

INFECTION PERMANENTE SPERMATIQUE CHEZ LE TAUREAU, APRES INFECTION AIGUË PAR LE VIRUS DE LA DIARRHÉE VIRALE BOVINE *

Nathalie Pozzi ¹, Virginie Catinot ¹, Yves Charpentier ²,
Delphine Bouilloux ³ et Bernard Guérin ¹

RESUME

Chez le mâle, l'infection par le BVDV, aiguë ou permanente, se traduit par l'excrétion du virus dans le sperme. Cette excrétion est transitoire, en cas d'infection aiguë, et permanente pour un animal IPI.

Dans certains cas, chez le taureau, l'infection aiguë par le virus BVD évolue différemment du schéma classique en créant une infection spermatique permanente.

L'objectif de cette étude a consisté à évaluer la fréquence de ce phénomène en France et à étudier les caractéristiques de cette infection spermatique permanente.

La séroprévalence de la BVD a été déterminée sur 4 611 taureaux de la filière IA, et évaluée à 22,4% (soit 1 033 animaux séropositifs). Parmi ces 1 033 animaux, deux ont été trouvés infectés permanents spermatiques par la technique PCR, soit 1,9 p. mille.

L'étude a permis de montrer que les taux d'anticorps étaient stables pendant les six mois de l'étude, que tous les éjaculats étaient contaminés par le BVDV et que ce virus était infectant.

L'autopsie des trois taureaux a permis d'observer des localisations génitales dans les testicules, les épидидymes et les ampoules déférentielles.

Bien que l'étude ne porte que sur six mois, les observations effectuées permettent de conclure à une probable infection permanente spermatique chez le mâle après infection aiguë par le BVDV.

Cette conclusion implique l'élimination des taureaux de la filière IA en cas de contrôle positif sur la semence des taureaux séropositifs vis-à-vis du BVDV.

Mots-clés : BVDV, infection spermatique permanente, excrétion dans la semence.

SUMMARY

Acute or chronic BVDV infection on bulls is associated with BVDV excretion in the semen that can be transient in case of acute infection or permanent for a persistently infected animal. Under certain circumstances BVDV acute infection on bull can lead to a permanent spermatoc infection.

.../..

* Texte de la communication orale présentée lors des Journées AEEMA, 22-23 mai 2008

¹ Laboratoire national de contrôle des reproducteurs, 94704 Maisons-Alfort, France

² AMELIS, 14201 ST Manvieu, France

³ UMOTESTS, 01008 Ceyzériat, France

.../..

The objectives of this study were to evaluate the frequency of this kind of infection on AI bulls in France and to study the characteristics of the spermatoc permanent infection.

Seroprevalence of the BVD infection was investigated on 4611 AI bull serum samples and assessed to be 22,4% (1033 positive animals). Among them 2 were found to be persistently spermatoc infected by a PCR test (1,9 p. ‰).

Antibody rates were stable during the six month duration of the study. BVDV was detected in all the ejaculates collected during this period of time. Viral particles were infectious for culture cells.

After slaughter of three bulls suffering from a spermatoc persistent infection, BVDV genital localizations were found in the testis, epididymes and ampulla. Seminal vesicles were not found contaminated.

Despite the 6 months duration of the study, observations carried out are enough to conclude to a highly probable permanent spermatoc infection that can occur in male after an acute infection caused by the BVDV.

Consequently AI bulls found virus shedder in semen after a BVDV seroconversion have to be eliminated from the semen collection centers.

Keywords : BVDV, Spermatoc permanent infection, Semen excretion.



I - INTRODUCTION

Le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) est connu pour induire chez les bovins deux types d'infection : une infection aiguë et une infection permanente.

