

**ENTERITE HEMORRAGIQUE D'HIVER EN FRANCE :  
CONFIRMATION DE SON ASSOCIATION  
AVEC UN CORONAVIRUS PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE  
ET PAR CULTURE SUR CELLULES HRT 18**

CARNERO (R.)\*, COSTES (C.)\*, SCHELCHER (F.)\*\*, VALARCHER (J.-F.)\*\*,  
MOULIGNIE (M.)\*\*, ESPINASSE (J.)\*\*

\* Unité de Virologie, LPB/CNEVA

\*\* Département de Physiopathologie Animale  
Ecole Nationale Vétérinaire, 23 chemin des Capelles, 31076 Toulouse Cedex

## INTRODUCTION

En 1981, au cours d'une enquête restreinte dans l'Est de la France, nous avons montré à l'aide de la microscopie électronique que l'entérite hémorragique d'hiver des bovins (EHH), winter dysentery des anglo-saxons, était associée à la présence dans les fèces de particules virales du type coronavirus <sup>1</sup>. Par la suite et toujours dans la même zone géographique nous avons confirmé que les variations thermiques en période d'hiver étaient un élément majeur de régulation de l'expression clinique de cette maladie. Nous avons également évalué les effets de telles zooties sur la production laitière pouvant aller jusqu'à une chute de production de 30 % sur une période de 4 semaines en moyenne <sup>2</sup>. Le rôle du coronavirus dans l'EHH est toujours discuté. L'hypothèse la plus récente considère cette maladie comme un syndrome dans lequel d'autres virus pourraient intervenir seuls (toronavirus) <sup>3</sup> ou associés au coronavirus (virus de la maladie des muqueuses) <sup>4</sup>. La recherche de la participation du coronavirus dans l'EHH a été menée selon deux stratégies parfois associées par les mêmes auteurs :

- mise en évidence dans les matières fécales par microscopie électronique, immunoelectromicroscopie, ELISA, culture <sup>5, 6, 7, 8</sup>,

- démonstration d'une séroconversion par différentes méthodes sérologiques : inhibition de l'agglutination de particules de latex, ELISA, séroneutralisation <sup>7, 4, 9</sup>.

Dans ce qui suit nous rapportons les résultats obtenus en couplant la microscopie électronique à la culture dans un échantillonnage de matières fécales issues de 8 troupeaux situés dans 6 départements différents français au cours d'épisodes cliniques d'EHH pendant l'hiver 1990-1991.

## MATERIEL ET METHODES

### MATIERES FECALES

- prélèvement dans le rectum chez des malades, transport à + 4°C, conservation par congélation à -20°C,  
- au moment de leur utilisation pour la microscopie électronique ou la culture : décongélation à + 4°C, dilution dans du PBS, homogénéisation, filtration clarifiante, centrifugation à 3500 t/mn 2 fois pendant 15 mn. Après contact avec une suspension d'enrofloxacin, centrifugation à 6500 t/mn, filtration stérilisante du surnageant qui constituera le matériel de travail (MT) conservé par la suite à -20°C.

### MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

- utilisation de grilles en cuivre d'une porosité de 100 mèches recouvertes d'une membrane de parlodium et carbonnées, appliquées directement sur MT puis soumises à une coloration négative (acétate d'uranyl - acide phosphotungstique),

- l'interprétation suivante du résultat de l'examen d'un échantillon a été adoptée :

- absence de formes virales
- + plus de 10 images de coronavirus,
- ++ images de coronavirus fréquentes,
- +++ images de coronavirus très fréquentes.

## CULTURES

- cellules HRT 18 entretenues en croissance en RPMI additionné de 15 % de sérum de veau et d'entofloxacine. Après inoculation de MT la concentration en sérum de veau est ramenée à 2 %.

- tout échantillon ne provoquant aucun effet cytopathogène (ECP) à l'issue de trois passages est considéré comme négatif. Au sixième passage les échantillons ne produisant plus d'ECP sont abandonnés. Au neuvième passage les inoculum continuant à provoquer un ECP sont considérés comme des isolats et soumis à identification.

