

Adaptation aux cellules rénales de lapin de virus associés à la dermatose nodulaire bovine

par J. RAMISSE, H. SERRES, E. RAKOTONDRAMARY

RÉSUMÉ

Nous avons adapté les souches locales et NEETHLING, agents de la dermatose nodulaire aux cellules rénales de lapin. Elles provoquent la destruction des cellules et la formation d'inclusions cytoplasmiques. Après un certain nombre de passages les souches virales sont encore pathogènes pour le veau. La séro-neutralisation montre l'identité entre les souches locales et NEETHLING. Elles ne sont pas hémagglutinantes. Leur acide nucléique est de l'ADN.

Les virus isolés au cours de la dermatose nodulaire ont pu être cultivés soit sur embryons de poulet, soit sur cellules en culture. Sur embryons de poulet, VAN DEN ENDE et Coll. (1948) ont isolé un virus « orphelin », et HAIG (1949), un virus pathogène. En 1959, VAN ROOYEN et Coll. ont passé sur embryon un virus type NEETHLING adapté aux cultures cellulaires. Ce virus n'était pas létal pour l'embryon, mais il provoquait la formation de pustules. Sur cultures de cellules rénales de veau, ALEXANDER et Coll. (1956, 1957) ont isolé et caractérisé différentes souches virales qui ont été réparties en 3 groupes : groupe I (type BZD), groupe II (type ALLERTON), groupe III (type NEETHLING). M. de LANGE (1959) a bien mis en évidence les différences entre les effets cytopathogènes propres à chaque groupe. PRYDIE et Coll. (1959) ont cultivé leurs souches sur cellules rénales de veau, d'agneau, et de fœtus ovin, sur cellules testiculaires de veau et d'agneau, ainsi que sur une lignée de cellules rénales d'agneau. Ils n'ont pas réussi à les cultiver sur HELA. Selon WEISS (1964), les cellules rénales d'agneau et de veau, et les

cellules testiculaires d'agneau sont les systèmes les plus sensibles.

Ayant isolé sur cellules rénales de veau (lignée cellulaire), quelques souches locales de virus associés à la dermatose, et ne disposant pas de cellules rénales primaires de veau ou d'agneau, nous avons essayé d'adapter aux cellules rénales primaires de lapin, les souches virales locales, ainsi que des souches reçues d'Afrique du Sud.

TECHNIQUES D'ÉTUDE

1^o Origine des souches.

Nous avons étudié comparativement les 4 souches locales, et les souches Sud-Africaines (NEETHLING, ALLERTON, BZD). Les souches locales étaient entretenues sur cellules rénales de veau (lignée cellulaire). Nous les avons passées sur cellules rénales de lapin lorsque l'effet cytopathogène sur cellules rénales de veau a été net et constant. Les souches Sud-Africaines étaient également passées sur cellules rénales de veau, ou conservées lyophilisées au congélateur.

2° Système cellulaire utilisé et mode de passage.

Nous avons mis en culture, selon la méthode classique par trypsination, des cellules rénales de lapereau de moins de 15 jours. Le milieu de croissance contenait de l'hydrolysate de lactalbumine en solution de EARLE, 10 p. 100 de sérum de veau local, et la concentration habituelle d'antibiotiques. Le pH du milieu était ajusté à 6,8-6,9. Pour l'entretien nous utilisons le milieu de EAGLE (Basal Eagle Medium) reconstitué à partir de la présentation desséchée, et additionné de 5 p. 100 de sérum de veau importé, de bicarbonate (pH : 7,5-7,6), et d'antibiotiques. Durant l'incubation (5-6 jours à 37 °C) des cellules inoculées, le milieu était renouvelé une fois, si nécessaire, avant la lyse avancée des cellules. Pour le transfert des souches virales, nous inoculons la suspension de cellules infectées du passage précédent (0,5 ml par tube). Les cellules infectées étaient détachées du verre par grattage lorsque la lyse était incomplète. Le passage des cellules rénales de veau aux cellules rénales de lapin s'est fait de la même façon. L'examen quotidien des tubes inoculés nous permettait de noter l'apparition de l'effet cytopathogène. Les cultures sur lamelles ont été colorées à l'hématéine-éosine pour mettre en évidence les inclusions. A plusieurs reprises nous avons essayé de titrer les souches qui se développaient sur cellules rénales de lapin.

