

NATURE DE VIRUS ISOLÉS DE LA GORGE DE JEUNES BOVINS EN BONNE SANTÉ

R. CALVARIN et G. GAYOT

avec la collaboration technique de Y. BOURACHOT, Danielle KIEFFER et Christiane BAYSSAS

*Laboratoire central de Recherches vétérinaires,
22, rue Pierre-Curie,
94700 Maisons-Alfort*

SUMMARY

CHARACTERIZATION OF VIRUSES ISOLATED FROM THE THROAT OF HEALTHY CALVES

During investigations to detect foot-and-mouth disease in cattle to be exported, several other viruses were isolated from the throat following Probang sampling. The technique of isolating these viruses using trichlorotrifluoroethane is described, as well as some of their physical and chemical properties. Not all the viruses were inhibited by 5 IUDR. They were ether-stable, stable at pH 3.6 and 7 and less than 50 nm in size. It is concluded that they were all enteroviruses.

Key words : *Enterovirus, Throat, Probang test, Cattle.*

INTRODUCTION

Le Laboratoire central de Recherches vétérinaires examine chaque année environ 4 000 prélèvements obtenus par la méthode du Probang-test. Ces prélèvements sont récoltés sur des jeunes bovins, âgés de six mois environ, qui sont destinés aux exportations vers certains pays ne pratiquant pas la vaccination anti-aphteuse : Canada, Grande-Bretagne, Irlande, Japon, Nouvelle-Zélande. Ce contrôle sanitaire est destiné à éliminer des porteurs de virus aphteux qui pourraient s'avérer extrêmement dangereux au milieu d'un cheptel non vacciné. L'épreuve consiste à inoculer un prélèvement de l'arrière-gorge sur des cultures cellulaires sensibles afin de détecter une présence virale aphteuse (VAN BEKKUM *et al.*, 1959 ; SUTMOLLER et GAGGERO, 1965 ; BURROWS, 1966 ; DHENNIN, GAYOT et DHENNIN, 1967 ; HEDGER, 1968 ; KAADEN, EISSNER et BÖHM, 1970 ; STAVER *et al.*, 1970).

Au cours des examens qui ont concerné des dizaines de milliers d'animaux, à

raison d'environ 4 000 par an pendant des années, seulement deux animaux contaminés ont été relevés, lors même que des foyers aphteux étaient occasionnellement constatés sur le territoire français. Ce résultat est à porter à l'actif de la méthode d'abattage intégral telle qu'elle est appliquée en France.

Cependant, dans une zone aussi polluée que le pharynx il n'est pas rare d'isoler des virus dont les épreuves d'identification classiques (fixation du complément, séro-neutralisation, inoculation aux sourceaux) prouvent qu'ils ne sont pas de nature aphteuse.

On peut supposer qu'il s'agit de virus sans enveloppe car les prélèvements sont traités au trichlorotrifluoroéthane (TTE), afin de séparer le virus de l'anticorps et de le purifier, et le TTE est un solvant des lipides qui inactive quelques virus à enveloppe.

Certains auteurs ont signalé l'isolement d'entérovirus à partir du liquide œsophagien récolté au cours du Probang test et des phénomènes d'« hybridation » entre le virus aphteux et l'entérovirus sont envisagés (SUTMOLLER, GRAVES et McVICAR, 1970 ; TRAUTMAN et SUTMOLLER, 1971 ; GRAVES *et al.*, 1971).

En France, chaque année, 60 à 70 virus sont isolés. Pour des raisons pratiques, il n'était pas possible d'étudier tous les virus récoltés. Arbitrairement on a choisi les virus isolés pendant un an dans les zones de l'élevage *Charolais* et de l'élevage *Limousin*, soit 16 agents viraux, ce qui constitue une enquête portant sur 1 614 veaux.

MATÉRIEL, ET MÉTHODES

Animaux examinés

Ce sont des veaux d'environ six mois, présentant tous les signes d'une bonne santé, de race *Charolaise* ou *Limousine*.

