

E. Eyangang<sup>1</sup>P. Jetteur<sup>1</sup>E. Thiry<sup>2</sup>G. Wellemans<sup>3</sup>J. Dubuisson<sup>2</sup>E. Van Opdenbosch<sup>3</sup>S. Makumbu<sup>1</sup>P. -P. Pastoret<sup>2</sup>

# Recherche des anticorps dirigés contre les BHV-1, BHV-2, BHV-4, le virus BVD-MD, les adénovirus A et B, le rotavirus et le coronavirus bovins chez des bovins de l'Ouest du Zaïre : résultats complémentaires

EYANGA (E.), JETTEUR (P.), THIRY (E.), WELLEMANS (G.), DUBUISSON (J.), VAN OPDENBOSCH (E.), MAKUMBU (S.), PASTORET (P. -P.). Recherche des anticorps dirigés contre les BHV-1, BHV-2, BHV-4, le virus BVD-MD, les adénovirus A et B, le rotavirus et le coronavirus bovins chez des bovins de l'Ouest du Zaïre : résultats complémentaires. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1989, 42 (2) : 155-161.

Une enquête sérologique a été réalisée sur 200 sérums de bovins de l'Ouest du Zaïre envers 8 virus : BHV-1, BHV-2, BHV-4, virus BVD-MD, adénovirus bovins A et B, rotavirus bovin et coronavirus bovin. Des sérums positifs ont été trouvés vis-à-vis de tous ces virus. Pour les animaux dont l'origine est certaine, les résultats les plus marquants sont la haute fréquence des infections par le rotavirus et le BHV-4 et la rareté de celles par le virus BVD-MD et le coronavirus. *Mots clés* : Bovin - Sérologie - Herpesvirus bovin - Diarrhée à virus des bovins - Maladie des muqueuses - Adénovirus - Rotavirus - Coronavirus - Zaïre.

## INTRODUCTION

Lors d'une enquête précédente (12), les prévalences des infections par le *bovine herpesvirus 1* (BHV-1), le virus de la maladie des muqueuses, le virus para-influenza 3, le virus respiratoire syncytial bovin et le virus bovine pestique ont été déterminées dans la population bovine de l'Ouest du Zaïre. Cette enquête a été étendue à d'autres virus. En conséquence, la présence d'anticorps contre les virus suivants a été recherchée : virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (*bovine herpesvirus 1*, BHV-1), virus de la thélite herpétique bovine (*bovine herpesvirus 2*, BHV-2), *bovine herpesvirus 4* (BHV-4), virus de la diarrhée virale bovine - maladie des muqueuses (virus BVD-MD), adénovirus bovins A et B, rotavirus bovin et coronavirus bovin. Chaque sérum a été testé par deux ou trois méthodes différentes qui ont été comparées. Les tests ont été effectués à l'Institut National des Recherches Vétéri-

naires (INRV) à Bruxelles (Belgique) et au service de Virologie de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège à Bruxelles (Belgique) et éventuellement comparés à ceux précédemment obtenus (12) au laboratoire vétérinaire (Labovet) de Kinshasa (Zaïre).

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Sérums

Les sérums examinés, au nombre de 208, proviennent de 18 élevages privés de type extensif ; 159 sérums sont originaires de 14 élevages du Bas-Zaïre et du Bandundu (type I) : la taille de ces élevages varie ; elle est connue avec certitude pour 8 d'entre eux : 16, 20, 50, 64, 67, 72, 800 et 2 142 animaux. Cinq élevages ont une taille variant entre 100 et 400 têtes. Le dernier lot de sérum provient de plusieurs élevages dont la taille varie entre 150 et 300 animaux. Dix-neuf sérums ont été prélevés dans 2 grosses exploitations de type industriel du Bas-Zaïre (type II) (de 15 000 et 30 000 animaux) et 30 sérums de 2 arrivages d'animaux abattus à Kinshasa et déclarés originaires de Libenge, ville de la région de l'Équateur située à la frontière de la République Centrafricaine (type III). Dans cette région, la taille des troupeaux est d'environ 500 animaux. Les sérums ont été prélevés sur le terrain lors des visites dans les élevages et dans deux abattoirs de Kinshasa. Après décomplémentation à 56 °C pendant 30 minutes, les sérums ont été conservés à -20 °C.