La maladie aiguë correspond à l'infection d'un animal adulte immunocompétent. Elle se déroule en trois phases parfaitement décrites : une phase d'incubation de cinq à six jours, une phase de virémie qui peut durer de quelques jours à quelques semaines et une phase d'immunité humorale qui est associée à l'apparition et au maintien des anticorps circulants sur le long terme. Le virus disparaît alors totalement de l'organisme [Pastoret *et al.*, 2003]. La phase de virémie est associée à la diffusion du virus dans tout l'organisme, à des concentrations qui varient entre 10^3 et 10^5 TCID₅₀. Le virus est également présent à ces mêmes concentrations dans les liquides biologiques qui constituent ainsi autant de matériels biologiques susceptibles d'entraîner la diffusion de l'infection dans un troupeau.

L'infection permanente est consécutive à l'infection du fœtus lorsqu'une femelle gestante indemne est infectée par le BVDV entre 30 et 150 jours de gestation. Dans ces conditions, si la gestation va jusqu'à son terme et que le veau est vivant et viable à la naissance, le jeune bovin présente les caractéristiques d'un animal infecté permanent immunotolérant. Le BVDV est alors présent de façon permanente, à des concentrations élevées (10^6 et 10^8 TCID₅₀), dans tout l'organisme du bovin infecté (sang, organes) et dans tous les liquides biologiques (urine, salive, larmes, jetage nasal, mucus vaginal, sperme). L'animal demeure séronégatif et excréteur permanent de virus pendant toute sa vie. Dans cet état sanitaire particulier, certains animaux présentent malgré tout une croissance et des caractéristiques zootechniques parfaitement normales.

L'excrétion virale étant permanente, ces animaux sont extrêmement dangereux puisqu'ils sont susceptibles de contaminer tous

les animaux sensibles avec lesquels ils sont en contact, ce risque étant particulièrement important pour les vaches gestantes dans les premiers mois de la gestation en raison des risques associés à la naissance d'animaux infectés permanents immunotolérants (IPI).

L'infection du taureau par le BVDV est décrite comme étant associée à l'excrétion dans le sperme, cette dernière étant temporaire ou permanente, selon que l'animal souffre d'une infection aiguë ou d'une infection permanente [Coria et Mc Clurkin, 1978 ; Barlow, 1986 ; Revell, 1988 ; Kirkland *et al.*, 1991].

Un premier cas d'infection spermatique permanente a été observé chez un taureau [Voges, 1998] en même temps qu'étaient rapportés par les services vétérinaires suédois, plusieurs résultats positifs en recherche de BVDV, obtenus sur des semences importées en provenance d'un pays de l'UE [Haard, 1999, comm. personnelle].

Ainsi, les caractéristiques particulières de la maladie, associées aux risques réels de

présence du virus dans le sperme et de transmission par la semence inséminée ont conduit les Etats Membres à renforcer le protocole de contrôle sanitaire de la BVD applicable aux taureaux de la filière insémination artificielle (directive 2003/43). Ces animaux sont donc soumis, avant leur entrée et pendant leur séjour dans les centres de collecte, à un protocole complexe qui a pour objectif de garantir un statut non virémique pour les taureaux admis en centre de collecte et un statut « indemne de BVDV » pour toutes les semences utilisées pour réaliser les inséminations (tableau 1).

La présente publication s'appuie sur les contrôles sanitaires effectués en 2007 en application de ce protocole réglementaire, qui permet de déterminer la prévalence de la BVD dans cette population animale, en même temps qu'elle précise les caractéristiques de l'infection spermatique permanente, consécutive à une infection aiguë, observée sur quelques animaux.

Tableau 1

Exigences sanitaires BVD applicables aux taureaux utilisés en monte publique artificielle

