HAL
open science

ADAPTATION D'UN ISOLEMENT DE CORONAVIRUS ENTÉRIQUE BOVIN A LA CULTURE CELLULAIRE ET CARACTÉRISATION DE LA SOUCHE OBTENUE

R. L'Haridon, R. Scherrer, J.F. Vautherot, C. La Bonnardière, J. Laporte, J. Cohen

To cite this version:

R. L'Haridon, R. Scherrer, J.F. Vautherot, C. La Bonnardière, J. Laporte, et al.. ADAPTATION D'UN ISOLEMENT DE CORONAVIRUS ENTÉRIQUE BOVIN A LA CULTURE CELLULAIRE ET CARACTÉRISATION DE LA SOUCHE OBTENUE. Annales de Recherches Vétérinaires, 1981, 12 (3), pp.243-251. hal-00901331

HAL Id: hal-00901331

https://hal.science/hal-00901331

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Ann. Rech. Vét., 1981, **12** *(3)*, 243-251.

ADAPTATION D'UN ISOLEMENT DE CORONAVIRUS ENTÉRIQUE BOVIN A LA CULTURE CELLULAIRE ET CARACTÉRISATION DE LA SOUCHE OBTENUE

R. L'HARIDON, R. SCHERRER, J.F. VAUTHEROT, C. LA BONNARDIÈRE, J. LAPORTE et J. COHEN

Institut National de la Recherche Agronomique, Station de Recherches de Virologie et d'Immunologie, 78850 Thiverval-Grignon, France.

Summary

ADAPTATION OF AN ISOLATE OF BOVINE ENTERITIC CORONAVIRUS TO SERIAL GROWTH IN CELL CULTURE AND CHARACTERIZATION OF THE VIRUS. — Coronaviruses are known to behave as pathogens in a variety of animal species. Their multiplication in the differentiated enterocytes of the intestinal tract induces a severe diarrheic syndrome which may lead to death.

To study these viruses and to progress in the development of prophylactic and diagnostic methods, it is essential to succeed in adapting the agents to serial growth in cell culture. In spite of several attempts adaptation to primary cell cultures could be obtained in the past only for two isolates.

The present work describes the methodology which enabled us to succeed in the adaptation of a bovine enteric coronavirus isolated in France to primary calf kidney cells, and reports results on the characteristics of this virus.

Adaptation to serial growth was realized at 34 °C in the following way : 3 passages each lasting 8 to 10 days followed by 16 passages each lasting 6 days. From the 20th passage on the duration of incubation was reduced to 4 days.

Virus growth was checked using an indirect immunofluorescence test. During the first passages only a few dispersed positive cells could be observed but later on small foci of immunofluorescent cells did appear. By the 35th passage infective titers did not exceed 1×10^5 $TCID_{50}$/ml and cytopathic effects were always very discrete.

When the susceptibility of different cell-types to this coronavirus strain (G110) was checked we found that only bovine cells and the human HRT_{18} cell-line were able to replicate the virus.

In HRT_{18} cells titers as high as 5×10^7 $TCID_{50}$/ml could be obtained at the first passage of G110 strain, previously adapted to primary calf kidney cells.

As regards the antigenic properties of G110 virus no difference could be established between this strain and the Nebraska isolate (NCDCV) neither by indirect immunofluorescence test nor by indirect neutralization test.

The G110 strain agglutinates rat and mouse erythrocytes. The density of purified virions in mouse gradients is 1.19 and the morphology of the particles is characteristic of a coronavirus.

Des coronavirus se multipliant dans l'intestin grêle et le colon du jeune bovin sont à l'origine de troubles diarrhéiques chez ces animaux (Stair *et al.*, 1972 ; Morin *et al.*, 1976 ; Bridger *et al.*, 1978). Cependant l'importance réelle de ces agents dans la pathologie du tractus digestif du veau reste encore à définir.

Les virus de ce type ne manifestent par ail-

leurs qu'une très faible capacité à se multiplier spontanément dans les cultures cellulaires couramment utilisées. De ce fait, le diagnostic des coronaviroses est impossible à réaliser sur culture cellulaire comme cela a pu être envisagé pour le rotavirus bovin (Bridger et Woode, 1976 ; Scherrer *et al.,* 1976).