### *Bovine herpesvirus 1*

Les sérums ont été titrés par séroneutralisation en microplaque avec la souche Los Angeles et la lignée cellulaire Georgia Bovine Kidney (GBK) selon une procédure déjà décrite (U.Lg., 28). Les titres égaux ou supérieurs à 1/8 ont été considérés positifs. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus auparavant par séroneutralisation en tube (Labovet, 12) sur ces mêmes sérums testés à la dilution 1/5 avec la souche IPV 3760 (2) et des cellules secondaires de rein de veau. Les résultats repris dans les tableaux sont ceux de la microméthode.

1. Laboratoire Vétérinaire de Kinshasa, BP 8842, Kinshasa I, Zaïre.

2. Service de Virologie-Immunologie, Faculté de Médecine vétérinaire, U.Lg., 45 rue des Vétérinaires, 1070 Bruxelles, Belgique.

3. Institut National de Recherches Vétérinaires, 99 Groeselenberg, 1180 Bruxelles, Belgique.

Reçu le 02.08.88, accepté le 25.10.88

E. Eyanga, P. Jetteur, E. Thiry, G. Wellemans, J. Dubuisson, E. Van Opdenbosch, S. Makumbu, P. -P. Pastoret

### **Bovine herpesvirus 2**

Les sérums ont été titrés par séroneutralisation en microplaque à virus constant (U.Lg.) et à sérum constant (INRV). Pour la première méthode, les sérums ont été testés avec la souche 69/ILO sur la lignée GBK comme déjà décrit (28). Pour la seconde méthode, des volumes de 50  $\mu$ l de sérum dilué 10 fois sont mis en contact dans un puits de microplaque avec un même volume de dilution d'ordre 10 de la souche TVA durant deux heures à 37 °C, après quoi des cellules secondaires de testicule de veau sont ajoutées (32). La lecture est effectuée après 4 jours et un indice de neutralisation est calculé d'après le titre du virus d'épreuve. Un titre de 1/8 et un indice de neutralisation de 1 ont été considérés positifs. Les tableaux ne reprennent que les sérums simultanément positifs pour les deux tests.

### **Bovid herpesvirus 4**

Les sérums ont été testés par immunofluorescence indirecte selon deux méthodes. Pour la première (U.Lg.), le sérum dilué 20 fois puis selon une raison d'ordre 4, est titré au moyen de la souche V. Test (27) multipliée sur la lignée GBK cultivée en microplaque (28). Pour la seconde méthode (INRV), le sérum dilué 100 fois est testé au moyen de la souche LVR 140 (31) cultivée sur cellules secondaires de rein de foetus bovin ou sur la lignée PK 15. Les cellules infectées sont déposées sur des lames à cupules et le test est réalisé comme déjà décrit (36). Les tableaux reprennent les sérums positifs à la dilution 1/20 avec la première méthode.

### **Virus de la diarrhée virale bovine - maladie des muqueuses**

Les sérums ont été testés par immunodiffusion en gélose (INRV) et par immunofluorescence indirecte (INRV). L'immunodiffusion a été effectuée comme déjà décrit (29), l'antigène étant préparé par multiplication de la souche NADL sur cellules secondaires de rein de foetus bovin. L'immunofluorescence indirecte a été réalisée sur lame à cupules avec la souche Oregon C 24 multipliée sur culture de cellules secondaires de rein de foetus bovin ou de testicule de veau (35). Les résultats ont été comparés à ceux obtenus précédemment par séroneutralisation en microplaque (Labovet, 12) sur les sérums testés à la dilution 1/5 avec la souche NADL et des cellules secondaires de rein de veau. Les tableaux reprennent les résultats de l'immunodiffusion.

### **Adénovirus A et B**

Les sérums ont été testés par immunodiffusion en

gélose (INRV, 33), l'antigène étant produit par multiplication des souches WBR 1 et Mink respectivement sur cellules secondaires de rein de foetus bovin et de testicule de veau.