CONTROLES SANITAIRES EN STATION DE QUARANTAINE				
	Examens de laboratoire et résultats exigés			Dispositions particulières
1ère période en station de quarantaine (J0-J28)	Contrôle de la virémie avec résultat négatif	Contrôle sérologique (résultat négatif ou positif)		Néant
2ème période en station de quarantaine (J29-J56)	Contrôle de la virémie avec résultat négatif	Contrôle sérologique (résultat négatif ou positif) mais absence de séroconversion par rapport au 1er contrôle		En cas de séroconversion, maintien des animaux séronégatifs en quarantaine et contrôles supplémentaires (sérologie + virologie) destinés à éviter l'entrée des animaux virémiques en centre de collecte
CONTROLES SANITAIRES EN CENTRE DE COLLECTE				
	Examens de laboratoire et résultats exigés			Dispositions particulières
Contrôle sanitaire des animaux séropositifs	Contrôle de la virospermie avec résultat négatif sur le 1er éjaculat collecté en centre de collecte			Tout résultat positif entraîne l'élimination de l'animal.
Contrôle sanitaire annuel des animaux séronégatifs	Contrôle sérologique avec résultat négatif			Tout résultat positif implique le contrôle virologique de tous les éjaculats collectés depuis le dernier contrôle sérologique négatif ainsi que l'élimination de tous les éjaculats contaminés.

II - MATERIEL ET METHODES

1. MATERIEL ANIMAL

1.1. ETUDE DE LA SEROPREVALENCE ET DE LA PREVALENCE DE L'INFECTION SPERMATIQUE

4 611 taureaux adultes âgés de 1 à 8 ans, présents en 2006 dans les stations de quarantaine et dans les centres de collecte de semence, ont été soumis à un contrôle sérologique et virologique.

Un éjaculat de sperme de tous les taureaux séropositifs a été analysé pour la recherche du BVDV par la technique PCR sur le plasma séminal de chaque éjaculat.

1.2. ETUDE DE L'INFECTION SPERMATIQUE PERMANENTE

Trois taureaux séropositifs ont été utilisés pour cette partie de l'étude. Des prises de sang (tube sans anticoagulant) et des collectes de semence ont été réalisées chaque semaine.

Les prises de sang ont été utilisées pour la recherche des anticorps par la technique de séroneutralisation et pour les recherches de la virémie sur cultures cellulaires.

Les semences ont été analysées pour la recherche du BVDV par la technique PCR sur le plasma séminal.

1.3. ETUDES POST-MORTEM

Après abattage des 3 taureaux suivis pour l'étude de l'infection spermatique permanente, des prélèvements ont été réalisés sur les organes suivants : (1) testicules ; (2) tête, corps et queue des épидидymes ; (3) vésicules séminales ; (4) ampoules déférentielles.

2. METHODES

2.1. TRAITEMENT DES SEMENCES

Les récoltes de semence ont été effectuées par la technique classique du vagin artificiel.

Les semences fraîches ont été expédiées au laboratoire, immédiatement après la récolte, en colis isotherme et sous couvert du froid positif (5 à 8°C).

Les analyses ont été effectuées sur le plasma séminal, après centrifugation à 2 500 g pendant 10 minutes.

2.2. EXAMENS SEROLOGIQUES ET VIROLOGIQUES

Les examens sérologiques ont été effectués sur le sérum, après centrifugation à 2 500 g pendant 10 minutes, et par la méthode de séroneutralisation en culture cellulaire et mise en évidence du virus par immunofluorescence (norme AFNOR 2002).

Les examens virologiques ont été effectués par la méthode d'isolement du virus sur cultures cellulaires et mise en évidence du virus par immunofluorescence (X.02 Essai dérivé du VA 70 CNEVA, 1993).

2.3. PCR

Après extraction et purification (kit QIAam Viral RNA de QIAGEN), les examens de recherche d'ARN viral sont effectués par la technique PCR, utilisant le kit TaqVet du laboratoire LSI. Ce kit permet la détection d'une séquence de la région 5'UTR du génome viral du virus BVD. La présence de sondes marquées Taqman permet la lecture en temps réel à l'aide d'un Thermocycleur 7500 d'Applied Biosystems.

La spécificité du test PCR a été contrôlée sur 962 semences d'animaux séronégatifs.

III - RESULTATS

Les résultats obtenus dans la partie de l'étude relative à la séroprévalence montre que 1 033 taureaux ont été trouvés porteurs d'anticorps

spécifiques du virus BVD, ce qui correspond à un taux d'animaux positifs de 22,4% (tableau 2) pour cette population animale.

