

Contribution de la méthode ELISA au diagnostic sérologique de la chlamydie aviaire

Application au cas de la rhinotrachéite infectieuse de la dinde en Bretagne

par M. P. DURAND*, C. LIMOUZIN*, E. SCHRICKE**
et J. F. DAYON**

RÉSUMÉ

Un diagnostic de chlamydie ornithose ayant été posé lors d'une épidémie de rhinotrachéite infectieuse de la dinde, nous avons mis au point la technique ELISA dans le sérodiagnostic de la chlamydie de la dinde ; celle-ci se révèle pratiquement la seule méthode utilisable pour cette espèce, dans le cas de la chlamydie. L'application de la méthode à une enquête sérologique sur troupeaux atteints et indemnes de rhinotrachéite infectieuse, montre que cette affection, d'étiologie encore obscure, ne relève très probablement pas d'une infection chlamydienne.

Mots clés : Chlamydie - Dindes - ELISA - Sérologie rhinotrachéite infectieuse - Fixation du complément - Newcastle.

SUMMARY

A diagnosis of chlamydiosis ornithosis was given to an outbreak of infectious Rhinotracheitis in Turkey Breeds. To certify such a statement, use of ELISA serological test for infectious diseases of the turkey has been perfected. ELISA appears to be the only suitable test in chlamydiosis of that species. Thus, it has been applied in a general investigation among flocks free or not from clinical infectious rhinotracheitis: results show that the disease — despite an undetermined aetiology — is unlikely due to an infection by chlamydie.

Key words: Chlamydia - Turkey - ELISA - Infectious rhinotracheitis serology - Complement fixation - Newcastle.

* Laboratoire Roger Bellon, Laboratoire La Croisette, B.P. 31 - 37190 Azay-Le-Rideau.

** Etablissement Guyomarch - 56000 Vannes.

*** Antigène Chlamydie, Laboratoire Roger Bellon.

LE PROBLEME ETIOLOGIQUE

Au cours de l'été 1981, en Bretagne, les élevages industriels de dindonneaux ont pour la plupart été victimes d'une rhinotrachéite enzootique dont la progression et l'expression clinique ont été décrites par ANDRAL et LOUZIS [1].

Ces mêmes auteurs isolaient sur sujets atteints une chlamydie et obtenaient, en fixation directe du complément à l'aide d'un antigène du commerce vis-à-vis de l'ornithose [1] des cinétiques d'anticorps nettement en faveur d'une chlamydiose.

Cependant, DURAND ne constatait que des résultats négatifs ou douteux avec un autre antigène préparé à partir d'une chlamydie ovine***, et parvenait d'autre part à identifier un paramyxovirus de type I, peu pathogène [1].

Afin de préciser l'étiologie de la rhinotrachéite infectieuse, il était donc très souhaitable de rechercher une technique de diagnostic sérologique de la chlamydiose à la fois fiable et facile à mettre en œuvre.

En effet, le risque important d'une contamination humaine imposait, dans l'hypothèse d'une chlamydiose, des mesures de protection particulièrement sévères, du moins pour les éleveurs et employés d'abattoir [3]. D'autre part, proclamer officiellement l'existence de la chlamydiose signifiait pour les producteurs bretons le risque d'une interruption des expéditions hors-frontières, et de ce fait un préjudice économique considérable.

A la demande de plusieurs organisations bretonnes, nous nous sommes efforcés de vérifier s'il existait ou non une relation directe entre la chlamydiose et la rhinotrachéite de la dinde bretonne.

Après la mise au point de la méthode ELISA dans le diagnostic de la chlamydiose pour l'espèce considérée, nous avons voulu rechercher d'éventuelles disparités sérologiques entre les parquets de dindes atteints de rhinotrachéite, les parquets cliniquement indemnes, et ceux de régions épargnées par la maladie.

Le compte rendu de ces derniers travaux fait l'objet essentiel de la présente communication.