Aussi, l'adaptation d'isolements de coronavirus entériques bovins sur culture primaire n'a-t-elle été réalisée que très rarement, et au prix de tentatives laborieuses :

— au Nebraska, tout d'abord (Mebus *et al.,* 1973) par passages successifs du virus sauvage sur des cellules de rein provenant d'un même foetus de bovin,

— en Grande-Bretagne ensuite (Bridger *et al.,* 1978) par passages successifs de l'isolat sur cultures primaires de rein de fœtus de bovin, mais le nombre de passages effectués n'est pas indiqué.

Récemment, des isolements ont également pu être adaptés à la culture sur lignées cellulaires d'origine simienne (Dea *et al.,* 1980) et d'origine humaine (Laporte *et al.,* 1980).

Nous vous proposons de rapporter ici la méthodologie qui nous a permis d'adapter un isolement de coronavirus à la propagation *in vitro* sur culture primaire de rein fœtal de bovin, puis à caractériser cette souche isolée en France.

Matériel et Méthodes

1. *Cultures cellulaires et milieux.*

Les fœtus de bovins proviennent de mères abattues (Abattoirs municipaux, Mantes-la-Ville, France). Après séparation du fœtus de ses enveloppes, les reins sont prélevés aseptiquement et les cellules dispersées à la trypsine (Gallagher, 1973). Les cellules primaires de rein fœtal de bovin (PRFB) ainsi obtenues sont entretenues en solution d'Earle additionnée de 0,5 % d'hydrolysat de lactalbumine et de 0,1 % d'extrait de levure (milieu ELY).

Les cellules de lignées continues ou de souches sont cultivées en milieu essentiel minimum d'Eagle (MEM 0011, Eurobio, Paris).

Les milieux de culture sont additionnés d'antibiotiques (pénicilline : 100 UI/ml, streptomycine 0,1 mg/ml et de sérum fœtal de bovin à raison de 8 % dans le milieu de croissance et de 2 % dans le milieu de maintien post infection. Ces milieux sont en solution saline équilibrée d'Earle, tamponnée à l'aide de bicarbonate de sodium 3×10^{-2} molaire en équilibre avec une atmosphère à 5 % de gaz carbonique.

Les cultures cellulaires sont réalisées en flacons plastique Corning de 25 à 150 cm^2.

Le tableau n° 1 récapitule les différentes souches ou lignées cellulaires testées. Les cellules qui ne sont pas inscrites à l'« American Type Culture Collection » ont été obtenues soit au Laboratoire de Pathologie Porcine INRA (Laude, 1978), soit isolées dans notre laboratoire (cellules MPV, RP et PV).

2. *Isolements de virus.*

Les isolements de virus proviennent de fèces de veau prélevées dans des élevages de l'INRA lors d'épisodes diarrhéiques. Après examen des échantillons en microscopie électronique l'un d'eux (G.77.110) fut choisi en raison de sa richesse en particules de type corona, et en raison de l'absence de tout autre type de particules virales. L'absence d'antigène rotavirus a également été vérifiée à l'aide de la technique ELISA (Scherrer et Bernard, 1977).

3. *Modalités d'infection*

L'inoculum initial est constitué par des fèces diluées au trentième dans du milieu MEM à 2 % de sérum fœtal et additionné d'antibiotiques (deux fois les concentrations usuelles), centrifugées à 3000 g pendant 30 min et enfin filtrées sur filtre de porosité 0,45 μm.

Les inoculums utilisés pour les passages ultérieurs sont les surnageants des cultures précédemment infectées.

Les cultures cellulaires sont utilisées lorsque les tapis deviennent confluents, les cellules sont alors lavées deux fois avec une solution d'Earle puis inoculées à raison de 1 ml de suspension virulente par flacon de 25 cm^2.

L'adsorption du virus est réalisée pendant deux heures à 37 °C sous agitation douce en présence d'air à 5 % de gaz carbonique. L'inoculum est ensuite retiré et les cellules sont lavées une fois avec une solution d'Earle avant d'être incubées en présence de milieu de maintien. La température d'incubation des cellules infectées est 34 °C. A cette température les tapis cellulaires se maintiennent en bon état pendant 12 à 15 jours, ce qui permet de réaliser des passages de longue durée.