- l'identification de l'isolat est basée :

. sur l'observation en microscopie électronique des surnageants après coloration négative,

. sur les caractéristiques chronologiques de l'ECP après coloration de Giemsa et immunofluorescence indirecte (IFI) : augmentation du volume des cellules, vacuolisation du cytoplasme, rétraction cellulaire autour du noyau, détachement du tapis cellulaire et/ou formation d'amas analogues à des syncytia,

. sur la séronéutralisation (SN) de l'ECP par un antiserum immunoséparé préparé sur lapin avec un isolat de coronavirus de veau (Souche HANSEN, Smith Kline Beecham, Lincoln, Nebraska, USA)

. sur l'IFI avec le même sérum de référence et un sérum antimmunoglobulines G de lapin conjugué à l'isothiocyanate de fluoresceine .

## RESULTATS

### MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Les résultats sont rassemblés dans le tableau I.

59 prélèvements issus de bovins malades ont été examinés. Ils provenaient de 8 élevages situés dans 6 départements de 6 régions françaises. 32 soit 54 % ont révélé la présence de coronavirus à des concentrations variables : + 16 (50 %), ++ 12 (37,50 %), +++ 4 (12,5 %). Aucune autre image virale pouvant évoquer un virus différent du coronavirus n'a été observée.

Tableau I : Résultats des examens de fèces en microscopie électronique

Région	Départ.	Elevage	Echantillon	Résultat	Région	Départ.	Elevage	Echantillon	Résultat
LANGUEDOC ROUSSILLON	LOZERE	A	4742	+	AUVERGNE	CANTAL	E	778	+
			4747	++				790	-
			0407	-				791	+
			4743	-				775	-
			4748	++				179	-
			4746	-				380	-
			8211	-					
			2557	-					
			4055	-					
			1412	++					
RHONE ALPES	ARDECHE	B	1029	+	LIMOUSIN	CORREZE	F	117E	+++
			0063	+				120	+
			1414	++				905	+
			4922	+				4802	+
			907	-				139	++
								514	+++
								979	-
								995	-
								307	-
								580	-
	ARDECHE	C	759	-	MIDI PYRENEES	AVEYRON	G	5418	+
			3288	++					
			000	-				5421	+++
			2615	++				5419	-
			6975	++				5420	-
			4779	-				5422	-
			VEAU	+++				5179	-
			0656	-				5416	-
								5417	-
								BA	++
AUVERGNE	CANTAL	D	2722	+	AQUITAINE	GIRONDE	H	C	++
			0236	-				B	+
			5154	-				D	+
			4665	+					
			9795	++				117	+
			0070	+					
			757	++					

## CULTURES

Les résultats sont rassemblés dans le tableau II.

Les 6 isolats sont tous issus d'échantillons ++ ou +++ en microscopie électronique et leur dose infectieuse en culture de tissus (DICT 50) était de l'ordre de  $10^5$ /ml au 6ème passage.

Tableau II : Résultats des cultures sur lignée HRT pratiquées à partir de 59 échantillons de matières fécales

Nombre de passages	Nombre d'échantillons provoquant un ECP
< 3	28
3à6	17
6à9	11
≥ 9	6

## DISCUSSION

Ces résultats confirment ceux précédemment publiés en France et contribuent à valider l'association EHH-coronavirus : plus de la moitié des échantillons de fèces de bovins diarrhéiques contenait des coronavirus, dans tous les élevages deux au moins des échantillons sont positifs et ceci dans diverses régions géographiques. Ils sont également en accord avec ceux d'autres auteurs dans différents pays qui en outre ont pour certains constaté la plus faible fréquence du virus dans les matières fécales des animaux sains contemporains <sup>10</sup>.

L'isolement et l'identification du coronavirus à partir des matières fécales de bovins atteints d'EHH a été beaucoup plus rarement réalisée <sup>8, 11, 12, 13</sup> en raison probablement des exigences culturelles du coronavirus de l'EHH. Celui-ci ne se développe pas en effet sur des lignées cellulaires issues de bovins (MDBK, BT, etc...) ce qui le distingue en particulier du coronavirus du veau.