### **Rotavirus**

Les sérums ont été testés par immunodiffusion en gélose (INRV) et par immunofluorescence indirecte sur lame à cupules (INRV). L'antigène pour immunodiffusion est obtenu avec des matières fécales de veau et contrôlé selon VAN OPDENBOSH *et al.* (30). Les lames pour immunofluorescence indirecte (35) sont préparées par multiplication de la souche Q3 sur cellules PK 15. Les tableaux reprennent les sérums positifs à la dilution 1/20 en immunofluorescence indirecte.

### **Coronavirus**

Les sérums ont été testés par immunofluorescence indirecte sur lame à cupules avec la souche EV 800 (34) multipliée sur la lignée cellulaire HRT (*Human Rectal Tumour*) selon une méthode déjà décrite (INRV, 35). Les tableaux reprennent les sérums positifs à la dilution 1/20.

### **Analyse des résultats**

La sensibilité, la spécificité, la concordance (kappa) et le coefficient de corrélation entre deux tests ont été estimés selon MARTIN et collab. (15) et SNEDECOR et COCHRAN (25). Un effet de l'origine des animaux sur les pourcentages de sérums positifs a été recherché par un test d'homogénéité de proportions (Chi carré) selon SNEDECOR et COCHRAN (15). Un effet de l'origine des animaux sur le titre des sérums positifs a été recherché par analyse de variance et par la méthode de Scheffe (25).

## **RÉSULTATS**

Les comparaisons de deux tests différents pour un même virus sont reprises dans le tableau I. Les résultats de l'immunofluorescence indirecte envers le virus BVD-MD ne sont pas exposés, la concordance avec la séroneutralisation et l'immunodiffusion étant trop faible (kappa de 0,12 et 0,26 respectivement).

Les pourcentages des troupeaux de type I présentant au moins un sérum positif envers les divers virus sont détaillés dans le tableau II. Les deux troupeaux positifs pour le virus BVD-MD ne présentent chacun qu'un

**TABLEAU I** Comparaison des tests utilisés pour un même virus (*n* : nombre de sérums examinés, SN : séroneutralisation ; IFI : immunofluorescence indirecte, ID : immunodiffusion). La sensibilité et la spécificité sont celles du premier test par rapport au second.

	Sensibilité	Spécificité	Concordance (kappa)	Coefficient de corrélation (r)
BHV-1 SN en tube/ SN en microplaque n = 191	0,66	0,95	0,63	—
BHV-2 SN virus var./ SN virus const. n = 207 (kappa) et 44 (r)	—	—	0,99	0,81
BHV-4 IFI sur lame/ IFI sur microplaque n = 203	0,80	0,98	0,70	—
Virus BVD-MD ID/SN en microplaque n = 166	0,80	0,99	0,83	—
Rotavirus ID/IFI sur lame n = 206	0,62	0,89	0,42	—

**TABLEAU II** Nombre de troupeaux de types I, II, III présentant au moins un animal séropositif envers les différents virus étudiés. *n* : nombre de troupeaux positifs ; *N* : nombre total de troupeaux.

Virus Type	BHV-1	BHV-2	BHV-4	Rota	Adéno A	Adéno B	BVD-MD	Corona
Type I N = 14 n P. 100	11 79	3 21	14 100	13 93	11 79	13 93	2 14	3 21
Type II N = 2 n	2	2	2	2	1	1	0	2
Type III N = 2 n	2	2	2	2	2	2	2	2

seul sérum positif en immunodiffusion, les deux sérums étant par ailleurs négatifs en séroneutralisation et un seul positif en immunofluorescence indirecte à la dilution minimale testée (1/20). Deux des trois troupeaux positifs pour le coronavirus ne présentent chacun qu'un seul sérum positif (titres de 1/320 et 1/20). Pour le seul troupeau négatif envers le rotavirus, trois sérums seulement ont pu être examinés. Le

tableau III reprend les pourcentages d'animaux infectés selon le type d'élevage et le virus.