3° Influence de la température d'incubation, de la concentration en sérum, et de la composition du milieu.

Certains auteurs (VAN ROOYEN et Coll., 1959 — WEISS et Coll., 1959) ont observé que la température optimale d'incubation était de 33,5 °C à 35 °C pour les embryons inoculés, et de 36 °C pour les cellules infectées avec les virus de la dermatose nodulaire. Nous avons voulu nous rendre compte si, en variant entre 35 °C et 38 °C la température d'incubation des cellules rénales de lapin inoculées, nous obtenions une amélioration dans la production du virus. De même en essayant plusieurs milieux d'entretien : milieu 199, Basal Eagle Medium, Minimum Essential Medium, milieu de SCHWÖBEL sans phos-

phate (1), Hydrolysate de caséine en solution de EARLE ; ou en variant la quantité de sérum (5 p. 100, 2 p. 100, 0 p. 100) dans le milieu d'entretien ; ou en augmentant la proportion de l'hydrolysate de lactalbumine dans le milieu jusqu'à 2 p. 100 (WEISS, 1959).

4° Etude du pouvoir pathogène.

Nous avons inoculé des veaux sensibles et des animaux de laboratoire avec les souches locales et NEETHLING. Nous avons choisi de jeunes veaux élevés à l'étable, dont nous étions sûrs qu'ils n'avaient pas contracté la maladie auparavant. Les inoculations ont été faites par voie sous-cutanée à l'encolure, à raison de 3 ml de culture cellulaire virulente pure. Tous les veaux inoculés (sauf deux) étaient de race métis Friesland, et âgés d'environ deux mois. Ils ont reçu différents passages des virus sur cellules rénales.

Les animaux de laboratoire ont été inoculés par diverses voies : les cobayes, par voie intrapéritonéale (1 ml), sous-cutanée (1 ml), intramusculaire (1 ml), intracérébrale (0,05 ml) ; les lapins par voie sous-cutanée (1 ml), intraveineuse (0,5 ml), intracérébrale (0,05 ml), intrapéritonéale (1 ml), intradermique (0,1 ml) ; les souris, par voie sous-cutanée (0,5 ml), intrapéritonéale (0,5 ml), intraveineuse (0,5 ml), intra-cérébrale (0,02 ml) ; les souriceaux par voie sous-cutanée (0,2 ml).

5° Nature de l'acide nucléique des souches locales et Neethling.

A l'aide d'un inhibiteur de synthèse (5-Bromo désoxyuridine, ou 5 Iodo-désoxyuridine), nous avons essayé d'inhiber la multiplication virale dans les cellules. Le virus vaccinal qui se multiplie parfaitement sur cellules rénales de lapin nous a servi de virus à ADN témoin. Chaque virus à caractériser (local ou NEETHLING) a

(1) Composition du milieu de SCHWÖBEL :

NaCl.....	8 g	Hydrolysate de lactalbumine	1
KCl.....	0,3	Sérum (facultatif)	50 ml
CaCl ₂	0,24	Eau distillée q. s. p.....	1 l
MgSO ₄	0,2		
CO ₃ HNa....	2		
Glucose.....	2		

été dilué à 10^{-1} soit dans le milieu d'entretien ordinaire, soit dans ce même milieu contenant 20 mg/litre de 5-Bromo désoxyuridine. Pour le virus vaccinal, nous avons fait 2 gammes de dilutions de 10^{-2} à 10^{-8} , l'une dans le milieu d'entretien normal, l'autre dans le milieu inhibiteur. Toutes les dilutions ont été inoculées aux cellules rénales de lapin. Puis, après l'adsorption, les tubes inoculés avec les dilutions en milieu normal ont reçu le milieu d'entretien normal ; les autres tubes ont reçu le milieu inhibiteur. Durant l'incubation qui a duré 4 jours nous avons noté les résultats : lyse cellulaire ou inhibition de la replication virale.

