

Short Communication

*Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen*

Isolierung von Coronaviren in der Zellkultur aus Nasentupferproben atemwegskranker Kälber in der Bundesrepublik Deutschland

C. JIMÉNEZ¹, W. HERBST, U. BIERMANN, J. M. MÜLLER und TH. SCHLIESSER

Adresse der Autoren: Frankfurter Straße 89, D-6300 Gießen

Mit einer Abbildung und einer Tabelle

(Eingegangen am 21. April 1989)

Summary

Isolation in tissue culture of coronavirus from respiratory diseased calves in the FRG

Coronavirus was isolated in HRT-18 tissue culture from nasal swabs of 4 from 15 calves showing respiratory symptoms. The strains showed cytopathic effects and could be identified as coronaviruses of bovine origin by their mouse erythrocyte agglutinating activity as well as serological specific hemagglutination inhibition and electron microscopical methods. This is the first report on the isolation of coronaviruses in tissue culture from the respiratory tract of calves in the FRG.

Key words: Respiratory diseases of calves, coronaviruses, isolation in tissue culture

Einleitung

Über das Vorkommen von Coronaviren als Durchfallerreger beim Kalb liegen seit der ersten Beschreibung (12) zahlreiche Berichte aus der ganzen Welt vor (3, 4, 5, 11). Daneben gibt es seit wenigen Jahren mehrere Hinweise über eine ätiologische Beteiligung bei respiratorischen Erkrankungen des Rindes (1, 14, 15, 16, 20, 22). Aufgrund bisheriger elektronenmikroskopischer (6) und serologischer Untersuchungen (8) ist eine solche Rolle von Coronaviren bei Atemwegsinfektionen auch für die Bundesrepublik Deutschland anzunehmen.

In der vorliegenden Mitteilung berichten wir über die Isolierung von Coronaviren aus Nasentupferproben atemwegskranker Kälber.

¹ Stipendiat des Deutschen Akademischen Austauschdienstes, DAAD, und der Universidad Nacional, UNA, Heredia, Costa Rica.

Material und Methoden

Das Probenmaterial umfaßte 15 Nasentupfer von respiratorisch erkrankten Kälbern aus 8 Herden im Alter von 10 Tagen bis 10 Monaten, die von der Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Zeit von September bis Oktober 1988 zur virologischen Untersuchung eingesandt worden waren.

Die Proben wurden in jeweils 3 ml Eagles Minimal Essential Medium (MEM) suspendiert, niedertourig geklärt und der Überstand auf konfluente 7 Tage alte Zellrasen der HRT-18-Zelllinie² im Vierfachansatz verimpft (10, 21), wobei in 2 Ansätzen das Kulturmedium mit Trypsin (Fa. Difco, Detroit) in einer Konzentration von 5 µg/ml (2) supplementiert wurde. Nach anschließender Bebrütung bei 37 °C wurden die Kulturen in regelmäßigen Abständen mikroskopisch kontrolliert und die Kulturüberstände auf agglutinierende Eigenschaften gegenüber einer 0,5%igen Mäuseerythrozyten-suspension in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) im Mikrotitersystem geprüft. Elektronenmikroskopische Untersuchungen konzentrierter, infektiöser Kulturüberstände erfolgten im Zeiss EM 10 im Negativkontrastverfahren (9).

Als Referenzstämme standen die bovinen Coronavirusstämme 800 und L-9³ zur Verfügung. Eine Immunglobulin-Präparation (13) eines in der Maus hergestellten Antiserums (7) gegen den Stamm 800 diente zur serologischen Charakterisierung der Isolate im Mikrohämagglutinationshemmungstest, wobei das Virus in Anwesenheit einer konstanten Antikörperverdünnung ausstitriert wurde. Eine Titerreduktion um mindestens 2 Verdünnungsstufen galt als ausreichend zur Identifizierung.