Les titres moyens (log 2) obtenus sur les sérums positifs ne dépendent pas du type d'élevage, sauf en ce qui concerne le rotavirus où la moyenne des titres pour les élevages de type I est inférieure (6,8,  $P < 0,01$ ) à celle des élevages de type II (8,5) et III (8,1). A titre indicatif, les résultats moyens sont les suivants : 4,7 pour le BHV-1, 6,9 pour le BHV-2 (U.Lg.), 8,0 pour le BHV-4, 7,3 pour le rotavirus et 7,2 pour le coronavirus.

Bien que les résultats du test d'immunofluorescence indirecte envers le BVD-MD doivent être considérés avec prudence, les élevages peuvent être répartis en 4 catégories : un élevage (type III) positif en immunodiffusion et séroneutralisation, 6 élevages (type I) positifs en immunofluorescence indirecte, un élevage (type III) positif pour les trois tests et 10 élevages (types I et III) négatifs pour les trois tests.

## DISCUSSION

En ce qui concerne le BHV-1, la séroneutralisation en microplaque était effectuée sur le sérum dilué 8 fois. Il y a donc peu de risque d'observer une neutralisation

E. Eyanga, P. Jetteur, E. Thiry, G. Wellemans, J. Dubuisson, E. Van Opdenbosch, S. Makumbu, P. -P. Pastoret

**TABLEAU III** Nombre de sérums examinés (*n*) et pourcentage de sérums positifs (*p. 100*) concernant les divers virus selon le type d'élevage. Pour un même virus, deux pourcentages répertoriés par des lettres différentes (<sup>a,b,c</sup>) présentent une différence statistiquement significative ( $P < 0,01$ ).

Virus	Type d'élevage	Elevage type I	Elevage type II	Elevage type III	Total
BHV-1	P. 100	37 <sup>a</sup>	89 <sup>b</sup>	73 <sup>b</sup>	47
	<i>n</i>	159	19	30	208
BHV-2	P. 100	5 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	57 <sup>c</sup>	21
	<i>n</i>	159	19	30	208
BHV-4	P. 100	60 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	70
	<i>n</i>	159	19	30	208
BVD-MD	P. 100	1 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	77 <sup>b</sup>	12
	<i>n</i>	159	19	30	208
Adénovirus A	P. 100	46 <sup>a</sup>	26 <sup>a</sup>	43 <sup>a</sup>	44
	<i>n</i>	158	19	30	207
Adénovirus B	P. 100	39 <sup>a</sup>	37 <sup>a</sup>	17 <sup>a</sup>	35
	<i>n</i>	158	19	30	207
Rotavirus	P. 100	65 <sup>a</sup>	95 <sup>ab</sup>	100 <sup>b</sup>	72
	<i>n</i>	158	19	30	207
Coronavirus	P. 100	4 <sup>a</sup>	21 <sup>a</sup>	66 <sup>b</sup>	16
	<i>n</i>	131	19	29	179

non spécifique et la concordance moyenne (kappa de 0.63) avec le test en tube doit être attribuée à une moindre sensibilité de ce dernier. La méthode en microplaque étant en outre moins exigeante en réactifs et en main-d'oeuvre, il y a tout lieu de la préférer.

L'infection par le BHV-1 est fréquente, comme déjà observé, dans la région étudiée (12) et dans divers pays limitrophes (8, 9, 13, 20, 22, 24), mais aucune affection clinique, sinon des vaginites (VERGHEENST et MARCHOT, communications personnelles), ne lui a été attribuée jusqu'ici au Zaïre.

Pour les séroneutralisations en microplaque envers le BHV-2, la concordance et la corrélation entre les deux tests sont très satisfaisantes et il n'y a pas lieu de préférer l'un à l'autre. L'infection et son expression clinique ont été diagnostiquées dans des pays voisins (7, 11, 17). Dans la région étudiée ici, l'infection semble rare, du moins dans les élevages de type I, et son existence clinique reste à prouver d'autant qu'un problème de diagnostic différentiel se pose avec la

maladie nodulaire cutanée (*lumpy skin disease*) déjà identifiée (14).

