

Infection expérimentale de taureaux par injection intratesticulaire d'une souche de Bovid herpesvirus 4 isolée d'un cas d'orchite

J. DUBUISSON*, E. THIRY*, I. THOMAS*, F. COIGNOUL**, M. BUBLOT*, G. VAN HEULE***, D. DEKEGEL***, P.-P. PASTORET*

* *Service de Virologie-Immunologie,*

** *Service de Pathologie Générale,
Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège,
Rue des Vétérinaires 45, B-1070 Bruxelles.*

*** *Institut Pasteur du Brabant,
Rue du Remorqueur 28, B-1040 Bruxelles.*

RESUME

Quatre taurillons de race Blanc-Bleu-Belge âgés de 12 à 14 mois ont été utilisés. Ils étaient exempts d'anticorps anti BHV-4 et anti virus BVD et étaient indemnes d'infection persistante par un virus BVD non cytopathogène. Trois d'entre eux ont été inoculés par voie intratesticulaire avec 10^5 ufp de virus BHV-4 par testicule (jour 0). Le quatrième a été utilisé comme animal témoin et a reçu le même volume de surnageant de culture non infectée. Les testicules ont été prélevés chirurgicalement à différents temps, un des animaux infectés a été euthanasié au jour 5 et différents organes ont été prélevés afin d'effectuer des examens viraux.

Aucun signe clinique n'a été observé et aucune lésion importante n'a été détectée chez les animaux infectés.

* Travail subventionné par l'Institut pour l'encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture (I.R.S.I.A.).

Manuscrit déposé le 16/09/1986.

Le virus a été réisolé au niveau des testicules. Les taurillons infectés ont montré une séroconversion qui a débuté au jour 16 et une excrétion virale a été détectée aux niveaux nasal et conjonctival entre le jour 18 et le jour 34 (dernier jour).

Le virus s'est multiplié chez les animaux infectés et s'est installé rapidement à l'état latent au niveau du testicule, mais aucun signe d'orchite n'a été observé.

INTRODUCTION

En 1980, un nouvel herpesvirus bovin a été isolé en Belgique d'un cas d'orchite œdémateuse accompagnée d'azoospermie (Thiry et al., 1981). Une étude sérologique a permis de rattacher cet isolement à un groupe d'herpesvirus bovins représenté par la souche de référence Movar 33/63 (Bartha et al., 1966; Wellemans et al., 1984; Dubuisson, résultats non publiés). Ce groupe de virus contient un grand nombre de souches antigéniquement apparentées, isolées de bovins atteints d'entités pathologiques très diverses : troubles respiratoires (Liebermann et al., 1967; Storz, 1968; Mohanty et al., 1971; Smith et al., 1972), kératoconjonctivite (Bartha et al., 1966), métrite (Parks et Kendrick, 1973; Wellemans et al., 1984), vaginite (Alexander et al., 1957; Theodoridis, 1978), affections cutanées (Rweyemamu et Loretu, 1973), lymphosarcome (Van Der Maaten et Boothe, 1972; Potgieter et Maré, 1974), orchite (Theodoridis, 1978; Thiry et al., 1981). Des isolements de ce type ont également été obtenus de cultures cellulaires d'organes prélevés chez des bovins apparemment sains (Luther et al., 1971; Belak et Palfi, 1974). Ce groupe de virus est très répandu géographiquement; des souches ont été isolées en Afrique (Loretu et al.,

1974; Theodoridis, 1978), en Europe (Bartha et al., 1966; Thiry et al., 1981), en Amérique (Mohanty et al., 1971; Smith et al., 1972). En plus de leur parenté sérologique, ces différents isolements ont en commun la production d'un effet cytopathogène lent en culture cellulaire, sans formation de syncytium (Gibbs et Rweyemamu, 1977). Ils induisent une réponse immunitaire humorale caractérisée par une production faible ou nulle d'anticorps neutralisants (Potgieter et Maré, 1974).