6° Hémagglutination.

Nous avons fait réagir les souches locales et NEETHLING sur les hématies de veau, de mouton, de souris, de lapin, de poulet, soit à 25 °C, soit une nuit à 4 °C. Comme virus réactifs nous avons pris les surnageants de cultures cellulaires infectées, dilués du 1/4 au 1/512 dans un tampon physiologique.

7° Séro-neutralisation.

Deux souches (1 locale et la souche NEETHLING), non diluées, ont été mélangées à un égal volume de chaque sérum à tester dilué au 1/10^e et à du sérum normal témoin également dilué au 1/10^e. Les sérums à tester provenaient de veaux inoculés depuis 3 mois avec des broyats de nodules lyophilisés, chez lesquels il s'était formé une intense réaction locale (œdème et adénite), suivie d'une ascension thermique de quelques jours. Après une heure de neutralisation, les mélanges sérums-virus ont été inoculés aux cellules. L'observation des tubes a duré 5 jours pendant lesquels nous avons noté l'effet cytopathogène comparatif des deux virus.

8° Essai d'interférence avec le virus vaccinal.

L'immunisation contre la dermatose se faisant au Kenya grâce au virus de la clavelée (WEISS, 1964), nous nous sommes demandés si une primo-infection avec le virus vaccinal ne protégerait pas les veaux contre la dermatose nodulaire. Nous avons donc inoculé deux veaux avec du virus vaccinal lyophilisé, par voie intradermique. Puis 10 jours plus tard, ces veaux ont été éprou-

vés avec les virus de la dermatose, par injection sous-cutanée.

9° Remarques sur la conservation de ces souches.

Nous avons cherché à conserver les propriétés de ces souches (pouvoir pathogène, effet cytopathogène) en les lyophilisant, en les congelant, ou en les plaçant à 4 °C. Nous les avons lyophilisées et congelées, sous forme de nodules broyés, et de cultures cellulaires infectées. A 4 °C nous avons stocké les virus sous forme de cultures cellulaires infectées en tubes hermétiquement bouchés, et à l'abri de la lumière. Le contrôle de la vitalité a été fait sur culture cellulaire, et celui du pouvoir pathogène, par inoculation aux animaux.

RÉSULTATS

1° Comportement des souches sur cellules rénales de lapin.

a) Souches Sud-Africaines.

Le virus NEETHLING s'est multiplié avec effet cytopathogène sur cellules rénales de lapin. Les virus ALLERTON et BZD n'ont provoqué aucun effet cytopathogène sur ces mêmes cellules et il ne semble pas qu'ils s'y soient développés. L'effet cytopathogène du virus NEETHLING a été beaucoup plus rapide et plus complet que sur cellules rénales de veau, tout au moins sur la souche cellulaire de rein de veau que nous possédons. Au 1^{er} passage sur cellules rénales de lapin, l'effet cytopathogène a débuté aux 3^e-4^e jours. Il s'est formé des amas denses de cellules grises, peu réfringentes, plus ou moins arrondies ou en fuseau. Ces amas étaient dispersés dans toute la nappe, et non plus seulement en bordure comme sur les cellules rénales de veau. Entre ces amas, la nappe se rétractait, s'effiloçait ; les trous s'agrandissaient. Les cellules arrondies se détachaient du verre. En 2 ou 3 jours, la nappe a été complètement détruite. Il ne restait que quelques îlots de cellules pycnotiques et granuleuses encore fixées au verre. Cet effet cytopathogène à son début est représenté sur la photo n° 1, par comparaison avec la photo n° 2 (cellules non inoculées).



Photo 1. — Effet cytopathogène du virus NEETHLING sur les cellules rénales de lapin. Hématéine-éosine.



Photo 2. — Cellules rénales de lapin non inoculées. Hématéine-éosine.

Le virus NEETHLING a provoqué la formation dans les cellules rénales de lapin d'inclusions cytoplasmiques acidophiles analogues à celles induites dans les cellules rénales de veau. Ces inclusions étaient entourées d'un halo chromophile clair ainsi que le montre la photo n° 3.