Tableau 2

Séroprévalences de la DVB/MM en 2006 et en 2007 sur les taureaux de la filière insémination animale et prévalence de l'infection spermatique (chiffres 2006)

Nombre d'animaux	Séropositifs 2006	Séroprévalence 2006	Séroprévalence 2007(*)	Infectés spermatiques 2006	Taux d'animaux infectés spermatiques 2006
4 611	1 033	22,4%	8%	2	1,9‰

* Chiffre obtenu sur environ 4 500 animaux contrôlés en 2007

L'étude de la spécificité du test PCR a conduit à l'obtention de résultats négatifs sur les 962 éjaculats collectés sur des animaux séronégatifs. Ces résultats permettent de conclure à une très bonne spécificité du test PCR réalisé sur semence.

Les examens réalisés sur les échantillons de semence prélevés sur les 1 033 animaux séropositifs ont conduit à la détection de deux éjaculats positifs collectés sur deux taureaux différents.

Ces animaux ayant été identifiés comme des animaux infectés spermatiques permanents, la prévalence de ce statut sanitaire s'établit donc à 1,9 p. mille pour la population animale testée (tableau 2).

Postérieurement à l'identification, dans le cadre de l'étude de séroprévalence, des deux animaux virospermiques, un troisième taureau virospermique a été détecté. Cet animal a de ce fait été intégré au groupe des deux animaux

qui ont été suivis pour l'étude de l'excrétion spermatique.

L'étude du statut sanitaire de ces trois taureaux (T1, T2 et T3) a permis de constater que deux animaux étaient séropositifs et non virémiques lors du premier contrôle sanitaire. Ce statut est demeuré constant pendant toute la durée de l'étude (5 mois) (tableau 3).

Pour le taureau T3, une séroconversion a été observée entre les mois de février et d'avril, mais aucune virémie n'a été mise en évidence sur les prélèvements correspondants (tableau 3).

Le suivi de l'excrétion virale a été effectué pendant quatre à six mois sur les prélèvements de sang et de semence réalisés toutes les semaines, qui ont permis de suivre simultanément la sérologie, la virémie et la virospermie (tableau 4).

Tableau 3

Détermination du statut sanitaire des taureaux infectés permanents spermatiques

Taureau 1	11/05	14/06	12/09	15/10
Recherche anticorps	+	+	+	+
Recherche virémie	-	-	NT*	NT*
Taureau 2	11/05	14/06	12/09	15/10
Recherche anticorps	+	+	+	+
Recherche virémie	-	-	NT*	NT*
Taureau 3	18/01	08/02	07/04	19/04
Recherche anticorps	-	-	+	+
Recherche virémie	-	-	-	-

* NT = non testé

Tableau 4
Suivi de l'excrétion spermatique sur les taureaux infectés permanents spermatiques

Taureau 1 (intervalle éjac. 1 – éjac. 6 = 6 mois)						
	Ejac. 1	Ejac. 2	Ejac. 3	Ejac. 4	Ejac. 5	Ejac. 6
PCR/semence	+	+	+	+	+	+
Titre anticorps	120	120	120	120	120	120
Taureau 2 (intervalle éjac. 1 – éjac. 6 = 4 mois)						
	Ejac. 1	Ejac. 2	Ejac. 3	Ejac. 4	Ejac. 5	Ejac. 6
PCR/semence	+	+	+	+	+	+
Titre anticorps	40	40	40	40	40	40
Taureau 3 (intervalle éjac. 1 – éjac. 6 = 6 mois)						
	Ejac. 1	Ejac. 2	Ejac. 3	Ejac. 4	Ejac. 5	Ejac. 6
PCR/semence	+	+	+	+	+	+
Titre anticorps	60	60	60	60	60	60

Les résultats obtenus permettent de constater que tous les animaux sont demeurés séropositifs pendant toute la durée de l'étude et que le titre des anticorps est resté constant. Dans le même temps, les virémies ont toutes été trouvées négatives.

Les résultats des recherches du génome viral du BVDV dans la semence ont systématiquement été trouvés positifs pendant cette période.