Ergebnisse und Diskussion

Von den 15 untersuchten Nasentupferproben respiratorisch erkrankter Kälber ließen sich in 4 Fällen Erreger isolieren, deren zytopathischer Effekt in den HRT-18-Zellkulturen den Beschreibungen anderer Autoren (2, 21) über Coronavirus induzierte Veränderungen

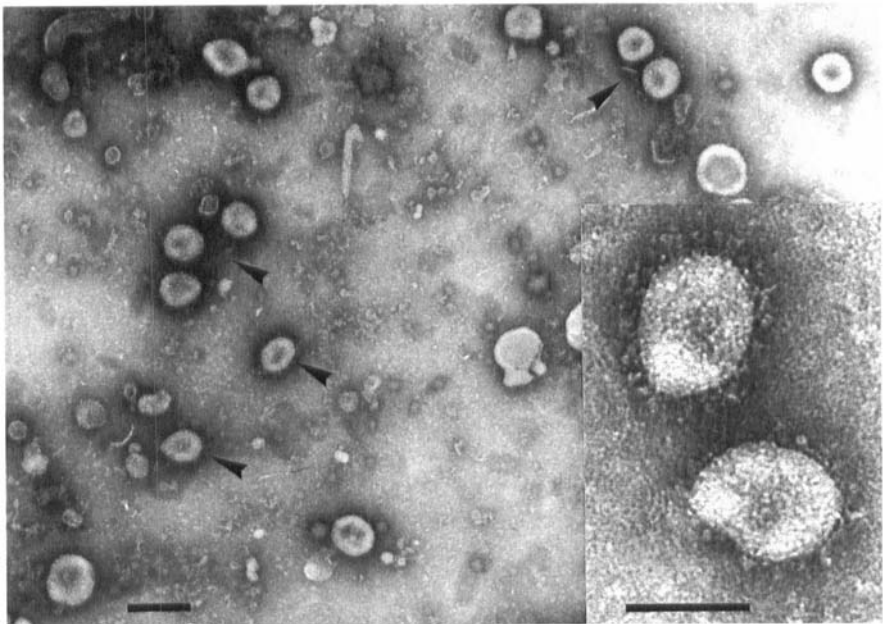


Abb. 1. Coronaviruspartikeln (Pfeile) im konzentrierten Zellkulturüberstand 6 Tage nach Beimpfung mit einer Nasentupferprobe eines Kalbes. Negativkontrastiert mit 2 % Phosphorwolframsäure. Maßstab jeweils gleich 100 nm

² Für die freundliche Überlassung der HRT-18-Zellkulturen danken wir Herrn Dr. VAUTHEROT, INRA, Paris.

³ Für die freundliche Überlassung der Virusstämme danken wir den Behring-Werken, Marburg, und Herrn Prof. Dr. J. STORZ, Baton Rouge (USA).

Tabelle 1. Anamnestische Angaben zu den untersuchten Kälbern

Tagebuch Nr.	Herde	Alter d. Kälber (Wo.)	Klinische Symptome	Virol. Befund
V 4598/88	A	10	Eitriger Nasenausfluß Fieber bis 41 °C	Corona- virus
V 4862/88	B	3	Nasenausfluß, Diarrhoe	Corona- virus
V 4986/88	C	4	Gerötete Nasenschleimhaut Fieber bis 41 °C	Corona- virus
V 4987/88	D	16	Bronchopneumonie	Corona- virus

V 4715/88	E	42	Eitriger Nasenausfluß	negativ
V 4753/88	F	3	Eitriger Nasenausfluß Fieber 40,5 °C, Husten	negativ
V 4813/88	G	1,5	Bronchopneumonie Ent. cath. acuta	negativ
V 5065 bis V 5072/88	H	40-45	Fieber, Nasenausfluß	negativ

in dieser Zelllinie entsprach. Aufgrund ihrer Mäuseerythrozyten agglutinierenden Eigenschaften, die sich durch ein coronavirusspezifisches (Stamm 800) Antiserum hemmen ließen, sowie ihrer charakteristischen Morphologie bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung (Abb. 1) wurden die Isolate V 4598/88, V 4862/88, V 4986/88 und V 4987/88 als Coronaviren bovinen Ursprungs identifiziert. Weitere Virusisolierungsversuche in primären fetalen Kälberlungenzellkulturen, insbesondere im Hinblick auf BVD-, IBR/IPV- und PI-3-Virus verliefen in allen Fällen negativ.