Contrairement aux observations de BENFIELD et SAIF <sup>8</sup>, les 6 souches ont été isolées sans le relais de l'inoculation à des veaux gnotobiotiques et à l'action d'enzymes protéolytiques. L'ECP que nous avons retenu pour caractériser le coronavirus de l'EHH est par contre comparable à celui décrit par ces auteurs. De la même façon la localisation de la fluorescence au cytoplasme des cellules confirme l'identification d'un coronavirus face à un sérum de référence.

Aucune des méthodes de diagnostic du coronavirus que nous avons utilisé n'a permis d'envisager une différence antigénique entre nos 6 isolats. Les techniques immunologiques utilisées n'autorisent pas non plus à conclure à l'identité antigénique entre les coronavirus isolés d'EHH et celui de la diarrhée des veaux, une des nombreuses questions relative à l'EHH à laquelle il n'a pas encore été répondu <sup>14</sup>.

En bilan, en France comme dans d'autres pays, l'EHH apparaît donc régulièrement associée à la présence dans les matières fécales des bovins malades de particules virales de type coronavirus visualisées en microscopie électronique. L'isolement sur cellules HRT de 18 souches virales de coronavirus est une preuve supplémentaire du rôle d'un d'un tel agent dans ce syndrome <sup>10</sup>.

## REMERCIEMENTS

Pour leur aide à l'isolement et à l'identification des isolats de coronavirus, nous tenons à remercier les personnes suivantes :

Madame FINANCE, Laboratoire de Microbiologie Appliquée et Industrielle, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 54001 Nancy cedex,

Madame A.M. MOUREU, Laboratoire Associé INRA de Physiopathologie des Maladies Respiratoires des Ruminants, Ecole Nationale Vétérinaire, 31076 Toulouse cedex,

Monsieur A. MOUSSA, Laboratoire de Pathologie Bovine, CNEVA, 69342 Lyon cedex 07,

Monsieur J.F. VAUTHEROT, Laboratoire de Virologie et Immunologie Moléculaire, INRA, 78352 Jouy en Josas

## SUMMARY

During the 1990-1991 winter, 59 samples of faeces were made in cattle suffering from winter dysentery. These animals were coming from 8 different farms located in 6 different french departments. Each sample has been studied carefully under the electron microscope and put for culture on HRT 18 cells. 32 samples (54%) have shown coronavirus-like viral particles under the microscope. Each group of animals coming from one farm having at least 2 samples found (+). 6 isolates have been kept from the cells culture and studies after the 9th passage. In these 6 isolates coronavirus were identified with the help of the electron microscope, their cytopathogenic effect and its seroneutralization, and an direct immunofluorescence method using an anticoronavirus serum prepared on rabbits with a calf diarrhea coronavirus vaccinal strain. These results are in accordance with a participation of this type of virus in the winter dysentery syndrome.

## RESUME

Au cours de l'hiver 1990-1991, 59 échantillons de fèces ont été collectés chez des bovins manifestant des symptômes d'entérite hémorragique d'hiver (EHH). Ces animaux vivaient dans 8 élevages situés dans 6 départements différents. Chaque échantillon a été examiné au microscope électronique et mis en culture sur cellules HRT 18. En microscopie électronique 32 échantillons (54 %) ont révélé la présence de particules virales du type coronavirus avec au moins deux échantillons positifs par élevage. En culture de cellules 6 isolats ont été conservés et étudiés après le neuvième passage. A l'aide de la microscopie électronique, de leur effet cytopathogène, de la séroneutralisation de celui-ci et de l'immunofluorescence indirecte avec un sérum anticoronavirus, ces 6 isolats peuvent être identifiés à des coronavirus. Ces résultats sont en faveur de la participation de ce type de virus dans l'EHH.