4. *Obtention d'immunsérums anti-coronavirus bovin.*

Les immunsérums ont été obtenus chez le lapin inoculé avec du virus sauvage purifié deux fois sur gradient de saccharose selon le protocole d'immunisation suivant :
1re injection : 0,1 mg de virus dans l'adjuvant complet de Freund par voie intramusculaire ou par voie intradermique.
Rappels : les rappels ont lieu un mois après l'inoculation précédente et sont effectués avec 0,5 mg de virus par voie intraveineuse. Ces quantités pondérales de virus sont estimées d'après les travaux publiés à propos du coronavirus respiratoire humain 229 E dont le coefficient d'extinction est de $E^{1\,\%}_{1\,cm}$ = 54,3 à 256 nm (Hierholzer, 1976).

Les immunsérums titrant entre 1280 et 5120 en immunofluorescence indirecte sont obtenus entre le 8e et le 12e jour suivant un rappel.

Un sérum de lapin anticoronavirus bovin, souche Nebraska, conjugué à l'isothiocyanate

Tableau 1. — Sensibilité de différentes cellules au coronavirus bovin.

Cellules	Nature	Immunofluorescence en culture	Titres obtenus $DICT_{50}$/ml	Nombre de cellules par cm² de culture	Rendement par cellule	
					Brut	Net
PV	Poumon embryonnaire de bovin (souche)	+	1×10^5	—	—	—
MPV	Peau embryonnaire de bovin (souche)	+	1×10^4	—	—	—
MDBK	Rein de bovin (lignée)	+	1×10^3	—	—	—
PK 15	Rein de porc (lignée)	0	—	—	—	—
RP « TG »	Rein de porc (lignée)	0	—	—	—	—
RP « D »	Rein de porc (lignée)	0	—	—	—	—
RP (Asso, M. Madelaine)	Rein de porc (lignée)	+	$\leqslant 1 \times 10^2$	—	—	—
BHK 21	Rein de hamster (lignée)	0	—	—	—	—
CHO	Rein de hamster (lignée)	0	—	—	—	—
L	Souriceau (lignée)	0	—	—	—	—
MDCK	Rein de chien (lignée)	0	—	—	—	—
BSC 1	Rein de singe (lignée)	0	—	—	—	—
VERO	Rein de singe (lignée)	0	—	—	—	—
CV 1	Rein de singe (lignée)	0	—	—	—	—
MRC 5	Poumon humain (souche)	0	—	—	—	—
HRT 18	Tumeur du rectum (humaine)	+	5×10^7	$5{,}2 \times 10^5$	16	20 - 40
HEP 2	Tumeur du pharynx (humaine)	0	—	—	—	—
PRFB	Rein embryonnaire de bovin	+	10^5	8×10^4	0,25	25 - 250

de fluorescéine et fourni par C.A. Mebus, est également utilisé comme sérum de référence.

5. *Technique d'immunofluorescence*

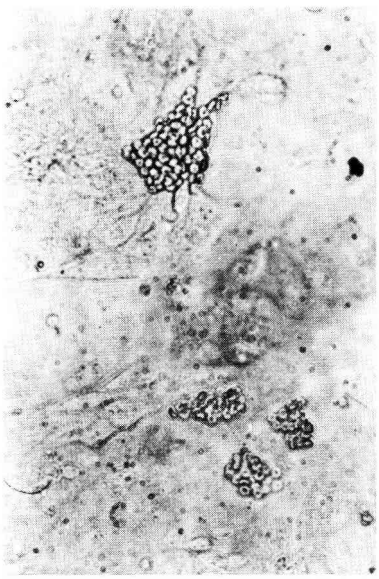
Les tapis cellulaires après fixation à l'éthanol 95 °GL pendant 15 min à −20 °C sont incubés à 37 °C pendant 40 min en présence d'immunsérums de lapin anticoronavirus entérique bovin dilué au 1/50 dans du PBS. Après cette première incubation les tapis sont lavés trois fois à l'eau puis incubés pendant 30 min à 37 °C en présence de globulines fluorescentes de mouton anti-IgG de lapin (Institut Pasteur, Paris) convenablement diluées dans du PBS. Enfin les tapis cellulaires sont lavés trois fois à l'eau et observés en microscopie de fluorescence à l'aide d'un microscope Orthoplan équipé d'un boîtier d'éclairage 250 avec brûleur HB0200 et d'un système optique pour lumière réfléchie Ploëmopak avec filtre H (Leitz, Rueil-Malmaison, France).