JUSTIFICATION DU CHOIX DE LA METHODE ELISA

Le diagnostic sérologique des chlamydioses aviaires a fait appel à toutes les méthodes classiquement décrites, avec plus ou moins de succès.

Le choix de l'antigène a tout d'abord son importance, et cela a été précédemment évoqué.

La microagglutination, l'immunoprécipitation en gélose, l'immuno-fluorescence directe ou indirecte, la neutralisation de l'effet cytopathogène ont été, à travers divers sérums d'oiseaux domestiques, étudiées par différents chercheurs [5, 2, 9, 10, 6, 8].

La fixation du complément est la méthode la plus fréquemment adoptée. Selon la technique classique de Kolmer, elle donne des résultats convenables et reproductibles avec des sérums de pigeons, mais discutables pour le canard et le dindon. Le sérum de dinde ne fixe pas directement le complément, c'est pourquoi divers artifices ont été proposés, par adjonction de sérum de pigeon, cobaye ou lapin ; le test d'inhibition de la fixation du complément proposé par KARRER [7] en est un exemple.

Finalement, si certaines des méthodes ci-dessus énoncées ont pu donner des résultats satisfaisants en chlamydie chez le pigeon ou le canard, il n'en est pas de même en chlamydie de la dinde : aucune n'offre des garanties suffisantes de simplicité et de fiabilité.

EVANS [4] *et al.* ayant fait part des bons résultats d'une application du test ELISA pour la chlamydie du canard, nous avons donc orienté nos recherches sur l'adaptation de ce test à la chlamydie de la dinde.

MISE AU POINT DE LA METHODE ELISA

Avant de confirmer l'adéquation de la méthode ELISA au diagnostic de la chlamydie de la dinde, deux étapes préalables ont dû être franchies, sous peine de nullité de l'opération :

— la démonstration de ses possibilités dans le diagnostic de la chlamydie ;

— la révélation de son aptitude au diagnostic de maladies infectieuses spécifiques au dindon autres que la chlamydie.

De tels objectifs ne pouvaient être atteints que si la valeur de la méthode ELISA était rigoureusement comparée à des épreuves de diagnostic réputées efficaces dans les deux directions énoncées.

Les matériels et méthodes ayant permis l'expression des résultats qui seront exposés sont d'une utilisation courante en laboratoire.

En particulier, pour l'exécution de la technique ELISA, les plaques, le lecteur et le spectrophotomètre appartiennent à des modèles très répandus. L'antigène chlamydien utilisé est soumis avant titrage à plusieurs séquences de purification et de lyse, les sérums anti IGG

réactifs (1) obtenus sur lapins ou sur cobayes ont de même subi plusieurs traitements physico-chimiques avant d'être couplés à la peroxydase. Les sérums d'animaux soumis à l'analyse sont préalablement dilués au 1/100^e ; l'ajustement du sérum négatif de référence s'effectuant à la D.O. 300 du spectrophotomètre, et les valeurs supérieures ou égales à 500 étant arbitrairement déclarées positives.

● *Intérêt de la méthode ELISA dans le dépistage des anticorps chlamydiens :*

5 cobayes et 5 lapins reconnus indemnes de chlamydie ont été vaccinés contre cette maladie (2). Leurs sérums individuels ont été récoltés le jour de l'injection vaccinale, puis 3 et 6 semaines plus tard.

Leurs titres sériques en ELISA ont été comparés à ceux obtenus en fixation du complément classique, du type Kolmer à froid.

Regroupées selon un système additionnel de croix, les valeurs obtenues en ELISA se superposent dans leur ensemble aux indications chiffrées de la fixation du complément (cf tab. p. 357).

Le diagnostic d'une chlamydie par application de la technique ELISA est donc tout à fait réalisable.

● *Aptitude de la méthode ELISA à révéler des infections spécifiques du dindon :*

L'opération a consisté à vérifier si, chez la dinde, et vis-à-vis des anticorps de la maladie de Newcastle, une corrélation existait entre la réponse au test ELISA et celle au test de l'inhibition de l'hémagglutination (I.H.A.).