Prélèvements

Les prélèvements ont été effectués, dans les régions d'élevage, à l'aide de la curette pharyngienne (que la langue anglaise appelle Probang) suivant la méthode initiale de VAN BEKKUM et FRENKEL (1959), reprise en France par DHENNIN, GAYOT et DHENNIN (1967). Après raclage de la muqueuse œsophagienne, le liquide prélevé est dilué dans le milieu nutritif de STOKER et McPHERSON (1961), décrit plus loin, et expédié dans la glace à une température de 0 à + 5°C de manière à parvenir au laboratoire en moins de 24 heures. Le nombre de prélèvements reçus est de l'ordre de 100 par jour, trois fois par semaine.

Traitement de l'échantillon

Chaque échantillon est additionné de 20 p. 100 de trichlorotrifluoroéthane (TTE) suivant la méthode de SUTMOLLER et COTRAL (1967), puis soumis à l'action d'un mixeur à la vitesse de 15 000 tours par minute et à la température de + 5°C. Après quoi l'émulsion obtenue est centrifugée à 3 200 *g* pendant vingt minutes. Le surnageant est inoculé sur cultures cellulaires sensibles.

Cultures cellulaires

En raison de leur grande sensibilité au virus aphteux, on utilise des cellules primaires de thyroïdes de veau obtenues par trypsination à chaud (PLOWRIGHT et FERRIS, 1961 ; SNOWDON, 1966). Le milieu est voisin de celui de STOKER et McPHERSON (1961), modifié par LANG *et al.* (1965). C'est un milieu essentiel minimum de Eagle (1959) (MEM) supplémenté par double concentration de vitamines et amino-acides, par du glucose (2,6 g p. 1 000) et du tryptose phosphate broth Difco (10 p. 100).

Pour la phase de croissance cellulaire, on ajoute 10 à 15 p. 100 de sérum de veau. Après 4 à 5 jours, le milieu est renouvelé avec une proportion de 1 à 5 p. 100 de sérum, suivant l'état de la culture cellulaire. Le milieu de maintien ne contient que 1 p. 100 de sérum de veau.

Les cultures sont effectuées en flacons de plastique Falcon (flacons 30 ml) et en tubes. La conservation cellulaire est de 2 à 3 semaines en tubes. En flacons de plastique, la conservation peut atteindre plus d'un mois.

Après inoculation du prélèvement les cellules reçoivent du milieu nutritif sans sérum.

Inoculation des prélèvements et examen

L'inoculum est de 1 ml pour un flacon Falcon de 30 ml. Un contact d'une heure avant remise du milieu permet la fixation et l'absorption d'un virus éventuel.

L'examen microscopique des cultures est effectué quotidiennement pendant cinq jours. Toute altération du tapis cellulaire entraîne un passage sur cultures cellulaires en tube pour différencier un effet viral d'un simple effet toxique toujours possible après traitement au TTE.

Épreuves d'identification des virus

Les examens préliminaires classiques orientés vers l'identification du virus aphteux (fixation du complément, séroneutralisation, inoculation aux souriceaux) s'étant révélés négatifs, on a procédé aux épreuves suivantes :

1. Action de l'IDU
2. Action de l'éther
3. Filtrations sur membranes de différents calibres
4. Action de l'acidité
5. Hémagglutination.

Par ces méthodes, on a éprouvé chaque virus isolé mais aussi des virus standard, d'action connue, conservés au laboratoire, de manière à montrer l'étendue d'une réponse quand elle est positive.

1. Action de l'IDU.

On prépare une solution de 5 iododesoxyuridine (IDU) à 1 mg par ml. La dissolution est effectuée à chaud (30 minutes à 56°C) selon la méthode de De LAVERGNE (1965). Cette solution est incorporée au milieu nutritif de façon à obtenir un milieu contenant 100 µg d'IDU par ml. Sur cellules thyroïdiennes de veau cultivées en tubes, on effectue un titrage du virus avec et sans IDU. Les dilutions du virus sont inoculées sur 2 séries de tubes : d'une part, en ajoutant le milieu nutritif normal, d'autre part en ajoutant le milieu nutritif additionné d'IDU. L'écart logarithmique des dilutions est de 1, le nombre de tubes par dilution : 5 et l'inoculum 0,1 ml. Afin que l'IDU puisse intervenir rapidement après inoculations, les milieux respectifs sont introduits tout de suite après inoculation sans période de fixation. Les 2 milieux sont renouvelés au 2^e jour de manière à recharger les cellules en IDU au cours de la réplication virale. Les lectures microscopiques sont effectuées quotidiennement pendant 6 jours et on calcule la DECP 50/0,1 ml (dose effet cytopathogène 50 p. 100 des tubes de culture par 0,1 ml), exprimée en log 10 de l'inverse de la dilution de virus, suivant la méthode de KÄRBER (1931). L'écart-type de cette dose est également calculé.

