 3,07
de référence, anti-Massachusetts	< 2,24	≥ 6,07

ETUDE EXPERIMENTALE

SÉROTYPAGE DU VIRUS

Un sérum anti-virus PL-84084 a été préparé sur poulets E.O.P.S. dans le but de réaliser des séroneutralisations croisées destinées à sérotyper le nouvel agent isolé. A cette fin, huit coronavirus de la bronchite infectieuse aviaire, et leurs anti-sérums, ont été utilisés : les virus de référence Massachusetts et Connecticut, représentant respectivement les sérotypes 1 et 2 de virus de la bronchite infectieuse, et 6 virus « variants » (D207, D212, D3128, D3896, D274, et D1466) isolés par les chercheurs de l'Institut hollandais de Doorn. Ces deux derniers virus bien que voisins des virus D207 et D212, ont été inclus dans le test car ils sont utilisés en Hollande pour la préparation de nouveaux vaccins.

Les solutions virales ont toutes été pré-ajustées à un titre situé entre $10^{4.5}$ et 10^7 DIE50 par ml avant de subir des dilutions décimales en milieu stabilisateur. Ces dernières ont été ajoutées à part égale (0,4 ml) au sérum à tester, lui-même prédilué au 1/25^e en milieu

TABLEAU III. — Indices des séroneutralisations croisées (méthode α)

Sérum	Virus								
	PL 84084	Massachusetts	Connecticut	D 207	D 212	D 3128	D 3896	D 274	D 1466
PL 84084	$\geq 5,28$	$< 2,42$	1,90	2,89	1,68	1,40	2,65	3,12	2,80
Massachusetts	$< 1,81$	$\geq 5,12$							
Connecticut	1,41		4,07						
D 207	2,22			4,55					
D 212	1,40				$\geq 5,27$				
D 3128	2,56					4,31			
D 3896	2,40						5,70		
D 274	2,79							5,37	
D 1466	2,39								6,40

stabilisateur. Après 30 min d'incubation à une température voisine de 20° C, chaque mélange a été inoculé par voie allantoïdienne et sous 0,1 ml à 5 œufs E.O.P.S. embryonnés de 9 jours. Les œufs ont été incubés à la température de 37° C pendant une période supplémentaire de 9 jours, au cours de laquelle ils ont été mirés quotidiennement. Les embryons morts dans les 24 h suivant l'inoculation ont été décomptés en mortalité non spécifique. Ceux morts plus tard et/ou présentant des lésions spécifiques de coronavirus à la casse effectuée en fin de période d'incubation, ont permis la détermination du titre infectieux du mélange calculé selon la méthode de REED et MUENCH, et par suite, de l'indice de neutralisation.

Les résultats sont regroupés dans le tableau 3. Ils révèlent une différence antigénique certaine entre le virus PL-84084 et les huit autres virus, même si les écarts entre les indices des réactions homologues et hétérologues ne sont pas dans l'ensemble très élevés, ce qui est peut-être dû aux titres relativement faibles des anti-sérums utilisés.

REPRODUCTION EXPÉRIMENTALE DE LA MALADIE

Deux essais ont été réalisés en animalerie protégée afin de connaître le pouvoir pathogène propre du nouvel agent isolé pour le jeune et pour l'adulte.

• *Chez le jeune*

Trente poussins E.O.P.S. d'un jour et 30 poulets E.O.P.S. de 15 jours, de souche White Leghorn, ont été inoculés par instillation oculaire avec $10^{3.3}$ DIE50 de virus PL-84084. Les signes cliniques consécutifs à cette infection expérimentale ont été enregistrés quotidiennement pendant une période de 4 semaines après l'inoculation. Les symptômes respiratoires ont été notés individuellement de 0 à 4 selon leur intensité, la valeur maximale étant attribuée à la détresse respiratoire très intense suivie ou non de mortalité. Une note moyenne a été déterminée en prenant en compte l'ensemble des sujets du lot et non seulement les malades. Les résultats sont regroupés dans le tableau 4. La plupart des sujets des deux groupes ont présenté des signes cliniques de trachéo-bronchite avec, pour certains, une détresse respiratoire accompagnée de râles gras très intenses. Il n'a pas été observé de jetage nasal, ni de diarrhée, ni de mortalité. Les plus jeunes poussins ont paru plus sévèrement touchés que leurs aînés, notamment de par l'intensité des symptômes respiratoires individuels et leur durée particulièrement longue pour des sujets E.O.P.S. chez lesquels ne sont pas observées les complications intervenant généralement chez les poulets conventionnels. Les lésions ont été celles d'une trachéo-bronchite comme l'a confirmée l'étude anatomo-pathologique de la plupart des organes