Il est à remarquer que, seul parmi les 3 types Sud-Africains, le virus NEETHLING provoque un effet cytopathogène sur cellules rénales de

lapin. Ce caractère pourrait, s'il en était besoin, servir de diagnostic différentiel entre les 3 types.

b) *Souches locales.*

Isolées sur cellules rénales de veau, elles ont pu être passées avec succès sur cellules rénales de lapin. L'effet cytopathogène a été aussi rapide à partir du 10^e passage, qu'avec le virus NEETHLING. Il était identique et aussi complet (Photo



Photo 3. — Inclusions cytoplasmiques éosinophiles induites par le virus NEETHLING dans les cellules rénales de lapin.



Photo 4. — Effet cytopathogène de la souche locale 507.

n° 4). La coloration des cellules à l'hématéine-éosine montrait les mêmes inclusions cytoplasmiques éosinophiles (Photo n° 5).

2° Influence de divers facteurs sur le titre du virus.

— La température d'incubation : A 35 °C le résultat n'a pas été meilleur qu'à 37 °C, et l'effet cytopathogène serait plutôt retardé.

— La composition du milieu de base : Il n'y a pas eu de grandes variations dans le titre selon que l'on utilisait le BEM (Basal Eagle Medium), le MEM (Minimum Essential Medium), le milieu 199, le milieu à l'hydrolysate de caséine, le milieu de SCHWOBEL. C'est encore avec le milieu BEM que nous avons eu les résultats les plus constants.

Les titres habituels étaient de l'ordre de $10^{8,5}$ à $10^{4,5}$ DICT50 par ml.

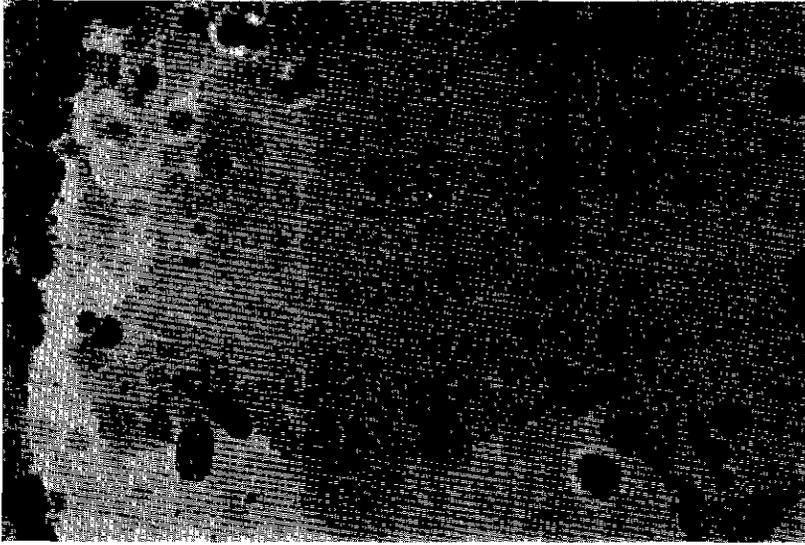


Photo 5. — Inclusions cytoplasmiques.

— La richesse du milieu en sérum : Le sérum normal jusqu'à la concentration de 5 p. 100 n'inhibe pas le développement viral. Il est préférable d'adjoindre du sérum (de 2 à 5 p. 100) au milieu d'entretien, car les cellules ont bien meilleur aspect, et il ne se produit pas de lyse non spécifique.

— L'augmentation de la concentration en hydrolysate de lactalbumine ne nous a pas donné de bons résultats. A 2 p. 1000 — concentration optimale indiquée par WEISS (1959) — l'hydrolysate de lactalbumine provoque une lyse non spécifique des cellules rénales de lapin.

3° Pouvoir pathogène des souches passées sur cellules rénales de lapin.

a) Description clinique de la maladie expérimentale.