Au niveau individuel, le test d'immunofluorescence indirecte sur lame à cupules envers le BHV-4 apparaît très spécifique mais moins sensible que le test en microplaque pris comme référence, mais il s'agit là d'un choix arbitraire motivé par la plus grande facilité de lecture. La sensibilité du test sur lame à cupules pourrait être augmentée en testant le sérum à la dilution 1/20 comme pour le test en microplaque mais le résultat sur la spécificité est inconnu. Au niveau du troupeau, le test sur lame à cupules a détecté 17 et 18 troupeaux positifs avec le test en microplaque mais la spécificité n'a pu être estimée car tous les troupeaux étaient positifs avec cette dernière méthode. La méthode sur lame à cupules présente donc l'avantage d'une préparation plus facile de l'antigène et d'une très bonne spécificité tout en étant d'une sensibilité acceptable. L'infection par le BHV-4 est extrêmement fréquente au niveau de l'individu et du troupeau mais son importance économique est inconnue.

Pour le virus BVD-MD, le test d'immunodiffusion apparaît très spécifique et suffisamment sensible pour être utilisé comme moyen de détection rapide et simple (1, 23). D'après ce test et à l'exception des troupeaux de type III, l'infection semble quasiment inexistante comme déjà observé par séroneutralisation (12) et contrairement aux pays voisins (6, 19, 26). Cependant, les résultats d'une enquête sérologique réalisée par séroneutralisation pourraient dépendre de la souche choisie (5). L'immunofluorescence indirecte est moins sensible à un effet souche que la séroneutralisation (16) et, de plus, les deux tests ont été réalisés avec deux souches sérologiquement différentes (NADL et Oregon C 24) (4). En outre, l'immunofluorescence indirecte est habituellement plus sensible que l'immunodiffusion. Comme il semble enfin exister des souches particulières au plan antigénique en Afrique centrale (18, 21), on pourrait expliquer la présence de troupeaux positifs uniquement en immunofluorescence indirecte, par l'excès de spécificité de la séroneutralisation et le manque de sensibilité de l'immunodiffusion (mais ceci ne peut expliquer l'existence d'un troupeau positif en immunodiffusion et en séroneutralisation et négatif en immunofluorescence indirecte). Néanmoins, dans l'état actuel des connaissances, il semble que les différences antigéniques entre les souches de virus BVD-MD (10, 16) soient insuffisantes pour expliquer que, parmi plusieurs centaines d'animaux susceptibles d'être infectés par une souche, quasiment aucun (12) ne présente un sérum positif envers une autre souche, en l'occurrence celle utilisée dans le test de neutralisation.

Outre la trypanosomose, les diarrhées du nouveau-né et surtout des animaux âgés de quelques mois sont les affections graves les plus évidentes aux yeux des éleveurs. Les infections à rotavirus et adénovirus A et

B sont fréquentes dans la population étudiée.

Un isolement d'adénovirus bovin a d'ailleurs été réussi au Soudan (3). En revanche, peu d'animaux séropositifs envers le virus BVD-MD et le coronavirus bovin ont été identifiés. Pour le rotavirus, la concordance entre les deux tests utilisés est faible et l'immunofluorescence indirecte est à préférer. Dans les élevages de type I, le rotavirus pourrait utilement être recherché lors de diarrhée néonatale tandis que le coronavirus semble très rare.

Les deux élevages industriels du type II se caractérisent, par rapport à ceux du type I, par une plus grande fréquence d'animaux positifs pour les trois herpesvirus (et le rotavirus,  $0,01 < P < 0,05$ ) sans qu'on en connaisse les causes et les conséquences.

Les élevages du type III se distinguent par la fréquence élevée des infections par le coronavirus et surtout par le virus BVD-MD. En outre, ces animaux étant les seuls à être séropositifs pour la peste bovine (12), maladie inconnue actuellement dans la région de l'Équateur (Zaïre) et contre laquelle la vaccination n'est pas pratiquée, leur origine exacte reste incertaine.