Wie aus der Tabelle 1 ersichtlich wird, stammten die Coronavirusisolate von 4 zu verschiedenen Herden gehörenden Kälbern im Alter von 3 bis 16 Wochen mit deutlichen Anzeichen für das Vorliegen einer respiratorischen, z. T. fieberhaften Erkrankung, wobei in einem Fall gleichzeitig auch eine Diarrhoe vorlag. Über ähnliche Befunde bei coronavirusinfizierten Kälbern wurde auch von verschiedenen Autoren bereits berichtet (1, 14, 15, 17, 18, 19, 20). Bei 11 der anderen untersuchten Tiere, die zwar gleiche klinische Symptome aufwiesen, aber mit Ausnahme von 2 Kälbern 10 Monate alt waren, konnte Coronavirus nicht isoliert werden. Welche ätiologische Bedeutung unseren Befunden demnach zukommt, bleibt in Anbetracht der plurikausalen Ätiologie dieses Krankheitskomplexes beim Rind offen, obwohl eine ursächliche Mitbeteiligung boviner Coronaviren bei respiratorischen Krankheiten des Rindes unter Einbezug aller bisherigen Kenntnisse sehr wahrscheinlich ist.

Zusammenfassung

Von 15 Nasentupferproben respiratorisch erkrankter Kälber, die virologisch in HRT-18-Zellkulturen untersucht wurden, konnten in 4 Fällen zytopathogene Erreger isoliert werden, die aufgrund ihrer Mäuseerythrozyten agglutinierenden Eigenschaften sowie serologischer (Hämagglutinationshemmungstest) und elektronenmikroskopischer Untersuchungen als Coronaviren identifiziert wurden. Dies ist der erste Bericht über die Isolierung von Coronaviren aus dem Respirationstrakt von Rindern in der Bundesrepublik Deutschland.