TABLEAU IV

Observations cliniques après infection expérimentale chez le jeune :
symptômes respiratoires

Age des poussins au moment de l'infection	1 jour	15 jours
Pourcentage de sujets ayant présenté des symptômes respiratoires	79	80
Intensité moyenne des symptômes respiratoires dans le lot (notation sur 4)	2,5	2
Durée maximale des symptômes respiratoires individuels	22 jours	7 jours

prélevés 17 jours après l'inoculation chez un échantillon de 5 sujets par lot. Les organes atteints ont été la trachée, les poumons et la glande de Harder dans les deux groupes, et de surcroît, le rein et le foie chez deux des plus jeunes sujets. Les images lésionnelles ont été celles habituellement observées avec les souches classiques de virus de la bronchite infectieuse aviaire.

• *Chez l'adulte*

Soixante-quatre poules pondeuses de race White Leghorn ont été élevées conventionnellement de la naissance jusqu'à l'âge de 21 semaines. Elles ont reçu un programme de vaccination classique, et notamment le vaccin à virus vivant H₁₂₀ de la bronchite infectieuse administré par nébulisation à l'âge d'un jour, 4 et 12 semaines. A l'âge de 21 semaines, elles ont été transférées en deux animaleries protégées, à raison de 32 poules par animalerie. La ponte a été enregistrée et les pourcentages de ponte calculés hebdomadairement. A l'âge de 28 semaines, peu après le pic de ponte, un des deux groupes a été éprouvé en nébulisant pendant une quinzaine de minutes (Appareil Atomist) 1 500 ml d'une suspension virale titrant 10^{6,7} DIE50 par ml du virus PL-84084, pour un volume d'animalerie de 70 m³. L'autre groupe a subi une nébulisation identique à l'aide d'une solution PBS.

Les symptômes respiratoires ont été enregistrés quotidiennement pendant 2 semaines après l'épreuve virulente et ont été évalués selon le système de notation précédemment (tab. 5). Sur un plan qualitatif, ces symptômes ont été en tous points identiques à ceux déjà décrits chez les poussins. Sur un plan quantitatif, par contre, deux différences ont été constatées : les symptômes respiratoires ont été à la fois très intenses et de très courte durée. Cela

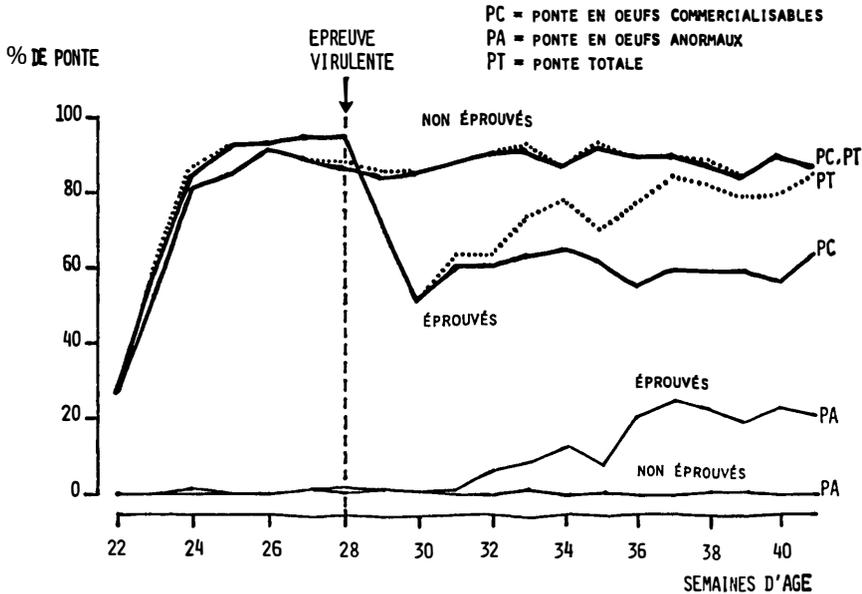
TABLEAU V

Observations cliniques après infection expérimentale chez l'adulte :
symptômes respiratoires