Les titres des suspensions virales et les titres neutralisants des sérums sont évalués d'après les techniques décrites pour la souche Nebraska (Sharpee *et al.*, 1976).

6. *Hémagglutination-hémadsorption*

Les tests d'hémagglutination sont réalisés en plaques à fond conique (Linbro, réf. 76-321-05). Chaque cupule reçoit 50 µl d'une dilution de virus en PBS, puis 50 µl d'une suspension d'hématies de rat ou de souris à 1 % dans du PBS. Le titre hémagglutinant du virus est déterminé après incubation pendant une heure à température ambiante.

Les tests d'hémadsorption en culture sont effectués à l'aide d'une suspension d'hématies de rat ou de souris à 1 % dans une solution



a

b

Fig. 1. — Cellules PRFB infectées par le coronavirus entérique bovin G110 en microscopie photonique.

a. Image d'hémadsorption montrant la présence de cellules positives sur une portion de tapis cellulaire (Cellules PRFB).

b. Visualisation des antigènes viraux dans les cellules précédentes par la technique d'immunofluorescence indirecte.

(Grandissement 240 ×).

d'Earle. Après incubation pendant une heure à température ambiante avec la suspension d'hématies, les tapis cellulaires sont lavés trois fois avec une solution d'Earle et replacés en milieu de maintien. Des cultures non infectées traitées en parallèle servent de témoin.

7. *Purification du virus de culture*

Les surnageants des cultures infectées sont prélevés au bout de 6 jours d'incubation (au lieu de 4 jours lorsque les tapis doivent être traités par la technique d'immunofluorescence) et centrifugés pendant une heure à 35 000 tours dans une centrifugeuse Spinco L50 avec rotor 45 TI. Les culots sont repris par du tampon Pipes 5-10^{-2} M, pH 6,8. La suspension virale ainsi obtenue est placée sur des gradients 20-60 % de saccharose. La centrifugation à l'équilibre est réalisée pendant 18 heures à 25 000 tours dans une centrifugeuse L50 avec rotor SW 27 (Beckman).

Après centrifugation le gradient est fractionné et collecté avec un ensemble d'appareils Isco (Roucaire, Vélizy, France). La densité de chaque fraction est déterminée par réfractométrie.