EYANGA (E.), JETTEUR (P.), THIRY (E.), WELLEMANS (G.), DUBUISSON (J.), VAN OPDENBOSCH (E.), MAKUMBU (S.), PASTORET (P. -P.). Occurrence of antibodies directed against BHV-1, BHV-2, BHV-4, BVD-MD virus, bovine adenovirus A and B, rotavirus and coronavirus in cattle from western Zaire : complementary results. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1989, 42 (2) : 155-161.

Two hundred bovine sera from western Zaire were screened for antibodies to 8 viruses : BHV-1, BHV-2, BHV-4, BVD-MD virus, bovine adenovirus A and B, bovine rotavirus and bovine coronavirus. Positive sera were found to all these viruses. For animals whose origin was undoubted, the main features were the high prevalence of infections by rotavirus and BHV-4 and the low prevalence of infections by coronavirus and BVD-MD virus. *Key words* : Cattle - Serology - Bovine herpesvirus - Bovine viral diarrhoea - Mucosal disease - Adenovirus - Rotavirus - Coronavirus - Zaire.

## CONCLUSION

Les huit virus étudiés circulent tous dans la zone de l'enquête, au moins parmi certains des types d'élevages abordés. Il reste maintenant à évaluer leur importance clinique et économique, en particulier leur intervention dans les diarrhées du nouveau-né et du jeune de quelques mois qui sont deux des affections graves les plus fréquemment observées dans la pathologie courante.

## REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier D. G. Mc KERCHER (Davies, USA) pour la souche Los Angeles de BHV-1, C. CASTRUCCI (Perugia, Italie) pour la souche 69/ILO de BHV-2, R. GASKELL (Liverpool, Angleterre) pour la souche TVA de BHV-2, J. H. DARBYSHIRE (Weybridge, Angleterre) pour la souche WBR.1 d'adénovirus A et A. BARTA (Budapest, Hongrie) pour la souche Mink d'adénovirus B. Nous remercions également M. MUYS pour la dactylographie du manuscrit.

EYANGA (E.), JETTEUR (P.), THIRY (E.), WELLEMANS (G.), DUBUISSON (J.), VAN OPDENBOSCH (E.), MAKUMBU (S.), PASTORET (P. -P.). Investigaciones sobre la presencia de anticuerpos contra los virus BHV-1, BHV-2, BHV-4, BVD-MD, adenovirus A y B, rotavirus y coronavirus en los sueros de bovinos del oeste del Zaire : resultados complementarios. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1989, 42 (2) : 155-161.

Se hicieron investigaciones sobre 200 sueros de bovinos del oeste del Zaire en relación con 8 virus : BHV-1, BHV-2, BHV-4, BVD-MD virus, adenovirus A y B, rotavirus y coronavirus. Sueros positivos se encuentran en relación con todos esos virus. Para los animales cuyo origen es cierto, los resultados más notables son la alta frecuencia de las infecciones por el rotavirus y el BHV-4 así que las raras infecciones por el BVD-MD virus y el coronavirus. *Palabras claves* : Bovino - Serología - Herpesvirus bovinos - Diarrea viral bovina - Enfermedad de las mucosas - Adenovirus - Rotavirus - Coronavirus - Zaire.

## BIBLIOGRAPHIE

1. BOLIN (S. R.), Mc CLURKIN (A. W.), CORIA (M. F.). Frequency of persistent bovine viral diarrhoea virus infection in selected cattle herds. *Am. J. vet. Res.*, 1985, 46 (11) : 2385-2387.
2. BOUTERS (R.), VANDEPLASSCHE (M.), FLORENT (A.), LEUNEN (J.), DEVOS (A.). De ulcerouse balanoposthitis bij fokstieren. *Vlaams diergeneesk. Tijdschr.*, 1960, 29 (6) : 171-186.
3. EISA (M.). Isolation of bovine adenovirus type I in the Sudan. *Bull. epizoot. Dis. Afr.*, 1973, 21 (4) : 411-416.