Après autopsie des animaux, le virus a été retrouvé dans l'appareil génital des trois taureaux, quelle que soit la technique utilisée, PCR ou culture cellulaire. Les testicules, les épидидymes et les ampoules déférentielles sont apparus le plus souvent fortement contaminés (Ct <30). Les vésicules séminales se sont révélées peu ou pas contaminées et parfois seulement de façon unilatérale. Aucune présence du virus n'a été observée dans la prostate (tableau 5).

IV - DISCUSSION

Les résultats de l'étude de prévalence effectuée en 2006 montrent un taux de 22,4% sur un effectif conséquent de 4 611 animaux qui étaient présents sur des sites répartis sur toute la France. Cette séroprévalence est faible et significativement différente des chiffres de 50 à 70% [Joly, 2004] qui sont rapportés classiquement pour cette maladie en France. Cette prévalence faible trouve toutefois une explication simple si l'on prend en compte les conditions particulières de recrutement de cette population animale, par

ailleurs soumise à des contrôles sanitaires qui ont pour objectif de maîtriser la diffusion du BVDV dans les stations ou les centres de collecte. Les animaux sont en effet, pour la plupart, recrutés très jeunes dans les élevages (entre un et quatre mois), dans lesquels ils n'ont donc que peu de chance d'être mis en contact avec le BVDV. De plus, seuls les animaux non virémiques sont admis dans les stations, ce qui diminue d'autant les risques d'un contact avec le virus et donc de séroconversion.

Tableau 5
Présence du BVDV (PCR et culture cellulaire) dans les organes génitaux
des taureaux infectés permanents spermatiques après autopsie

Organes		Analyses					
		PCR			Culture cellulaire		
		T1 (Ct*)	T2 (Ct*)	T3(Ct*)	T1	T2	T3
Testicule droit	Pôle apical	+(25)	+(28)	+(26)	+	+	+
	Axe médian	+(25)	+(32)	+(29)	+	+	+
	Pôle distal	+(25)	+(31)	+(27)	+	+	+
Epididyme droit	Tête	+(27)	+(27)	+(30)	+	+	+
	Corps	+(29)	+(29)	+(28)	+	+	+
	Queue	+(29)	+(26)	+(27)	+	+	+
Vésicule séminale droite	Pôle apical	-	-	-	-	-	-
	Pôle distal	-	-	-	-	-	-
Ampoule déférentielle droite		-	+(30)	D**(43)	-	+	-
Prostate		-	-	-	-	-	-
Testicule gauche	Pôle apical	+(29)	-	+(28)	+	-	+
	Axe médian	+(28)	-	+(28)	+	-	+
	Pôle distal	+(27)	-	+(22)	+	-	+
Epididyme gauche	Tête	-	-	+(23)	+	-	+
	Corps	+(34)	+(33)	+(24)	+	+	+
	Queue	+(32)	-	+(28)	+	-	+
Vésicule séminale gauche	Pôle apical	-	-	-	+	-	+
	Pôle distal	-	-	-	-	-	-
Ampoule déférentielle gauche		-	+(33)	+(36)	-	+	+

* Ct=cycle treshold (valeur seuil d'amplification)

** Douteux

La forte diminution de la séroprévalence en 2007 par rapport à celle enregistrée en 2006 (8% vs 22,4% en 2006), peut s'expliquer par la démarche de plusieurs GDS qui ont engagé des plans d'actions efficaces dans les élevages et en particulier dans les élevages vendeurs de génétique, afin de limiter les problèmes sanitaires liés au BVDV [Joly, 2004]. Ces actions contribuent donc, sans nul doute, à limiter la circulation virale dans les élevages, ce qui aboutit tout naturellement à recruter plus probablement des animaux séronégatifs susceptibles de conserver ce statut sanitaire sur le long terme, s'ils sont placés dans des conditions sanitaires qui permettent de limiter, voire de maîtriser, toute circulation virale.