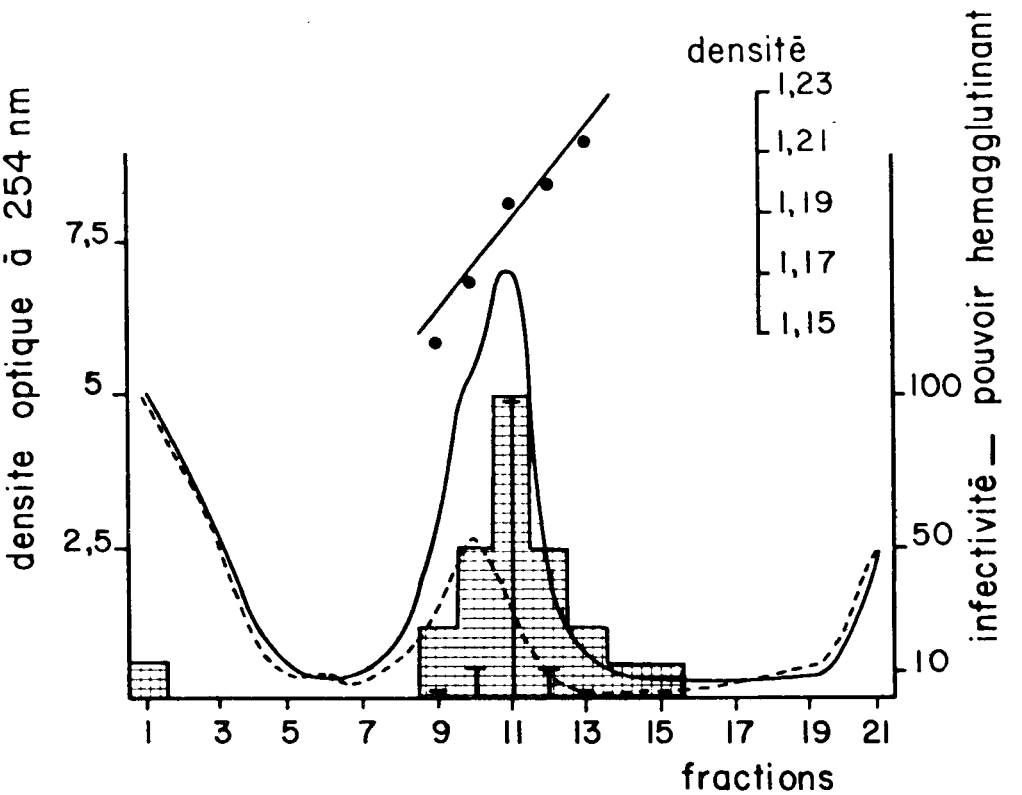


Fig. 2. — Centrifugation à l'équilibre sur gradient de densité (20-60 % de saccharose) de la souche de coronavirus entérique bovin G110 (30 passages sur cellules PRFB, 1 passage sur cellules HRT 18).

— Densités optiques des extraits de cellules infectées.

... Densités optiques des extraits de cellules témoins non infectées.

T Pourcentage de l'infectivité.

Pourcentage du pouvoir hémagglutinant.

8. *Microscopie électronique*

Les examens sont effectués après coloration négative soit au molybdate d'ammonium à 2 % pH 7,2 soit au phosphotungstate de sodium à 4 %, pH 7,2 avec un microscope électronique Philips EM 300 à 80 KV.

Résultats

1. *Adaptation de l'isolement G110 à la culture de cellules PRFB.*

Les passages s'effectuent en utilisant des surnageants de culture non dilués, et la présence d'antigènes viraux dans les tapis cellulaires infectés est mise en évidence à chaque passage par la technique d'immunofluorescence indirecte.

L'adaptation s'est déroulée de la manière suivante :
8 à 10 jours d'incubation à 34 °C pour les trois premiers passages ;
6 jours d'incubation du 4e au 19e passage ;
4 jours d'incubation à partir du 20e passage.

Lors du premier et du deuxième passage seules quelques très rares cellules isolées présentaient une fluorescence intracytoplasmique spécifique et ce n'est qu'à partir du troisième passage que l'on a pu observer la présence de quelques foyers de cellules réagissant positivement au test d'immunofluorescence indirecte. A ce stade, le titre infectieux des surnageants n'excédait pas 1×10^2 $DICT_{50}$ /ml. Ce rendement, relativement faible, s'est maintenu sensiblement au même niveau pendant les 19 premiers passages.

Des titres s'échelonnant entre 1×10^2 et 1×10^4 $DICT_{50}$ ont été obtenus lors des 12 passages suivants, et ce n'est qu'à partir du 32e passage que des titres de l'ordre de 10^5 $DICT_{50}$ /ml ont été enregistrés.

Un effet cytopathogène imputable au virus n'a été observé qu'à partir de ce 32e passage, mais il convient de noter que cet effet est toujours extrêmement discret, se traduisant par l'apparition au bout de trois jours de quelques cellules arrondies dans les surnageants des cultures infectées.