Deux virus standard, le virus IBR et l'adénovirus type 3, ont été éprouvés également par cette méthode ainsi que chaque virus à identifier.

2. Action de l'éther.

La même suspension virale est répartie dans 2 tubes à hémolyse en verre à raison de 2 ml par tube. A l'un des échantillons on ajoute 20 p. 100 d'éther. Les 2 échantillons sont conservés pendant 18 h à + 5°C. Après ce délai, l'éther est éliminé par évaporation au bain-marie à 37°C pendant trois heures. Chaque échantillon est alors titré sur une série de tubes de cellules de thyroïdes de veau, avec une heure de fixation. La lecture est effectuée pendant 6 jours et le titre exprimé en DECP 50/0,1 ml.

Un virus standard, le Parainfluenza 3, a été éprouvé par cette méthode en même temps que les virus inconnus.

3. *Filtration sur membranes calibrées.*

Sont utilisées des membranes cellulósiques Millipore de calibres 300 nm, 220 nm, 100 nm et 50 nm. Les filtrations sont effectuées au moyen de supports filtre Millipore n° 40-047 sous pression d'azote. Un volume de 15 à 20 ml de suspension virale est filtré successivement sur les membranes de calibre décroissant et inoculé sur cellules après chaque filtration.

Trois virus standard : Parainfluenza 3, Adénovirus et virus aphteux sont éprouvés en même temps que les virus inconnus.

4. *Action de l'acidité.*

On recherche si les virus sont sensibles à l'acidité. Trois solutions tampon acide citrique-phosphate disodique (tampon McILVAINE, 1921) sont utilisées à pH 7-6 et 3.

La suspension virale est diluée au 1/10 dans chacun des trois tampons. Après un séjour de 30 minutes à température du laboratoire, les mélanges à pH 6 et 3 sont additionnés de rouge de phénol, puis ramenés à pH 7 par addition de lessive de soude diluée, sous faible volume.

Chaque mélange virus-tampon fait alors l'objet d'un titrage sur cultures cellulaires de thyroïdes de veau en tube avec fixation d'une heure. Le titre est exprimé en DECP 50/0,1 ml.

Un virus standard, le virus aphteux, est éprouvé en même temps que les virus à identifier.

5. *Hémagglutination.*

Les virus à identifier sont éprouvés suivant la micro-méthode en plaque. La suspension initiale de virus utilisée est le 1/5 en eau physiologique sous volume 0,05 ml soumise ensuite à une série de dilutions de raison deux. A chaque dilution est ajouté un même volume de globules rouges à 0,5 p. 100. Ces globules rouges sont des espèces : Mouton, Cobaye, Singe Rhésus et Veau. La lecture est faite après une réaction de deux heures à + 5°C.

RÉSULTATS

Virus standard

Les titres obtenus sont les suivants (les chiffres entre parenthèses représentent l'écart-type).

1. *Épreuve à l'IDU.*

Virus IBR Virus témoin	5,7 (0,2)
Virus en présence d'IDU	2,5 (0)
Adénovirus 3 Virus témoin	6,7 (0,2)
Virus en présence d'IDU	1,5 (0)

2. *Épreuve à l'éther.*

Parainfluenza 3 Virus témoin	5,7 (0,2)
Virus + éther	0

3. *Épreuve de filtration.*

Parainfluenza 3 après filtration	300 nm +++
	220 nm 0
	100 nm 0
	50 nm 0

Adénovirus après filtration	300 nm	+++
	220 nm	+++
	100 nm	0
	50 nm	0
Virus aphteux après filtration	300 nm	+++
	220 nm	+++
	100 nm	+++
	50 nm	+++

4. Épreuve d'acidité (1).