E. Eyanga, P. Jetteur, E. Thiry, G. Wellemans, J. Dubuisson, E. Van Opendenbosch, S. Makumbu, P. -P. Pastoret

4. FERNELIUS (A. L.), LAMBERT (G.), BOOTH (D. G.). Bovine viral diarrhoea virus-host cell interactions : serotypes and their relationship to biotypes by cross neutralization. *Am. J. vet. Res.*, 1971, **32** (2) : 229-236.
5. HAFEZ (S. M.), LIESS (B.), FREY (H. -R.). Studies on the natural occurrence of neutralizing antibodies against six strains of bovine viral diarrhoea virus in field sera of cattle. *Zentbl. VetMed., B.*, 1976, **23** (8) : 669-677.
6. HAMBLIN (C.), HEDGER (R. S.). The prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea/mucosal disease virus in African wildlife. *Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis.*, 1979, **2** (2-3) : 295-303.
7. HAMBLIN (C.), HEDGER (R. S.). Prevalence of neutralizing antibodies to bovid herpesvirus 2 in African wildlife. *J. Wildl. Dis.*, 1982, **18** (4) : 429-436.
8. HASSAN (A. K. M.), KHALDA EL TOM. Combined natural infection with infectious bovine rhinotracheitis and rinderpest viruses. *Trop. Anim. Hlth Prod.*, 1985, **17** (1) : 52.
9. HEDGER (R. S.), HAMBLIN (C.). Neutralizing antibodies to bovid herpesvirus 1 (infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvo-vaginitis) in African wildlife with special reference to the cape buffalo (*Syncerus caffer*). *J. comp. Path.*, 1978, **88** (2) : 211-218.
10. HOWARD (C. J.), BROWNLIE (J.), CLARKE (M. C.). Comparison by the neutralisation assay of pairs of non-cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. *Vet. Microbiol.*, 1987, **13** (4) : 361-369.
11. HUYGELEN (C.). Allerton virus, a cytopathogenic agent associated with lumpy skin disease. I. Propagation in tissue cultures of bovine and ovine testis cells. *Zentbl. VetMed., B.*, 1960, **7** (6) : 664-670.
12. JETTEUR (P.), EYANGA (E.), MAKUMBU (S.). Enquête sérologique envers le virus bovine pestique, IBR-IPV, RSB, PI 3 et BVD-MD sur des bovins du Shaba et de l'Ouest du Zaïre. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1988, **41** (2) : 121-124.
13. KAMINJOLO (J. S.), PAULSEN (J.). The occurrence of virus neutralising antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus in sera from hippopotami and buffaloes. *Zentbl. VetMed., B.*, 1970, **17** (8) : 864-868.
14. LEFEVRE (P. C.), BONNET (J. B.), VALLAT (B.). La maladie nodulaire cutanée des bovins. I. Situation épidémiologique actuelle en Afrique. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1979, **32** (3) : 227-231.
15. MARTIN (S. W.), MEEK (A. H.), WILLEBERG (P.). Veterinary epidemiology. Ames, Iowa State University Press, 1987.
16. NETTLETON (P. F.). Pathogenesis and epidemiology of border disease. *Annls Rech. vét.*, 1987, **18** (2) : 147-155.
17. PLOWRIGHT (W.), JESSET (D. M.). Investigations of Allerton-type herpesvirus infection in East African game animals and cattle. *J. Hyg., Camb.*, 1971, **69** (2) : 209-222.
18. PROVOST (A.). Observations sur l'immunité dans la maladie des muqueuses en Afrique centrale. *Bull. mens. Soc. vét. prat. Fr.*, 1977, **61** (8) : 479-489.
19. PROVOST (A.), BOGEL (K.), BORREDON (C.), MAURICE (Y.). La maladie des muqueuses en Afrique centrale. Observations cliniques et épizootiologiques. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1967, **20** (1) : 27-49.
20. PROVOST (A.), BORREDON (C.), FERREOL (C.). Note sur la rhinotrachéite infectieuse bovine en Afrique centrale. Isolement du virus ; enquête sérologique. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1964, **17** (2) : 187-196.
21. PROVOST (A.), BORREDON (C.), MAURICE (Y.). Identité immunologique des souches isolées en Afrique centrale et des souches américano-européennes du virus de la maladie des muqueuses. *Annls Inst. Pasteur*, 1969, **117** (1) : 133-136.
22. RAMPTON (C. S.), JESSETT (D. M.). The prevalence of antibody to infectious bovine rhinotracheitis virus in some game animals of East Africa. *J. Wildl. Dis.*, 1976, **12** (1) : 2-6.
23. REUTER (R.), BOWDEN (M.), ELLIS (T.), CARMAN (H.). Abortion, stillbirth and illthrift in cattle associated with mucosal disease virus. *Aust. vet. J.*, 1987, **64** (3) : 92-93.
24. RWEYEMAMU (M. M.). The incidence of infectious bovine rhinotracheitis antibody in Tanzanian game animals and cattle. *Bull. epizoot. Dis. Afr.*, 1974, **22** (1) : 19-22.
25. SNEDECOR (G. W.), COCHRAN (W. G.). Statistical methods. Ames, Iowa State University Press, 1980.
26. TAYLOR (W. P.), RAMPTON (C. S.). A survey of cattle sera from Kenya and Uganda for antibodies to bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Rec.*, 1968, **83** (5) : 121-124.
27. THIRY (E.), PASTORET (P. -P.), DESSY-DOIZE (C.), HANZEN (C.), CALBERG-BACQ (C. M.), DAGENAIS (L.), VINDEVOGEL (H.), ECTORS (F.). Réactivation d'un herpesvirus en culture de cellules testiculaires prélevées chez un taureau atteint d'orchite et d'azoospermie. *Annls Méd. vét.*, 1981, **125** (3) : 207-214.
28. THIRY (E.), VERCOUTER (M.), DUBUISSON (J.), BARRAT (J.), SEPULCHRE (C.), GERARDY (C.), MEERSCHAERT (C.), COLLIN (B.), BLANCOU (J.), PASTORET (P. -P.). Serological survey of herpesvirus infections in wild ruminants of France and Belgium. *J. Wildl. Dis.*, 1988, **24** (2) : 268-273.
29. VAN AERT (A.), DEGRAEF (R.), WELLEMANS (G.). Purification and some properties of swine fever related