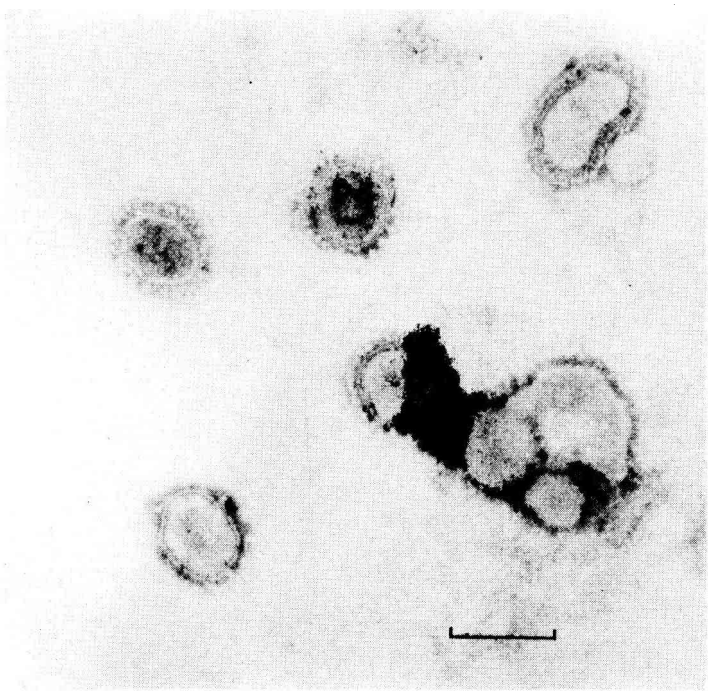


Fig. 3. — Particules de coronavirus entérique bovin G110 en microscopie électronique.

Virus ayant subi 33 passages sur cellules PRFB et 1 passage sur cellules HRT 18, purifié sur gradient de saccharose et coloré au phosphotungstate de sodium. La barre représente 100 nm.

2. *Culture de la souche G110 sur les lignées cellulaires.*

Différentes lignées cellulaires ont été testées quant à leur sensibilité à la souche G110 ayant subi au moins 20 passages en cellules PRFB.

Le tableau 1 montre que : les cellules de rongeurs BHK 21, CHO, L) ainsi que les cellules d'origine simienne (CV_1, VERO, BSC_1) ne donnent lieu ni à l'apparition d'un effet cytopathogène, ni à la formation d'antigènes viraux détectables par immunofluorescence indirecte. Dans les cellules de porc la replication du virus est faible, voire nulle.

Par contre, toutes les cellules d'origine bovine qui ont été testées sont sensibles au virus, toutefois seule la souche de poumon de veau permet de propager le virus en donnant des rendements analogues à ceux qui sont obtenus sur cellules PRFB.

Parmi les lignées d'origine humaine qui ont été testées, seule la lignée HRT 18 (Tompkins *et al.,* 1974) décrite par ailleurs pour être sensible au virus sauvage (Laporte *et al.,* 1980), est très permissive à la souche G110 ; dès le premier passage les titres obtenus peuvent atteindre $1 \times 10^{7.6}$ $DICT_{50}$ /ml de surnageant de cultures infectées.

3. *Caractères de la souche de coronavirus bovin G110.*

A — Propriétés antigéniques.

La souche G110 a été comparée à la souche américaine isolée et caractérisée au Nebraska (Sharpee *et al.,* 1976) selon la méthode d'immunofluorescence indirecte et par neutralisation.

Aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les deux souches. Par ailleurs, les sérums, d'origine américaine ou obtenus dans notre laboratoire, ont respectivement les mêmes titres vis-à-vis des deux souches de virus.

La souche G110 comme la souche Nebraska agglutine les hématies de rat et de souris. Une unité hémagglutinante équivaut à $10^{4.5}$ $DICT_{50}$.

Les cellules (PRFB et HRT 18) infectées par la souche G110 adsorbent les hématies de rat et de souris. En combinant cette technique avec la technique d'immunofluorescence on peut vérifier que les cellules qui réagissent avec des globules rouges sont bien celles qui contiennent des antigènes viraux (fig. 1).

B — Caractéristiques du virus purifié.

Les surnageants des cultures de cellules HRT 18 infectées par la souche G110 montrent après concentration et purification sur gradient de saccharose, un maximum de densité optique dans la zone de densité du gradient allant de 1,180 à 1,200 (lecture à 254-256 nm). A ce maximum de densité optique correspond l'infectivité et l'activité hémagglutinante les plus élevées (fig. 2). On peut observer, en microscopie électronique, après coloration négative, des particules de type corona typiques dans les fractions qui correspondent à ce « pic » (fig. 3).

Discussion

La tentative d'adaptation d'un isolement de coronavirus entérique bovin à la culture cellulaire a abouti à l'isolement d'une souche capable de se multiplier dans différents systèmes cellulaires d'origine bovine, ainsi que dans les cellules de la lignée HRT 18 d'origine humaine.