Virus aphteux type C pH 7	5,1 (0,24)
pH 6	1,1 (0,24)
pH 3	0

Virus à identifier

1. Effet cytopathogène.

Pour tous les virus l'effet cytopathogène (ECP) est caractéristique des Picornavirus. Il est analogue à celui du virus aphteux. Les cellules deviennent plus réfringentes, s'arrondissent, gonflent, éclatent et il y a destruction complète du tapis cellulaire. Toutefois, le plus souvent on constate quelques différences avec l'ECP du virus aphteux. En général, au début de l'apparition de l'ECP, l'action du virus aphteux se traduit par des foyers de cellules rondes qui plus tard s'étendent et se rejoignent ; celle des virus étudiés est beaucoup plus éparpillée, les cellules atteintes sont beaucoup plus dispersées et isolées les unes des autres. D'autre part, on constate la présence de cellules réfringentes en forme de fuseau (allure fibroblastique), phénomène pratiquement absent sur cellules de thyroïdes quand se développe l'ECP aphteux. Enfin le gonflement des cellules atteintes est plus faible qu'avec le virus aphteux.

D'autre part, aux fortes dilutions, alors que l'ECP aphteux aboutit à la destruction complète du tapis en 48 heures au plus, les virus étudiés agissent plus lentement, provoquant une destruction totale en seulement 3,4 ou même 5 jours.

2. Épreuves IDU, éther, filtrations et acidité.

Les résultats sont indiqués dans le tableau 1. Les chiffres indiqués représentent le titre par la méthode de KÄRBER, entre parenthèses l'écart-type.

3. Hémagglutinations.

Les résultats sont indiqués dans le tableau 2.

DISCUSSION

Virus standard

1. Action de l'IDU.

La méthode utilisée permet de mettre en évidence la sensibilité à l'IDU des virus IBR et Adénovirus et leur nature à base d'acide désoxyribonucléique. On

(1) Ces titres ne tiennent pas compte de la dilution préalable dans le tampon.

TABLEAU I

Taille des virus et titres obtenus (DECP 50/0,1 ml)
 (les chiffres entre parenthèses représentent l'écart-type)

N° du virus	Action de l'IDU		Action de l'éther		Taille en nm	Action de l'acidité		
	sans IDU	avec IDU	sans éther	avec éther		pH 7	pH 6	pH 3
2	6,7 (0,2)	6,3 (0,32)	6,7 (0,2)	6,3 (0,32)	< 50	5,5 (0,28)	5,3 (0,2)	5,7 (0,35)
75	6,1 (0,24)	5,9 (0,24)	6,7 (0,2)	6,3 (0,2)	< 50	5,7 (0,32)	5,5 (0,28)	5,5 (0,28)
246	6,3 (0,2)	6,1 (0,24)	5,7 (0,2)	5,3 (0,2)	< 50	5,7 (0,2)	5,9 (0,24)	5,1 (0,32)
530	5,7 (0,2)	6,3 (0,32)	6,7 (0,2)	6,7 (0,35)	< 50	5,7 (0,2)	6,3 (0,32)	5,9 (0,32)
532	6,9 (0,24)	7,5 (0,28)	7,1 (0,32)	7,3 (0,2)	< 50	6,5 (0)	7,1 (0,24)	6,1 (0,24)
568	6,3 (0,32)	6,1 (0,24)	6,9 (0,28)	6,1 (0,24)	< 50	5,7 (0,2)	5,9 (0,24)	5,9 (0,28)
14	5,5 (0,28)	5,5 (0,28)	5,7 (0,32)	5,3 (0,2)	< 50	5,9 (0,24)	5,7 (0,2)	5,3 (0,37)
29	6,9 (0,24)	6,5 (0)	6,5 (0,28)	6,1 (0,24)	< 50	4,7 (0,2)	4,5 (0)	5,1 (0,35)
94	6,7 (0,2)	6,7 (0,32)	6,1 (0,32)	6,1 (0,32)	< 50	5,5 (0,28)	5,7 (0,2)	5,7 (0,2)
200	6,1 (0,32)	5,7 (0,2)	4,9 (0,24)	5,7 (0,2)	< 50	5,7 (0,2)	5,5 (0,28)	4,9 (0,24)
58	6,7 (0,2)	7,3 (0,2)	6,7 (0,35)	5,7 (0,2)	< 50	6,1 (0,24)	5,9 (0,24)	5,9 (0,24)
192	6,5 (0)	6,5 (0)	5,9 (0,24)	5,1 (0,32)	< 50	6,5 (0)	6,5 (0,28)	6,5 (0,28)
217	5,7 (0,2)	5,3 (0,2)	5,1 (0,24)	4,7 (0,2)	< 50	5,1 (0,24)	5,3 (0,2)	4,9 (0,24)
G 48	6,1 (0,24)	6,5 (0,35)	6,1 (0,24)	5,9 (0,28)	< 50	5,3 (0,2)	4,7 (0,2)	4,7 (0,2)
16	5,5 (0,37)	5,5 (0,37)	5,7 (0,2)	5,1 (0,24)	< 50	5,3 (0,32)	5,5 (0,35)	5,3 (0,32)
15	6,5 (0)	6,7 (0,2)	6,7 (0,2)	6,1 (0,24)	< 50	5,1 (0,32)	4,5 (0,28)	4,7 (0,32)