Dans ce but ont été examinés des sérums de dindes provenant, d'une part de 8 élevages indemnes, et d'autre part de 25 élevages ayant été vaccinés avec deux vaccins inactivés différents, injectables en excipient huileux. En outre, des sérums d'un élevage atteint de maladie de Newcastle, conservés au congélateur depuis plusieurs années, ont participé à la confrontation (cf. tab. : Résultats, p. 358).

— les sérums d'élevages sains sont négatifs en I.H.A. comme en ELISA ;

— pour ceux de sujets vaccinés ou malades, l'intensité de la réaction ELISA est fonction du taux de l'I.H.A. ;

— quelques animaux vaccinés sont négatifs en I.H.A. alors que positifs en ELISA ;

(1) Sérums IGG lapin et cobaye (Cappel-Florio) sérum antiIGG dinde préparé dans notre laboratoire.

(2) Rikevac ND, vaccin huileux inactivé, Laboratoire Roger Bellon.

	Fixation complément (3)					ELISA				
<i>Lapins :</i>										
To (vaccination)	0	0	0	0	9	—	—	—	—	—
To + 3 semaines	729	243	0	81	81	+++	+++	++	+++	+++
To + 6 semaines	2187	6561	243	243	243	+++	+++	+++	+++	/
<i>Cobayes :</i>										
To (vaccination)	0	0	0	0	0	0	—	—	—	—
To + 3 semaines	243	81	81	81	81	27	+++	+++	+++	+++
To + 6 semaines	6461	2187	2187	6561	243	/	+++	+++	+++	+++

(3) Titres exprimés en dilutions sériques inhilant totalement l'hémolyse.

RESULTATS

	Titre I.H.A.	ELISA
1° <i>Elevages sains</i>	0	—
	0	—
	0	—
	0	—
	0	—
	0	—
	0	—
	0	—
2° <i>Elevages vaccinés</i>	320	+
	320	+
Vaccin 1 sans rappel	0	—
Vaccin 2 sans rappel	640	+
	640	+
	0	+
Vaccin 2 avec rappel	40	+
	40	+
	0	—
	0	++
	40	+
	10	+
	1280	++
	40	+
1280	++	
3° <i>Elevage infecté Newcastle</i> <i>(sérum de notre collection)</i>	0	+
	640	++
	320	+
	0	—
	640	++
	640	++

— de même, dans un troupeau infecté, l'I.H.A. peut laisser échapper des animaux, probablement infectés, dont on retrouve la positivité par le test ELISA.

Par conséquent, la méthode ELISA peut parfaitement déceler des infections spécifiques de la dinde.

● *Adéquation de la méthode ELISA au diagnostic de la chlamydiae de la dinde :*

Des dindonneaux âgés de 3 semaines ont été répartis en deux locaux, sous air filtré, indépendants.

Local A : sujets vaccinés.

Lot 1 : vaccin inactivé huileux ornithose expérimental produit sur œuf [1].

Lot 2 : vaccin inactivé huileux commercial contre l'avortement chlamydien de la brebis (4) [2].

Lot 3 : vaccin placebo [3].

Local B : sujets infectés.

Lot 4 : infectés souche ornithose par voie intranasale [4].

Lot 5 : infectés souche chlamydie ovine par la même voie [5].