Ce travail montre une fois de plus que les coronavirus entériques bovins qui se multiplient *in vivo* dans les cellules différenciées de l'épithélium de l'intestin grêle et du colon ne s'adaptent que très difficilement à la culture *in vitro.* En utilisant des cellules PRFB, il est nécessaire en effet d'effectuer 20 à 30 passages pour obtenir un rendement de l'ordre de 10^5 $DICT_{50}$ /ml de surnageant de culture. A cet égard, nos observations rejoignent celles faites par d'autres auteurs (Mebus *et al.,* 1973 ; Sharpee *et al.,* 1976) avec la souche de coronavirus entérique bovin isolée au Nebraska.

Il est à noter que la souche G110 adaptée sur cellules PRFB se multiplie d'emblée, avec un haut rendement, sur les cellules HRT 18 qui se sont révélées par ailleurs sensibles à des isolements de coronavirus entériques bovins, canins, et humains (Laporte *et al.,* 1980, Laporte et Bobulesco, 1980).

Lors du premier passage sur cellules HRT 18, on constate en effet que le rendement brut par unité de surface de culture est de 8×10^6 $DICT_{50}/cm^2$, soit 400 fois plus élevé en système HRT qu'en système PRFB.

Cette différence de rendement est imputable pour une grande part au fait que seulement 0,1 à 1 % des cellules PRFB montre une sensibilité au virus, alors que 40 à 80 % des cellules d'une culture de HRT 18 manifestent une synthèse d'antigènes viraux dans les 24 heures qui suivent l'infection (tabl. 1).

La grande proportion des cellules insensibles au virus apparaît donc comme un facteur limitant dans la culture *in vitro* des coronavirus entériques bovins sur cellules PRFB.

Ceci pourrait expliquer le faible titre de la souche Nebraska adaptée par passages successifs sur des cellules originaires du même fœtus, et le petit nombre de passages en série qu'ont pu réaliser Wellemans *et al.* (1977) en Belgique et Bridger *el al.* (1978) en Grande-Bretagne sur le même type de culture cellulaire.

Par contre, la tentative d'adaptation du coronavirus entérique bovin sur cellules de lignées continues d'origine humaine (Laporte *et al.*, 1980) ou simienne (Dea *et al.*, 1980) ont été plus fructueuses.

L'intérêt d'une souche telle que G110 capable de se multiplier dans des cellules non tumorales est de deux ordres :

— permettre la comparaison avec des souches adaptées rapidement à des cellules de lignées (HRT 18) : l'adaptation dans les deux cas est-elle équivalente ?,

— servir de point de départ pour la mise au point de vaccins.

Accepté pour publication, le 25 août 1981.

Résumé

Les coronavirus sont responsables de troubles pathologiques variés dans un grand nombre d'espèces animales.
Chez le veau leur multiplication dans les cellules différenciées à bordure en brosse de l'intestin grêle et du colon provoquent des diarrhées qui peuvent être mortelles.
L'étude de ces agents pathogènes, la mise au point de moyens de diagnostic et de prophylaxie nécessitent son adaptation à la culture cellulaire ce qui n'a pu être réalisé que très rarement sur cultures primaires.
Notre travail décrit l'adaptation d'une souche de coronavirus entérique bovin isolé en France sur culture primaire de rein fœtal de bovin ainsi que sa caractérisation.
L'adaptation s'est déroulée de la façon suivante : 8 à 10 jours d'incubation à 34 °C pour les 3 premiers passages ; 6 jours d'incubation à 34 °C du 4e au 19e passage ; 4 jours d'incubation à 34 °C à partir du 20e passage.
La multiplication virale est mise en évidence par immunofluorescence indirecte. Au cours des premiers passages seules quelques rares cellules sont ainsi mises en évidence puis plus tard des foyers de cellules positives apparaissent. Les titres obtenus n'atteignent que 1×10^5 $DICT_{50}$/ml à partir du 35e passage. L'effet cytopathogène est toujours discret.
La sensibilité de différentes cultures cellulaires à la replication du 20e passage de cette souche G110 a été testée. Il faut noter que seules des lignées bovines ou la lignée HRT 18 d'origine humaine se sont montrées permissives. Cette dernière permet d'obtenir en un passage un titre élevé (5×10^7 $DICT_{50}$/ml).
Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différences antigéniques entre cette souche et la souche américaine (NCDCV Nebraska) : ni par immunofluorescence indirecte ni par neutralisation.
Cette souche G110 agglutine les hématies de rat et de souris ; la densité du virus purifié est de l'ordre de 1,19 ; son aspect en microscopie électronique est celui d'un coronavirus typique.