Les veaux inoculés avec les virus NEETHLING et locaux ont présenté des symptômes plus ou moins graves rappelant la maladie naturelle. Deux, en particulier, se sont remis difficilement après une évolution clinique caractéristique. L'un avait reçu la souche NEETHLING au 12^e passage sur cellules rénales de lapin ; l'autre, la souche locale 507 au 9^e passage. Au 6^e jour après l'inoculation, leur température est montée à 40 °C et 40,5 °C. Ces veaux étaient prostrés, dyspnéiques et anorexiques. Au point d'inocu-

lation s'est formé un œdème inflammatoire assez étendu, douloureux et dur. Une sécrétion mucopurulente s'écoulait des naseaux et des yeux. Les ganglions précuraux, préscapulaires et sous-maxillaires étaient douloureux et fortement hypertrophiés. L'éruption nodulaire cutanée apparue au 7^e jour après l'inoculation, est allée en s'amplifiant : d'abord hérissément des poils sur l'encolure et le dos, formation de petits nodules perceptibles à la palpation au niveau de l'encolure, du dos, des joues, apparition d'autres nodules sur le périnée, les cuisses, les pattes, le flanc, le thorax ; en fin d'évolution, formation d'ulcères purulents sur le museau et dans les naseaux. L'état général des veaux a été très affecté, notamment pour celui ayant reçu la souche NEETHLING. La maladie a duré une quinzaine de jours ; les veaux ont cependant guéri sans aucun traitement. La symptomatologie observée sur ces deux veaux a été identique à celle classiquement décrite pour la dermatose nodulaire. La maladie a donc été reproduite sur des animaux réceptifs, avec des souches virales ayant subi un certain nombre de passages sur cellules hétérologues. Il est à remarquer que le virus 507 isolé d'une éruption bénigne sur zébu a pourtant causé une infection généralisée assez grave sur un jeune bovin sensible. Ce qui montre la particulière réceptivité du jeune animal, surtout s'il est de race sélectionnée.

Les virus responsables ont été isolés sur les veaux inoculés expérimentalement, mais seulement à partir de nodules cutanés. Nous n'avons pas pu les retrouver dans le sang, bien que nous ayons prélevé du sang au début de la période d'hyperthermie. Les virus extraits des nodules se sont montrés cytopathogènes au premier passage sur cellules rénales de lapin. Ces résultats démontrent donc que les virus isolés sur cellules rénales de veau, et passés sur cellules

rénales de lapin sont bien agents de la dermatose nodulaire et qu'ils se comportent comme la souche NEETHLING.

b) *Pouvoir pathogène en fonction du nombre de passages sur cellules rénales de lapin.*

Jusqu'à maintenant, nous n'avons pas pu obtenir d'atténuation complète de ces souches après passages sur cellules rénales de lapin, ainsi que le montre le tableau I.

TABLEAU I

Pouvoir pathogène des souches passées sur cellules rénales de lapin

Race	Age	Nombre	Souche	Voie d'inoculation	Inoculum	Volume	Réaction
Friesland	2 mois	1	Neethling 12ème passage sur cellules rénales de lapin	sous-cutanée	Culture cellulaire conservée 24 h à +4°	3 ml	+++
Friesland	2 mois	1	Souche locale 507 9ème passage sur cellules rénales de lapin	sous-cutanée	Culture cellulaire conservée 24 h à +4°	3 ml	+++
Friesland	2 mois	1	Neethling 12ème passage sur cellules rénales de lapin	sous-cutanée	Culture cellulaire conservée 2 mois à +4°	3 ml	+
Friesland	2 mois	1	Neethling 15ème passage sur cellules rénales de lapin	sous-cutanée	Culture cellulaire conservée 2 mois à +4°	3 ml	+
Friesland	2 mois	1	Souche locale 507 3ème passage sur cellules rénales de lapin	sous-cutanée	Culture cellulaire conservée 2 mois à +4°	1,5 ml	+
Friesland	2 mois	4	Mélange de souches lyophilisées	sous-cutanée	Culture cellulaire lyophilisée depuis 4 mois	3 ml	++
Friesland	2 mois	1	Neethling 27ème passage sur cellules rénales de lapin	sous-cutanée	Culture cellulaire en fin d'observation (ECP maximum)	3 ml	++
Métis	2 mois	1	Souche locale 507 21ème passage sur cellules rénales de lapin	sous-cutanée	Culture cellulaire en fin d'observation (ECP maximum)	3 ml	+++
Métis	2 mois	1	Souche locale 537 21ème passage sur cellules rénales de lapin	sous-cutanée	Culture cellulaire en fin d'observation (ECP maximum)	3 ml	++