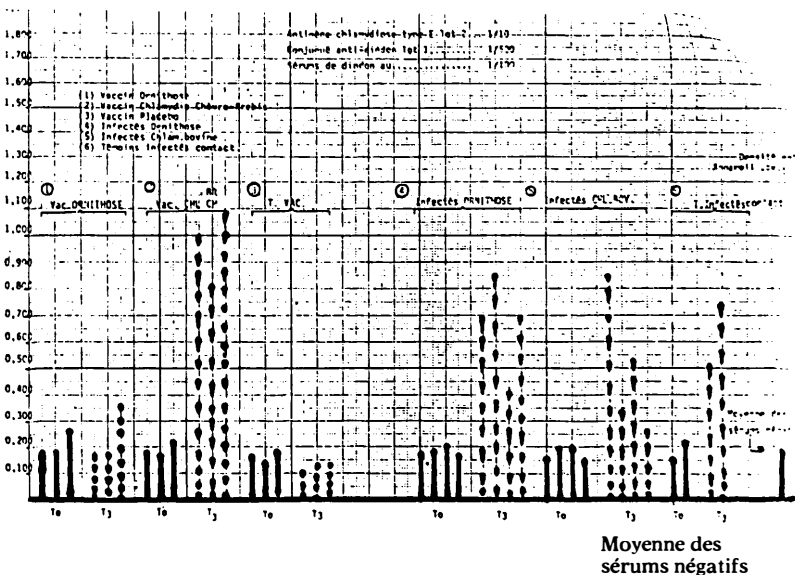
Lot 6 : témoins-contact [6].

Le graphique suivant révèle clairement que la méthode ELISA est capable de distinguer les sujets infectés ou vaccinés des animaux sains (5).

Si l'on compare les résultats de la méthode ELISA avec ceux d'autres réactions sérologiques, on observe que : (cf tabl. ci-dessous) :

— la fixation du complément type Kolmer classique ne procure que quelques rares taux vraiment significatifs à 3 semaines (au 1/27^e) et que la sérologie perd toute signification en moins de 6 semaines ;

ELISA chlamydie dindes (animaux infectés et vaccinés)



(4) Rikevac ND.

(5) P.S. faites à To et To + 3 semaines.

Catégories d'animaux	Sérums positifs					
	To		3 semaines		6 semaines	
	F.C.	ELISA	F.C.	ELISA	F.C.	ELISA
Vaccinés Lots 2 et 3	0/6	0/6	0/5	4/6	ND	ND
Témoins placebo Lot 1	0/3	0/3	0/3	0/3	ND	ND
Infectés Lots 4 et 5	0/8	0/8	2/8	7/8	0/8	7/8
Témoins-contact Lot 6	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	2/2

— la microagglutination en tube capillaire, l'immunodiffusion radiale, et la réaction indirecte de fixation du complément de Karrer se sont également montrées d'une bien moindre sensibilité que la méthode ELISA.

Par conséquent, la méthode ELISA dans le diagnostic de la chlamydie du dindon procure les indications les plus cohérentes, les plus nettes et les plus fiables.

APPLICATION AU DIAGNOSTIC DE LA RHINOTRACHEITE INFECTIEUSE DE LA DINDE EN BRETAGNE (R.T.I.D.)

Compte tenu du doute évoqué au début de cet article, l'enquête sérologique au sein de divers parquets a été menée par comparaison entre l'I.H.A. vis-à-vis du paramyxovirus de type I et la chlamydie, à l'exception des parquets ayant reçu à titre expérimental un vaccin huileux inactivé Newcastle (6).

Deux remarques s'imposent, qu'il s'agisse d'élevages atteints ou indemnes :

— le taux des séropositifs vis-à-vis de la chlamydie varie selon les exploitations dans des proportions d'amplitude similaire (5 à 76 % contre 10 à 60 %). Cette très faible différence en faveur des troupeaux

(6) Les sérums de ces élevages ont été prélevés au cours du 2^e semestre 1981.

ELEVAGES ATTEINTS DE R.T.I.D.

	ELISA Chlamydirose	I.H.A. Newcastle
Nombre d'exploitations concernées	31	22
Nombre d'exploitations séro-positives	10	13
Nombre de sérums expertisés	531	356
Nombre de sérums positifs	56 (10,5 %)	96 (27,2 %)

ELEVAGES INDEMNES DE R.T.I.D.