Références

BRIDGER J.C., WOODE G.N., 1976. Neonatal calf diarrhoea : Identification of a reovirus-like (Rotavirus) agent in faeces by immunofluorescence and immune electron microscopy. *Br. Vet. J.*, **131**, 528-535.

BRIDGER J.C., WOODE G.N., MEYLING A., 1978. Isolation of coronavirus from neonatal calf diarrhea in Great-Britain and Denmark. *Vet. Microbiol.*, **3**, 101-113.

DEA S., ROY R.S., BEGIN M.E., 1980. Bovine coronavirus isolation and cultivation in continuous cell lines. *Am. J. Vet. Res.*, **41**, 30-38.

GALLAGHER G., 1973. Rabbit Kidney and skin. *In :* KRUSE P.F. and PATTERSON J.R., *Tissue culture, methods and application*, 102-105, Academic Press, New York.

HIERHOLZER J.C., 1976. Purification and biophysical properties of Human Coronavirus 229 E. *Virology,* **75,** 155-165.

LAPORTE J., BOBULESCO P., ROSSI F., 1980. Une lignée cellulaire particulièrement sensible à la replication du coronavirus entérique bovin : les cellules HRT 18. *C.R. Acad. Sci. Paris, Série D,* **290,** 623-626.

LAPORTE J., BOBULESCO P., 1980. Growth of human and canine enteritic coronavirus in a highly susceptible cell line HRT 18. *Perspect. Virol.,* **11,** 189-193.

LAUDE H., 1978. Virus de la peste porcine classique : isolement d'une souche cytolytique à partir de cellules IB-RS2. *Ann. Microbiol. Inst. Pasteur,* **129A,** 553-561.

MEBUS C.A., STAIR E.L., RHODES M.B., TWIEHAUS M.J., 1973. Neonatal calf diarrhea : propagation, attenuation and characteristics of a corona-like agent. *Am. J. Vet. Res.,* **34,** 145-150.

MORIN M., LARIVIERE S., LALLIER R., 1976. Pathological and microbiological observations made on spontaneous cases of acute neonatal calf diarrhoea. *Can. J. Comp. Med.,* **40,** 228-240.

SHARPEE R.L., MEBUS C.A., BASS F.P., 1976. Characterization of a calf diarrheal coronavirus. *Am. J. Vet. Res.,* **37,** 1031-1041.

SCHERRER R., COHEN J., L'HARIDON R., FEYNEROL C., FAYET J.C., 1976. Reovirus like agent (Rotavirus) associated with neonatal calf gastro enteritis in France. *Ann. Rech. Vet.,* **7,** 25-31.

SCHERRER R., BERNARD S., 1977. Application d'une technique immunoenzymologique (ELISA) à la détection du Rotavirus bovin et des anticorps dirigés contre lui. *Ann. Microbiol.,* **128 A,** 499-510.

STAIR E.L., RHODES M.B., WHITE R.G., MEBUS C.A., 1972. Neonatal calf diarrhea : purification and electron microscopy of a corona-like agent. *Am. J. Vet. Res.,* **33,** 1147-1156.

TOMPKINS W.A.F., WATRACH A.M., SCHMALE J.D., SCHUTZ R.M., HARRIS J.A., 1974. Cultural and antigenic properties of a newly established cell strain derived from adenomas of the human colon and rectum. *J. Natl Cancer Inst.,* **52,** 1101.

WELLEMANS G., OYAERT W., MUYLLE E., THOONEN H., VAN OPDENBOSH E., 1977. Isolatic van gen coronavirus bij kalveren. *Vlaam Diergeneeskd. Tijdschr.,* **46,** 249-255.