La détection de deux animaux virospermiqes sur les 1 033 animaux séropositifs permet d'évaluer à 1,9 p. mille le pourcentage de mâles qui présentent ce type d'affection. Sans être particulièrement précis, compte tenu surtout du faible nombre d'animaux trouvés positifs, ce chiffre donne toutefois une idée de

la réalité en France et de la fréquence de cette forme de la maladie dont les conséquences peuvent être importantes dans la mesure où ces animaux ne peuvent être détectés que grâce à un examen de la semence, examen qui n'est jamais pratiqué en dehors des animaux de la filière insémination animale.

Ces animaux particuliers constituent donc un réservoir de virus susceptible de provoquer, avec des conséquences déjà évoquées, une circulation du BVDV en élevage et de créer les conditions d'une infection aiguë des animaux sensibles ou d'une infection permanente si le virus infecte des femelles gestantes.

Parmi les animaux étudiés, deux étaient séropositifs lors du premier examen sérologique. Dans ces conditions il n'est donc pas possible, pour ces animaux, d'affirmer que cette infection spermatique est la conséquence d'une infection aiguë. L'hypothèse d'une infection *in utero* associée à des localisations génitales est cependant peu compatible avec le fait que ces animaux ne sont pas virémiques

et qu'ils ont développé une immunité à médiation humorale.

L'hypothèse la plus probable est donc que ces jeunes mâles ont présenté une infection aiguë d'évolution normale par rapport à une durée courte de la virémie, cette dernière étant parfaitement compatible avec les résultats négatifs à la suite de la réalisation de ce test et l'apparition des anticorps dans le sérum.

Cette hypothèse est par ailleurs confirmée par le taureau T3 dont l'infection aiguë est démontrée par les résultats des examens de laboratoire. L'hypothèse d'une infection permanente concomitante de l'apparition de la puberté, déjà émise en 1998 en Nouvelle-Zélande, est donc renforcée [Voges *et al.*, 1998].

Ces éléments permettent d'établir que l'infection aiguë par le BVDV peut, chez le mâle, être associée à l'installation de localisations du BVDV dans l'appareil génital, ces dernières n'empêchant pas l'évolution normale de la maladie en particulier l'apparition des anticorps circulants et la disparition de la virémie.

Le suivi de l'excrétion spermatique du virus n'a pu être effectué que pendant quelques mois (quatre à six mois) pour des raisons essentiellement économiques. Cependant, pendant cette période, tous les éjaculats de tous les taureaux ont systématiquement été trouvés positifs en PCR, indiquant la présence du génome viral dans le sperme.

On peut donc conclure de ces observations que l'infection aiguë par le BVDV d'un mâle indemne peut aboutir, dans certaines conditions liées à l'évolution de la maladie, à l'installation de localisations génitales associées à une contamination spermatique

permanente, comparable d'ailleurs à ce qui a déjà été observé pour d'autres maladies (épididymite contagieuse [Bulgin, 1990]).

Les autopsies réalisées sur les trois animaux étudiés permettent d'observer que le site principal de localisation du BVDV est le testicule. Les résultats positifs obtenus par la technique PCR (Ct < 45) sur les échantillons de parenchyme testiculaire permettent de conclure à une charge virale importante de ces organes, probablement plus significative d'une réplication virale dans les tubes séminifères que dans les épидидymes dont la contamination peut être la simple conséquence de la présence du génome viral au niveau des spermatozoïdes.

Ces mêmes résultats négatifs ou très faiblement positifs obtenus sur les vésicules séminales des taureaux infectés et sur la prostate permettent de penser que l'épithélium glandulaire des vésicules séminales ne représente probablement pas un site de localisation préférentielle du BVDV, en cas de contamination de l'appareil génital.

Les résultats positifs en culture cellulaire apportent également une information particulièrement intéressante puisqu'ils permettent de répondre à la question de l'inféctiosité virale, toujours mise en question après obtention de résultats positifs au test PCR.

Les risques de transmission du BVDV par la semence de ces animaux infectés permanents spermatiques sont donc réels puisque la semence contaminée est infectante, qu'elle soit utilisée en saillie naturelle ou en insémination artificielle [McGowan *et al.*, 1993 ; Pastoret, 2003].