TABLEAU 2

Hémagglutinations

(Dilutions maximum hémagglutinantes des virus)

N° du virus	GR cobaye	GR mouton	GR rhésus	GR veau
2	1/40	1/10	1/40	0
75	0	0	1/40	0
246	0	0	0	0
530	0	0	0	0
532	1/640	0	0	0
568	0	0	0	0
14	0	0	0	0
29	1/40	0	0	0
94	1/40	0	0	0
200	0	0	1/20	0
58	0	0	0	0
192	0	0	0	0
217	1/20	1/10	1/80	0
G 48	1/40	1/20	1/40	0
16	0	0	0	0
15	0	0	0	0

remarque cependant que l'IDU n'inhibe pas complètement la réplication de ces virus. Mais la différence des titres, 3,2 pour l'IBR et 4,2 pour l'Adénovirus, est nettement significative.

2. Action de l'éther.

L'inhibition par l'éther du Parainfluenza 3 est complète. La présence d'une enveloppe virale est particulièrement nette.

3. Filtrations.

Les filtrations à l'aide de supports filtres Millipore n° 40-047 sous pression d'azote permet de retrouver la taille du Parainfluenza (entre 220 et 300 nm) et celle de l'Adénovirus (entre 100 et 220 nm). Cette technique a paru plus valable que celle des supports filtres adaptés sur seringues, d'emploi très délicat (rupture possible de la membrane).

4. Action de l'acidité.

A pH 3 le virus aphteux est totalement détruit en 30 minutes, mais à pH 6 la destruction n'est pas complète, ce qui s'accorde avec les essais de BACHRACH *et al.* (1957). Mais la différence logarithmique qui est de 4 entre les deux titres à pH 7 et à pH 6 est hautement significative. La méthode (dilution au 1/10° dans le tampon et contact 30 minutes) nous paraît plus rationnelle que celle utilisée par certains auteurs qui consiste à mélanger à parties égales la suspension virale et le tampon, puisque la suspension virale dans le milieu nutritif des cellules est le plus souvent à pH

voisin de 7 et très tamponnée ce qui peut modifier considérablement le pH final. Nous avons préféré un séjour de 30 minutes à la température du laboratoire plutôt que la température de 37°C, proposée par d'autres auteurs, en raison de la sensibilité du virus aphteux à la chaleur.

En résumé, les essais sur les virus standard ont permis d'établir la validité des méthodes et d'estimer l'écart des titres quand la réponse est positive.

Virus à identifier

Pour les différentes épreuves, l'examen du tableau 1 montre, pour tous les virus, une similitude des titres dans les tubes témoins et dans les tubes réactionnels. L'écart-type permet d'apprécier la variation et de déterminer les limites de confiance. Jamais les écarts logarithmiques n'atteignent ceux constatés avec les virus standards où les réactions sont positives. L'écart maximum est de 1 (virus n° 58, épreuve à l'éther). Enfin tous les virus ont une taille inférieure à 50 nm. Ainsi tous les virus sont résistants à l'IDU (virus à ARN), résistant à l'éther (virus sans enveloppe), d'une taille inférieure à 50 nm. On peut tous les classer dans le groupe des Picornavirus.

Tous les virus sont résistants à pH 3, caractéristique des Entérovirus. Les Picornavirus bovins comprennent : Entérovirus, virus aphteux, Rhinovirus. On sait que le virus aphteux est détruit à pH 3 ainsi que le Rhinovirus, qui d'ailleurs ne cultive pas directement sur cellules de thyroïdes (IDE et DARBYSHIRE, 1972) ; ainsi, en définitive, tous les virus isolés sont des Entérovirus.