Literaturverzeichnis

1. CORBEIL, L. B., B. WATT, R. R. CORBEIL, T. G. BETZEN, R. K. BROWNSON, and J. L. MORRIL, 1984: Immunglobulin concentrations in serum and nasal secretions of calves at the onset of pneumonia. *Am. J. Vet. Res.* **45**, 773–778.
2. CYR-COATS, K. ST., and J. STORZ, 1988: Bovine coronavirus-induced cytopathic expression and plaque formation: host cell and virus strain determine trypsin dependence. *Zbl. Vet. Med. B* **35**, 48–56.
3. DEA, S., R. S. ROY, and M. E. BEGIN, 1980: Bovine coronavirus isolation and cultivation in continuous cell lines. *Am. J. Vet. Res.* **41**, 30–38.
4. DIRKSEN, G., and P. A. BACHMANN, 1977: Zum Vorkommen von Rota- und Coronavirus als Ursache von Kälberdiarrhoe in der Bundesrepublik Deutschland. *Berl. Münch. tierärztl. Wschr.* **90**, 475–477.
5. HERBST, W., H. LANGE, H. KRAUSS, C. JIMÉNEZ und T. SCHLIESSER, 1988: Elektronenmikroskopische Untersuchungsergebnisse zur Situation virusbedingter Diarrhoen bei Hund, Katze, Kalb, Schwein und Fohlen im Jahr 1987. *Berl. Münch. tierärztl. Wschr.* **101**, 242–244.
6. HOFMANN, W., und M. ARENS, 1981: Corona-, Rota- und Parvovirusinfektionen beim Kalb aus klinischer Sicht. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* **88**, 316–321.
7. KAYE, H. S., W. B. YARBROUGH, C. J. REED, and A. K. HARRISON, 1977: Antigenic relationship between human coronavirus strain OC-43 and hemagglutinating encephalomyelitis virus strain 67-N of swine: antibody response in human and animal sera. *J. Inf. Dis.* **135**, 201–209.
8. KLATT, E., 1988: Serologisch diagnostische Untersuchungen zur Beteiligung der bovinen Corona-, Parvo-, Rota-, BVD-, Parainfluenzavirus Typ 3- und IBR/IPV-Virusinfektionen bei der Rinderrippe. *Vet. Med. Diss., Gießen.*
9. KRAUSS, H., und M. ARENS, 1981: Die elektronenmikroskopische Untersuchung von Kot- oder Organmaterial als diagnostischer Schnellnachweis bei der Parvovirusinfektion der Hunde. *Prakt. Tierarzt.* **62**, 38–41.
10. Laporte, J., R. L'Haridon, and P. BOBULESCO, 1979: *In vitro* culture of bovine enteric coronavirus (BEC). *INSERM* **90**, 99–102.
11. LU-CHENGPING, 1985: Isolierung, Charakterisierung und Epizootiologie boviner Coronaviren. *Vet. Med. Diss., München.*
12. MEBUS, C. A., E. L. STAIR, M. B. RHODES, and M. J. TWIEHAUS, 1973: Neonatal calf diarrhea: propagation, attenuation, and characteristics of a coronavirus-like agent. *Am. J. Vet. Res.* **34**, 145–150.
13. MCKINNEY, M. M., and A. PARKINSON, 1987: A simple, non-chromatographic procedure to purify immunglobulins from serum and ascites fluid. *J. Imm. Meth.* **96**, 271–278.
14. McNULTY, M. S., D. G. BRYSSON, G. M. ALLAN, and E. F. LOGAN, 1984: Coronavirus infection of the bovine respiratory tract. *Vet. Microbiol.* **9**, 425–434.
15. MÖSTL, K., und F. BÜRKI, 1988: Ursächliche Beteiligung boviner Coronaviren an respiratorischen Krankheitsausbrüchen bei Kälbern und pathogenetisch-immunologische Überlegungen hierzu. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* **95**, 19–22.
16. RAI, R. B., and N. P. SINGH, 1983: Isolation of coronavirus from neonatal calves with pneumoenteritis in India. *Vet. Rec.* **113**, 47.
17. REYNOLDS, D. J., T. G. DEBNEY, G. A. HALL, L. H. THOMAS, and K. R. PARSONS, 1985: Studies on the relationship between coronaviruses from the intestinal and respiratory tracts of calves. *Arch. Virol.* **85**, 71–83.
18. SAIF, L. J., D. R. REDMAN, P. D. MOORHEAD, and K. W. THEIL, 1986: Experimentally induced coronavirus infections in calves: viral replication in the respiratory and intestinal tracts. *Am. J. Vet. Res.* **47**, 1426–1432.
19. SAIF, L. J., 1987: Development of nasal, fecal and serum isotype-specific antibodies in calves challenged with bovine coronavirus or rotavirus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **17**, 425–439.
20. THOMAS, L. H., R. N. GOURLAY, E. J. STOTT, C. J. HOWARD, and J. C. BRIDGER, 1982: A search for new microorganisms in calf pneumonia by the inoculation of gnotobiotic calves. *Res. Vet. Sci.* **33**, 170–182.
21. VAUTHEROT, J. F., 1982: Plaque assay for the titration of bovine enteric coronavirus. *J. Gen. Virol.* **56**, 451–455.
22. WELLEMANS, G., E. VAN OPTENBOSCH, J. OUDEWATER et R. PATTIJN, 1985: Intervention du virus corona dans un cas de pneumonie chez des bovins. *Ann. Méd. Vét.* **129**, 585–587.