V - CONCLUSION

En France, tous les taureaux introduits dans la filière insémination artificielle sont soumis au protocole réglementaire de contrôle de la BVD, basé sur la recherche du virus et la détermination du statut sérologique.

En 2006, la séroprévalence de la maladie a pu être évaluée sur 4 611 animaux soumis au contrôle dans les stations et les centres de collecte. Elle s'établit à 22,4%, mais est en très

nette diminution puisque la séroprévalence 2007 n'est plus que de 8%.

L'infection spermatique permanente a pu être mise en évidence dans cette population animale à un taux d'environ 1,9 p. mille. Sur ces animaux, l'infection génitale semble être plus particulièrement localisée dans les testicules. L'excrétion du BVDV apparaît permanente, systématique et importante puisque tous les éjaculats sont contaminés à

des concentrations élevées. L'infectiosité des particules virales localisées dans l'appareil génital, démontrée par la culture cellulaire, rend cette infection particulièrement dangereuse en élevage en raison des risques de transmission de l'agent pathogène lors de la saillie de femelles sensibles.

Ces observations justifient pleinement le protocole de contrôle sanitaire des taureaux de la filière insémination artificielle qui conduit à vérifier très précisément le statut sanitaire de la semence des taureaux séropositifs en BVDV et à éliminer des centres de collecte tous les animaux qui présentent ce type d'affection.

BIBLIOGRAPHIE

- Anonyme - Isolement du virus de la diarrhée virale bovine/maladie des muqueuses (DVB/MM) sur culture cellulaire à partir de prélèvements d'organes, de sang ou d'excréments et identification par immunofluorescence indirecte. CNEVA (Ed), 1993, pp.17.
- Anonyme - Recherche d'anticorps contre la maladie des muqueuses par la technique de neutralisation virale et immunochimie sur culture cellulaire (IF ou IP). AFNOR (Ed.) NF U 47-027, 2002, pp. 20.
- Anonyme - Council directive amending directive 88/407/EEC laying down the animal health requirements applicable to intra-Community trade in and imports of semen of domestic animals of the bovine species (Directive 2003/43/EC) Off. J. European Union, 11/06/2003, L 143, 2003, 23-32.
- Barlow R.M., Nettleton P.F., Gardiner A.C., Greig A., Campbell J.R., Bonn J.M. - Persistent bovine virus diarrhoea virus infection in a bull. *Vet. Rec.*, 1986, **118**, 321-324.
- Bulgin M.S. - Brucella ovis excretion in semen of seronegative, clinically normal breeding rams. *JAVMA*, 1990, **196**, 313-315.
- Coria M.F., McClurkin A.W. - Specific immune tolerance in an apparently healthy bulls persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.*, 1978, **49**, 1040-1044.
- Joly A. - Place de la PCR dans le plan de maîtrise collective de la BVD. 2004, Maîtrise collective de la BVD : 2ème journée BVD RENNES, 2 mars 2002, pg 17.
- Kirkland P.D., Richard S.G., Rothwell J.T., Stanley D.F. - Replication of BVDV in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. *Vet. Rec.*, 1991, **128**, 587-590.
- MacGowan M.R., Kirkland P.D., Richards S.G., Littlejohns I.R. - Increased reproductive losses in cattle infected with bovine pestivirus around the time of insemination. *Vet Rec* 133, 39-43. Meyling A., Jensen A.M. 1988. Transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination with semen from a persistently infected bull. *Vet. Microbiol.*, 1993, **17**, 97-105.
- Pastoret P.P., Hamers C., Dehan P. - Diarrhée virale bovine et maladie des muqueuses 545-557 in : Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail. Vol. 1, Généralités maladies virales Ed TEC&DOC, 2003, 764 pages.
- Revell S.G., Chasey D., Drew T.W., Edwards S. - Some observations on the semen of bulls persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Record*, 1988, **123**, 122-125.
- Voges H., Horner G.W., Rowe S., Wellenberg G.J. - Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immune-competent, non-viraemic bull. *Vet. Microbiol.*, 1998, **61**, 165-175.