Huit d'entre eux se sont montrés hémagglutinants dont cinq à l'égard de globules rouges de singe Rhésus, ce qui s'accorde avec les études de LA PLACA (1965).

Quant à la similitude de l'effet cytopathogène des Entérovirus avec celui du virus aphteux, elle a été soulignée par certains auteurs (SCOTT et COTTRAL, 1967). On considère actuellement que tous les Picornavirus provoquent le même ECP.

La présence d'Entérovirus au niveau de la gorge a été observée chez l'enfant, ils peuvent y déterminer des troubles pathologiques (virus coxsackie). Leur présence, en ce lieu, chez des porteurs sains est maintenant signalée chez le Veau. Il faut rappeler toutefois que CHARTON *et al.* (1973) ont pu isoler des Picornavirus, mais sans préciser lesquels, dans l'exsudat nasal de veaux normaux.

Ces épreuves permettent de clarifier la nature de virus isolés pendant le contrôle des animaux exportés, recherche orientée en principe vers l'isolement du virus aphteux.

En outre, un certain état sanitaire du cheptel est évoqué puisque nous avons une appréciation de la proportion de porteurs d'Entérovirus chez les jeunes bovins.

Il faut ajouter la possibilité que ces virus puissent devenir pathogènes puisque l'on a pu isoler de tels Entérovirus dans l'exsudat nasal ou les fèces au cours d'affections respiratoires chez les bovins (MOLL et DAVIS, 1959 ; WOODS *et al.*, 1970). Leur rôle est connu dans certains troubles diarrhéiques (FAYE et CHARTON, 1968) ou avortements (DUNNE *et al.*, 1973).

CONCLUSION

Au cours d'une enquête portant sur 1 614 veaux dans les zones de l'élevage *Charolais* et de l'élevage *Limousin*, la méthode du Probang test n'a pas permis d'isoler un seul virus aphteux mais il a été isolé 16 Entérovirus.

La proportion de veaux porteurs d'Entérovirus au niveau de la gorge est de l'ordre de 1 p. 100.

Reçu pour publication en décembre 1974.

RÉSUMÉ

Au cours d'enquêtes pour le dépistage du virus aphteux, par le Probang test, un certain nombre de virus sont isolés chez des veaux destinés aux exportations. Ces virus ne présentent pas les propriétés du virus aphteux. Ils ont été étudiés. Les méthodes de prélèvement et d'isolement sont rappelées. Les techniques d'identification sont décrites : épreuve à la 5-iododesoxy-uridine (IDU), épreuve à l'éther, estimation de la taille, résistance à l'acidité, hémagglutination. Les auteurs concluent que tous les virus étudiés sont des entérovirus.