Produit nébulisé	Virus PL 84084 dilué en P.B.S.	P.B.S.
Pourcentage des sujets ayant présenté des symptômes respiratoires	100	0
Intensité moyenne des symptômes respiratoires dans le lot (notation sur 4)	3,8	0
Durée maximale des symptômes respiratoires individuels	5 jours	—

est peut-être dû aux conditions d'épreuve par aérosolisation, permettant de toucher les cellules-cibles des voies respiratoires supérieures plus rapidement et plus efficacement que lors d'une administration par voie oculaire.

La ponte a été enregistrée après l'épreuve pendant une période de 13 semaines, en distinguant les œufs commercialisables ou pas (graphique 2). Les poules infectées à l'aide du virus PL-84084 ont accusé une chute de ponte de 42 % au cours des deux premières semaines suivant l'épreuve. Par la suite, leur taux de ponte est remonté, mais l'augmentation parallèle du nombre d'œufs anormaux a maintenu le taux de production des œufs commercialisables à un niveau moyen de 55 à 65 %, soit constamment 25 à 35 % de moins que celui des témoins. Ces œufs anormaux, au nombre desquels n'ont pas été comptés ceux à coquille tachée de sang, pourtant assez nombreux, étaient des œufs sans coquille ou à coquille fragile, déformée, « baguée » ou « cerclée », et des œufs de très petite taille. Le fait que les poules de race Leghorn pondent des œufs blancs n'a pas permis de prendre en compte le critère « décoloration de la coquille » qui représente habituellement une proportion élevée du nombre d'œufs déclassés dans le cas des œufs teintés. C'est aussi, très probablement, la raison pour laquelle le taux de ponte des œufs anormaux paraît augmenter lentement, car la décoloration de la coquille est la première anomalie de l'œuf à se révéler puis à disparaître après une épreuve effectuée avec un virus classique de la bronchite infectieuse. En ce qui concerne le poids des œufs, il n'a pas été effectué de mesures mais l'épreuve virulente a incontestablement entraîné une baisse et surtout une hétérogénéité prolongée dans le poids des œufs des sujets infectés.



Graphique 2

Observations cliniques après infection expérimentale chez l'adulte :
pourcentages de ponte.

Outre les symptômes respiratoires et la chute de ponte, les poules infectées ont présenté de la diarrhée au cours des 13 semaines suivant l'épreuve.

En cours d'essai, les lésions ont été recherchées chez les quelques poules mortes naturellement. Elles ont présenté des ovules flasques et déformés ainsi qu'une cloacite, cette dernière lésion étant observée assez fréquemment chez des poules vivantes situées dans les cages où étaient pondus la plupart des œufs tachés de sang.

A la fin de la période d'observation de 13 semaines, des autopsies ont été pratiquées chez quelques poules présentant une diarrhée crayeuse et une cloacite apparemment ancienne. Il a été observé une atésie de la grappe ovarienne et du vagin, une salpingite et, chez un sujet, présence au niveau de l'utérus d'un œuf accompagné de nodules caséeux de la taille d'une noix avec adhérence entre l'intestin et l'oviducte. Ce genre de lésions avait également été observé lors du premier cas clinique, à une époque tardive correspondant à la période des complications secondaires.