## RESUMEN

Durante el invierno 1990-1991, 59 muestra de heces fueron recogidas sobre bovinos que manifestaban sintomas clinicos de enteritis hemorragica invernal (EHI). Estos animales habitaban en 8 establos situados en 6 provincias diferentes. Cada muestra ha sido examinada al microscopio electronico e inoculada sobre celulas HRT18. En microscopia electronica 32 muestras (54 %) han revelado la presencia de particulas virales tipo coronavirus, al menos sobre dos muestras por establo. En cultivo celular 6 muestras han sido conservados y estudiadas despues del noveno pase. Estas 6 cepas han sido identificadas como coronavirus a partir de los resultados obtenidos en microscopia electronica, por su efecto citopatico en el cultivo, por sero-neutralization de este efecto citopatico y por inmunofluorescencia indirecte frente a un suero preparado en conejo a partir de una cepa vacinal de coronavirus de la diarrea del ternero. El conjunto de resultados apoyan la participation de este tipo de virus en la etiopatogenia de la EHI.

## REFERENCES

1. ESPINASSE, J., VISO, M., LAVAL, A., SAVEY, M., LE LAYEC, C., BLOT, J.P., L'HARIDON, J., COHEN, J., Winter Dysentery : a coronavirus-like agent in the feces of beef and dairy cattle with diarrhoea. *Vet. Rec.*, 110 : 385. 1981.
2. JACTEL, B., ESPINASSE J., VISO, M., VALIERGUES, H., An epidemiological study of winter dysentery in fifteen herds in France; *Vet. Res. Communication*, 14 : 367-379. 1990.
3. KOOPMANS, M., VAN WUIJKHUISE-SJOUKE, L., SCHUKKEN, Y.H., CREMERS, H., HORZINEK, M.C., Association of diarrhoea in cattle with torovirus infection on farms. *Am. J. Vet. Res.*, 52 (11) : 1769-1773. 1991.
4. ALENUS, S., NISKANEN, R., JUNTTI, N., LARSSON, B., Bovine coronavirus an the causative agent of winter dysentery : Serological evidence. 32 : 163-170. 1991.
5. DYRHAM, P.J.K., HASSARD, L.E., ARMSTRONG, K.R., NAYLOR, J.M., Coronavirus-associated diarrhoea (winter dysentery) in adult cattle. *Can. Vet. J.* 30 : 825-827. 1989.
6. SAIF, L.J., REDMAN, D.R., BROCK, K.V., KOHLER, E.M., HECKERT, R.A., Winter dysentery in adult dairy cattle : detection of coronavirus in the faeces. *Vet. Rec.* 123 : 300-301. 1988.
7. FLEETWOOD, A.J., EDWARDS, S., FOXELL, P.W., THORMS, C.J., Winter dysentery in adult dairy cattle. *Vet. Rec.* 125 : 553-554. 1984.
8. BENFIELD, B.A., SAIF, L.J., Cell culture propagation of a coronavirus isolated from cow with winter dysentery. *J. Clin. Microbiol.* 26 : 1454-1457. 1990.
9. SAIF, L.J., BROCK, K.U., REDMAN, D.R., KOLHER, E.M., Winter dysentery in dairy herds : electron microscopic and analogical evidence for an association with coronavirus infection. *Vet. Rec.* 128 : 447-449. 1991.
10. SAIF, L.J., A review of evidence implicating bovin coronavirus in the etiology of winter dysentery in cows : a enigma resolved ? *Cornell Vet.* 80 (4) : 303-311. 1990.
11. AKASHI, H., INABA, Y.,

MIURA, Y., TOKKUHISA, S., SATO, K., Properties of a coronavirus isolated from a cow with epizootic diarrhoea. *Vet. Microbiol.* 5 : 265-276. 1980. 12. BROES, A., OPDENBOSCH, E., WELLEMANS, G., Isolement d'un coronavirus chez des bovins atteints d'entérite hémorragiques hivernale (Winter dysentery) en Belgique. *Ann. Med. Vet.* 128 : 299-303. 1984. 13. LAVAZZA, A., CORDIOLI, P., SACCHI, C., BELLETTI, G.L., MASSI, P., NIGRELLI, A., Isolamento id identificazione di coronavirus da casi di diarrea invernale dei bovine. *Atti Soc. Ital. Buiatria*, 22 : 149-155. 1990. 14. VAN KRUININGEN, H.J., CASTELLANO, V.P., TORRES, A., SHARPEE, R.L., Serologic evidence of coronavirus infection in New York and New England dairy cattle with winter dysentery. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3 : 293-296. 1991.