	ELISA Chlamydirose	I.M.A. Newcastle
Nombre d'exploitations concernées	8	8
Nombre d'exploitations séro-positives	4	3
Nombre de sérums expertisés	125	125
Nombre de sérums positifs	7 (5,6 %)	11 (8,4 %)

atteints peut être due à une surinfection chlamydienne après une atteinte virale ;

— les titres obtenus en I.H.A. sont bas, indicateurs d'un reliquat d'immunité passive ou du passage d'un paramyxovirus.1 vaccinal à pouvoir pathogène nul.

CONCLUSIONS

La méthode ELISA et l'inhibition de l'hémagglutination utilisées comme moyens de détection associés de l'agent infectieux responsable de la rhinotrachéite de la dinde de Bretagne n'incriminent pas davantage une chlamydie que le paramyxovirus de type I.

En effet, vis-à-vis de la chlamydirose, la réponse est approximativement négative pour 70 % des parquets cliniquement atteints, et positive seulement pour 10 % des individus contaminés. D'autre part, envers le paramyxovirus I, près de 75 % des sujets de troupeaux infec-

tés par la R.T.I.D. sont néronégatifs, les positifs l'étant pour des taux faibles.

La sérologie et la clinique s'accordent pour éliminer l'éventualité d'une chlamydie authentique de la dinde, maladie à juste titre redoutée des éleveurs du continent nord-américain : « *Chlamydia psittaci* » doit être considérée comme responsable de complications secondaires au même titre que « *Escherichia coli* » ou « *Eikenella corrodens* ».

En rappelant que la concentration et la densité des populations animales sont des facteurs favorisant dans l'apparition de la maladie, il reste à caractériser l'agent primitif de la rhinotrachéite infectieuse de la dinde.

Il n'est resté pas moins que la méthode ELISA s'est révélée être un outil précieux dans le diagnostic de maladies aviaires requérant habituellement la fixation du complément. D'autre part, elle a permis d'écarter la menace économique et sanitaire d'une anthroponose redoutable, la chlamydie de la dinde.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANDRAL (B.) et LOUZIS (C.). — *Bull. des Lab. Vét. Fr.*, 1982, 7, 33-43.
- [2] BARRON (A. L.), CASTLE (P. G.), PAUL (B.) and PAGE (L. A.). — Detection of chlamydial antibodies in animal sera by double diffusion in gel. *Applied Microbiology*, 1972, 23, 4, 770-774.
- [3] BELL (J. C.). — Ornithosis in poultry workers (and ducks). *Animal disease report*, 1980, 3, 1-3.
- [4] EVANS (R.), CHALMERS (W.), WOOLCOCK (P.), FARMER (H.) and TAYLOR-ROBINSON (D.). — *Avian Pathol.*, 1983, 12, 117-123.
- [5] GOROVITS (E. S.) and TIMASHEVA (O. A.). — Immunofluorescent microagglutination test for ornithosis. II. Diagnostic value. *Zhurnal Mikrobiologii i Immunologii*, 1981, 9, 67-70.
- [6] HANON (N.) and COOKE (K. O.). — Fluorescent cell-counting neutralization test for psittacosis. *J. Bact.*, 1965, 89, 1465-1571.
- [7] KARRER (H.), MEYER (K.) and EDDIE (B.). — *Journ. of infect. dis.*, 1950, 87, 13-23.
- [8] MEYER (K. F.). — Demonstration of host-species-specific antigens in chlamydia psittaci by the plaque-reduction test in L-cell tissue cultures. Preliminary observations. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 1970, 31, 1-10.
- [9] ROSS (M. R.) and BORMAN (E. K.). — Direct and indirect fluorescent-antibody techniques for the psittacosis-lymphogranuloma venereum-trachoma group of agents. *J. Bact.*, 1963, 85, 851-858.
- [10] TOKAREVICH (K. N.), KRASNIK (F. I.) and GOLDIN (R. B.). — The use of fluorescent antibody technique in serological of ornithosis. *Acta Virologica*, Prague, 1963, 7, 478.