Légende : +

Oedème local au point d'injection, hyperthermie

++

Oedème local, hyperthermie, réaction ganglionnaire, rares nodules.

+++

idem ++, mais nodules nombreux

+++

Oedème local, hyperthermie, réaction ganglionnaire, nombreux nodules, sécrétion oculo-nasale muco-purulente, amaigrissement marqué, état général affecté.

Nous constatons d'après ce tableau que, même après 21 passages (souches locales) ou 27 passages (NEETHLING) sur cellules rénales de lapin, les souches demeurent encore relativement pathogènes pour les veaux. Il est possible que le nombre de passages soit insuffisant pour une atténuation plus marquée, ou même que les passages sur cellules rénales de lapin n'entraînent aucune atténuation de ces souches. Nous continuons les passages pour nous en rendre compte.

c) *Inoculation des animaux de laboratoire.*

Aucun des animaux de laboratoire inoculés avec les souches locales ou NEETHLING n'a présenté de symptôme particulier. Il semble donc que ces virus ne soient pas pathogènes pour les animaux de laboratoire.

4° **Nature de l'acide nucléique.**

Les souches locales et NEETHLING ne se sont pas multipliées sur cellules rénales de lapin, en présence de 5-Bromo désoxyuridine. De même, le virus vaccinal a été inhibé complètement à partir de la dilution 10^{-8} , comme inoculum. Nous en concluons que l'acide nucléique des souches locales et NEETHLING est de l'acide désoxyribonucléique.

5° **Hémagglutination.**

Aucune des souches examinées ne s'est montrée hémagglutinante pour les hématies de veau, mouton, lapin, poulet et souris.

6° **Séro-neutralisation.**

La teneur en anticorps des sérums utilisés était faible. A la dilution au $1/10^6$, un sérum neutralisait complètement les 2 souches, 3 sérums neutralisaient presque entièrement, 2 sérums neutralisaient très peu. Les 2 souches étaient neutralisées d'une façon analogue, ce qui confirme leur parenté présumée d'après leur effet cytopathogène.

7° **Essai d'interférence avec le virus vaccinal.**

Les inoculations à des veaux ont montré que la primo-infection par le virus vaccinal ne protégeait pas ceux-ci contre une surinfection avec le virus de la dermatose nodulaire. Le résultat

nous a un peu surpris, compte tenu du fait qu'au Kenya on vaccine contre la dermatose nodulaire grâce au virus claveux (WEISS, 1964), et qu'il semblait donc y avoir une parenté assez proche entre le virus de la dermatose et ceux du groupe POX. Cependant une étude récente (LIEBERMAN, 1968) a montré qu'il n'y avait pas de parenté immunologique étroite entre le virus de la dermatose nodulaire et certains virus du groupe POX, dont en particulier le virus vaccinal. Ce qui est en accord avec nos propres résultats.

8° **Vitalité des souches après conservation**

Le contrôle de vitalité des souches conservées en culture cellulaire ou sous forme de nodules broyés nous a donné les résultats suivants :

A 4°C , à l'obscurité et en tubes bouchés hermétiquement, le virus de culture cellulaire se conserve au moins pendant 6 mois. Au congélateur (-20°C), les cultures cellulaires lyophilisées (sans excipient) gardent leur virulence au moins pendant 7 mois. Un échantillon a perdu son infectiosité après 10 mois. Les nodules lyophilisés peuvent conserver le virus pendant 9 mois. Il semble, d'après plusieurs essais, que le virus se conserve très mal dans les cultures cellulaires congelées.