DISCUSSION-CONCLUSION

L'intérêt du virus PL-84084 découle de ses caractéristiques antigéniques différentes du sérotype dominant Massachusetts, qui sert à la préparation des vaccins contre la bronchite infectieuse, et de son pouvoir pathogène élevé. En ce qui concerne le premier point les différences entre les indices de séroneutralisation des réactions homologues et hétérologues sont nettes et ne prêtent pas à confusion. Les différences sont toujours un peu moins nettes et un peu plus irrégulières vis-à-vis de certains des autres virus utilisés pour la détermination du sérotype de l'isolat. Faut-il alors parler de sous-type ou d'un nouveau virus « variant » ? Une réponse claire à cette question nécessitera d'une part de rechercher la protection croisée éventuellement conférée par des vaccins appartenant à différents sérotypes vis-à-vis du virus PL-84084, et d'autre part d'inclure dans les tests de séroneutralisation croisée les nombreux sérotypes viraux déjà connus, notamment aux Etats-Unis, et dont le nombre élevé augmente rapidement. Si les essais sont en cours en ce qui concerne le premier point, le second ne pourra être envisagé que dans la mesure où nous disposerons des antisérums correspondants. Il y a lieu toutefois de noter que les différents sérotypes isolés depuis une vingtaine d'années, à l'exception des souches hollandaises de l'Institut de Doorn, ont plus un intérêt comme souches de collection que comme souches présentant des propriétés intéressantes pour l'élevage.

Par ailleurs, les essais de protection croisée devront concerner aussi bien les poulets que les poules pondeuses afin de prendre en compte le double tropisme respiratoire et génital du virus PL-84084. Une première réponse découle déjà de l'observation du premier épisode clinique spontané : la mise en œuvre d'un programme de vaccination à sérotype Massachusetts n'a pas empêché la chute de ponte et les troubles respiratoires. Il est vrai que ce programme de vaccination revêtait un caractère un peu particulier dans la mesure où le dernier rappel avant l'entrée en ponte avait été réalisé à l'aide d'un vaccin inactivé en excipient huileux qui, à cette époque, était encore peu utilisé sur le terrain en raison de sa commercialisation récente. Néanmoins, ce type de vaccin a déjà fait ses preuves sur le plan expérimental. De plus, compte tenu du pouvoir pathogène élevé du virus PL-84084, aussi bien sur le terrain que dans des conditions expérimentales, il paraît judicieux d'envisager dès maintenant la recherche d'un vaccin mieux adapté, dans la mesure bien sûr où le cas clinique décrit n'est pas isolé. Ce dernier point devra être rapidement vérifié, soit au moyen d'une enquête sérologique conduite à partir d'élevages de la région Bretagne puis d'autres régions, soit par des essais d'isolement et de caractérisation du virus dans des cas cliniques.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier MM. Y. MORIN, L. LE COQ, E. QUINTIN, G. JARNET et J.H. PRIGENT, pour leur excellente collaboration technique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] COOK (J.K.A.). — Isolation of a new serotype of infectious bronchitis like virus from chickens in England. *The Veterinary Record*, 1983, 112, 104-105.
 - [2] DAVALAAR (F.G.), KOUWENHOVEN (B), BURGER (A.G.). — Recherche de l'influence des souches variantes du virus de la bronchite infectieuse (I.B.V.) sur le poulet de chair et la production d'œufs. VIIIth International Congress of the W.P.S.A. Oslo, Norway, July 1-3 1981 (Proceedings).
 - [3] JONES (R.C.). — The isolation and some biological properties of a variant avian infectious bronchitis virus. *The Veterinary Record*, 1976, 98, 278-279.
 - [4] MEULEMANS (G.), VINDEVOGEL (H.), BURTONBOY (G.), DEYLGAT (A.), HALEN (P.). — Isolement d'un nouveau sérotype du virus de la bronchite infectieuse aviaire en Belgique. *Ann. Méd. Vét.*, 1976, 120, 199-204.
 - [5] PICAULT (J.P.), BENNEJEAN (G.), GUITTET (Michèle), LE JEUNE (M.), LE COQ (H.), LE BACHELIER (Annie). — Enquête sérologique concernant les virus « variants » de la bronchite infectieuse aviaire (B.I.) en France. Actes et Abstracts du XVII^e Congrès Mondial d'Aviculture organisé par la W.P.S.A. à Helsinki, 1984, p. 527-529.
 - [6] PICAULT (J.P.). — Bronchite infectieuse : le pouvoir pathogène des virus « variants » reste à démontrer. *Le Courrier Avicole*, 1984, 841, 33-37.
-