Mots clés : *Entérovirus, Gorge, Probang test, Bovins.*

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BACHRACH H. L., BRESSE S. S., CALLIS J. J., HESS W. R., PATTY R. E., 1957. Inactivation of Foot-and-mouth disease virus by pH and temperature changes and by formaldehyde. *Pro. Soc. exper. Biol. Med.*, **95**, 147-152.
- BURROWS R., 1966. Studies, on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *J. Hyg. Camb.*, **64**, 81-90.
- CHARTON A., FAYE P., LE LAYEC C., MAGE C., BERNARD C., 1973. Fréquence relative des isolements de virus de diverses familles chez des veaux malades ou apparemment sains, dans le département de l'Aube. *Bull. Acad. vétér.*, **46**, 255-262.
- DE LAVERGNE E., OLIVE, GEORGES J. C., LE MOYNE M. T., 1965. Action de la 5-iodo-2'-desoxyuridine (IDU) sur quelques virus à ADN en cultures cellulaires. *Rev. Immunol.*, **29**, 241-266.
- DHENNIN L., GAYOT G., DHENNIN L., 1967. Épreuve de la curette pharyngienne dans la recherche de porteurs de virus aphteux. *Bull. Acad. vétér.*, **40**, 59-65.
- DUNNE H. W., AJINKYA S. M., BUBASH G. R., GRIEL L. C., 1973. Parainfluenza 3 and bovine enteroviruses as possible important causative factors in bovine abortion. *Amer. J. veter. Res.*, **34**, 1121-1126.
- EAGLE H., 1959. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, **130**, 432-437.
- FAYE P., CHARTON A., 1968. Caractères particuliers de quelques souches de picornavirus isolés de bovins atteints d'entérites enzootiques. *Rec. Med. vétér.*, **144**, 21-27.
- GRAVES J. H., McVICAR J. W., SUTMOLLER P., TRAUTMAN R., WAGNER G. G., 1971. Latent viral infection in transmission of foot-and-mouth disease by contact between infected and susceptible cattle. *J. infect. Dis.*, **124**, 270-276.
- HEDGER R. S., 1968. The isolation and characterization of foot-and-mouth disease virus from clinically normal herds of cattle in Botswana. *J. Hyg. Camb.*, **66**, 26-36.
- IDE P. R., DARBYSHIRE J. H., 1972. Studies with a rhinovirus of bovine origine. *Arch. ges. Virusforsch.*, **36**, 166-176.
- KAADEN O., EISSLER G., BOHM H. O., 1970. Untersuchungen über Maul und Klauenseuche (MKS). Virusdauerasschei der bei vakzinierten und experimentell infizierten Rindern. *Zbl. Veter.-Med.*, **17**, 485-496.
- KARBER G., 1931. Beitrag zur kollektiven behandlungpharmakologischer reihenversuche. *Arch. (Naunyn-Schmiedeberg's) exper. Pathol. pharmakol.*, **162**, 480-483.
- LANG R., DUBOULARD C., STELLMAN C., LEPHETHIOTIS E., ROUMIANTZEFF M., PETERMAN H. G. FONTAINE J., BRANCHE R., 1965. Emploi des cellules BHK 21 en virologie. *Institut Français de la Fièvre aphteuse*, publications 1965-1966, p. 311-329, Lyon.
- LA PLACA M., PORTOLANI M., LAMIERI C., 1965. The basis for a classification of bovine enteroviruses, *Arch. ges. Virusforsch.*, **17**, 98-115.
- MCLLVAIN T. C., 1921. A buffer solution for colorimetric comparison. *J. biol. Chem.*, **49**, 183-186.
- MOLL T., DAVIS A. D., 1959. Isolation and characterization of cytopathogenic enteroviruses from cattle with respiratory disease. *Amer. J. veter. Res.*, **20**, 27-32.
- FLOWRIGHT W., FERRIS R. D., 1961. The preparation of bovine thyroid monolayers for use in virological investigations. *Res. veter. Sci.*, **2**, 149-152.
- SCOTT F. W., COTTRAL G. E., 1967. Comparaison of a bovine enterovirus and foot-and-mouth disease virus. *Amer. J. veter. Res.*, **28**, 1597-1600.

- SNOWDON W. A., 1966. Growth of foot-and-mouth disease virus in monolayer cultures of calf thyroid cells. *Nature*, **210**, 1079-1080.
- STAVER P. J., BOOL P. H., CLAESSENS A. M. J. M., VAN BEKKUM J. G., 1970. Some properties of carrier strains of foot-and-mouth disease virus. *Arch. ges. Virusforsch.*, **29**, 113-126.
- STOKER M., McPHERSON I., 1961. Studies on transformation of hamster cells by polyoma virus *in vitro*. *Virology*, **14**, 359-370.
- SUTMOLLER P., GAGGERO A., 1965. Foot-and-mouth disease carriers. *Veter. Rec.*, **77**, 968-969.
- SUTMOLLER P., COTTRAL G. E., 1967. Improved techniques for the detection of foot-and-mouth disease virus in carrier cattle. *Arch. ges. Virusforsch.*, **21**, 170-177.
- SUTMOLLER P., GRAVES J. H., McVICAR J. W., 1970. Influence of enterovirus on foot-and-mouth disease virus infection : a hypothesis. *Proc. 74th annual meeting U. S. Animal Health association*, 235-240.
- TRAUTMAN R., SUTMOLLER P., 1971. Detection and properties of a genomic masked viral particle consisting of foot-and-mouth disease virus nucleic acid in bovine enterovirus protein capsid. *Virology.*, **44**, 537-543.
- VAN BEKKUM J. G., FRENKEL H. S., FREDERICKS H. H. S., FRENKEL S., 1959. Observations on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *T. Diergeneeskde*, **84**, 1159-1163.
- WOODS G. T., WATRACH A. M., FEORINO P., ZINZILIETA M., 1970. Serological, biochemical and structural properties of three bovine picornaviruses. *Canad. J. comp. Med. veter. Sci.*, **34**, 122-125.
-