- mucosal disease precipitinogen. *Vlaams diergeneesk. Tijdschr.*, 1975, **44** (11) : 339-348.
30. VAN OPDENBOSCH (E.), DEKEGEL (E.), WELLEMANS (G.). De immunodiffusietest voor het opsporen van het Rotavirus in meststalen en darfragmenten. *Vlaams diergeneesk. Tijdschr.*, 1978, **47** (4) : 286-291.
  31. WELLEMANS (G.), ANTOINE (H.), BROES (A.), CHARLIER (G.), VAN OPDENBOSCH (E.). Isolement d'un virus Herpès chez des bovins atteints de métrite *post-partum*. *Annls Méd. vét.*, 1983, **127** (6) : 481-482.
  32. WELLEMANS (G.), BIRONT (P.), VAN OPDENBOSCH (E.). Spécificité du test d'immunofluorescence indirecte (IFI) dans la recherche des anticorps IBR chez des bovins vaccinés avec un vaccin Aujeszky. *Recl Méd. vét.*, 1980, **156** (12) : 911-914.
  33. WELLEMANS (G.), LEUNEN (J.). Adenovirussen en ademhalingsstoornissen bij runderen. *Vlaams diergeneesk. Tijdschr.*, 1968, **37** (3) : 125-131.
  34. WELLEMANS (G.), OYAERT (W.), MUYLLE (E.), THOENEN (H.), VAN OPDENBOSCH (E.). Isolatie van een coronavirus bij calveren. *Vlaams diergeneesk. Tijdschr.*, 1977, **46** (4) : 249-255.
  35. WELLEMANS (G.), VAN OPDENBOSCH (E.). *Post-partum* antibody levels for rota, corona and BVD virus in the cows milk. *Vlaams diergeneesk. Tijdschr.*, 1981, **50** (1) : 46-52.
  36. WELLEMANS (G.), VAN OPDENBOSCH (E.). Transmission horizontale du virus BHV-4 à des génisses. *Annls Méd. vét.*, 1987, **131** (6) : 487-491.