CONCLUSION

Les souches virales de dermatose nodulaire malgache présentent des caractères identiques à ceux de la souche NEETHLING Sud-Africaine : adaptabilité aux cellules rénales de lapin, formation d'inclusions dans ces cellules, séro-neutralisation comparable, pouvoir pathogène similaire, acide nucléique identique, absence de propriété hémagglutinante. Ces souches sont nettement distinctes des virus ALLERTON et BZD, lesquels d'autre part ne s'adaptent pas aux cellules rénales de lapin. Elles n'ont pas de parenté immunologique proche avec le virus vaccinal, bien que celui-ci provoque sur cellules rénales de lapin un effet cytopathogène identique, et qu'il comporte également de l'ADN.

Institut d'Élevage et de Médecine vétérinaire des Pays tropicaux, Laboratoire Central de l'Élevage, Tananarive.

SUMMARY

Adaptation to the rabbit renal cells of viruses associated
with the bovine lumpy skin disease

The local and NEETHLING strains, agents of lumpy skin disease were adapted to the rabbit renal cells. They induce the cell destruction and the development of cytoplasmic inclusions. After a number of passages, the viral strains are still pathogenic for calf. The sero-neutralization shows the identity between the local and NEETHLING strains. They are not hemagglutinants ; their nucleic acid is DNA.

RESUMEN

Adaptación a las células renales del conejo de virus asociados
con la dermatosis nodular de los bovinos

Se adaptaron las cepas locales y NEETHLING, agentes de la dermatosis nodular, a las células renales del conejo. Provocan la destrucción de las células y la formación de inclusiones citoplasmicas. Después de un cierto número de pasajes, las cepas virales son todavía patógenas para el ternero. La sero-neutralización muestra la identidad entre las cepas locales y NEETHLING. No son hemagglutinantes. Su ácido nucleico es el ADN.

BIBLIOGRAPHIE

- ALEXANDER (R. A.), et HAIG (D. A.). — Travail non publié, 1956.
- ALEXANDER (R. A.), PLOWRIGHT (W.) et HAIG (D. A.). — **Cytopathogenic agents associated with lumpy skin disease.** *Bull. Epizoot. Dis. Africa*, 1957, 5 (4), 489-492.
- HAIG (D. A.). — **Lumpy skin disease.** *Bull. Epizoot. Dis. Africa*, 1949, 1957, 5 (4), 421-430.
- LANGE (M. de). — **The histology of the cytopathogenic changes produced in monolayers epithelial cultures by viruses associated with lumpy skin disease.** *Onderstepoort. J. Vet. Res.*, 1959, 28 (2), 245-255.
- LIEBERMAN (H.). — **Comparative immuno-histological studies on cell-cultures infected with para-vaccinia viruses.** *Vet. Bull.*, 1968, 38, p. 684.
- PRYDIE (J.) et COACKLEY (W.). — **Lumpy skin disease. Tissue cultures studies.** *Bull. Epizoot. Dis. Africa*, 1959, 7 (1), 37-50.
- VAN DEN ENDE (M.), ALEXANDER (R. A.), DON (P.) et KIPPS (A.). — **Isolation in chicken embryo of a filterable agent possibly related etiologically to lumpy skin disease of cattle.** *Nature*, 1948, 161, 4092, 526.
- VAN ROOYEN (P. J.), KUMM (N. A. L.), WEISS (K. E.) et ALEXANDER (R. A.). — **A preliminary note on the adaptation of a strain of lumpy skin disease virus to propagation in embryonated eggs.** *Bull. Epizoot. Dis. Africa*, 1959, 7 (1), 79-85.
- WEISS (K. E.) et GEYER (S. M.). — **The effect of lactalbumin hydrolysate on the cytopathogenesis of lumpy skin disease virus in tissue culture.** *Bull. Epizoot. Dis. Africa*, 1959, 7 (3), 243-254.
- WEISS (K. E.). — **La dermatose nodulaire in : Maladies nouvelles des animaux.** Rome, FAO (Etude agricole, n° 61), 1964, pp. 189-216.