Ludwig (1983) classe ces différents isolements dans le groupe des Bovid herpesvirus 4 (BHV-4) en fonction de leur parenté sérologique et de leurs similarités génomiques. Storz et al. (1984) proposent de les dénommer cytomegalovirus bovins sur base de leurs propriétés biologiques : leur maturation s'effectue essentiellement par bourgeonnement à partir de vésicules provenant de l'appareil de Golgi ou du réticulum endoplasmique lisse, ils forment des inclusions cytoplasmiques semblables aux cytomegalovirus humain et murin, ils témoignent d'une grande spécificité d'hôte et ont un cycle de multiplication lent.

Le rôle exact de ces souches dans les entités cliniques dont elles ont été isolées n'est pas encore connu avec précision. Dans cette expérience, nous avons

étudié le rôle pathogène de la souche isolée en Belgique d'un cas d'orchite œdémateuse accompagnée d'azoospermie. Nous avons tenté de reproduire l'affection expérimentalement en injectant une suspension de cette souche virale dans les testicules de taurillons.

MATERIEL ET METHODES

Animaux

4 taurillons de race Blanc-Bleu-Belge, âgés de 12 à 14 mois, ont été utilisés pour l'expérience, après avoir démontré qu'ils étaient exempts d'anticorps envers le BHV-4 par test E.L.I.S.A. et d'anticorps envers le virus BVD (Bovine Viral Diarrhoea) en séroneutralisation. L'absence d'infection persistante par un virus BVD non cytopathogène a également été vérifiée. Pour cela, les leucocytes de ces taurillons ont été inoculés à des cultures de cellules testiculaires exemptes de virus BVD (testées en immunofluorescence indirecte (IFI) après 8 passages avec un sérum hyperimmun produit sur mouton, aimablement fourni par le Dr. P.F. Nettleton, Edimbourg) et cultivées dans du milieu contenant du sérum de veau fœtal (SVF) testé indemne de virus BVD et irradié au Gammacell à la dose de 1 mégarad. Trois passages sont réalisés à une semaine d'intervalle. Le dernier passage sur cellules testiculaires est testé en IFI. L'absence d'antigène BVD dans les cellules ainsi traitées permet de déclarer un animal indemne.

Virus

La souche de BHV-4 (V. Test.) a été isolée en Belgique d'un cas d'orchite œdémateuse accompagnée d'azoospermie chez un taureau de race Blanc-Bleu-Belge (Thiry et al., 1981). Le virus a été cultivé sur cellules testiculaires indemnes de virus BVD et purifié par 3 repiquages successifs de plages sous agarose. L'inoculum a également été démontré indemne de virus BVD en IFI.

Titrage viral

Des cellules Georgia Bovine Kidney (GBK) confluentes, cultivées en microplaques, sont infectées par des dilutions de raison 10 des suspensions virales à titrer. Après 24 heures d'incubation à 37 °C (atmosphère humide, 5 % de CO₂), le milieu de culture (MEM, Minimum Essential Medium supplémenté de 2 % de SVF) est remplacé par du MEM additionné de 0,6 % de carboxyméthylcellulose. Après 10 jours supplémentaires d'incubation, les cellules sont fixées et colorées par une solution hydroalcoolique de cristal violet.

Immunofluorescence indirecte

Des lapins blancs néozélandais de 2-3 kg ont été hyperimmunisés avec la souche V. Test. pour la production de sérums spécifiques anti BHV-4. Les sérums hyperimmuns sont utilisés à la dilution 1/2000.

E.L.I.S.A.

L'antigène utilisé est une suspension de virus semi-purifié ajustée à la concentration de 250 ng/ml avec du tampon PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,8). L'antigène est adsorbé durant 16 heures sur des microplaques adéquates (plaques Linbro). Les microplaques sont lavées avec du PBS contenant 0,02 % de tween 80. Elles sont ensuite saturées avec du PBS contenant 1 % d'ovalbumine et incubées à 4 °C durant 6 heures. Ensuite les microplaques sont lavées comme précédemment et les sérums dilués (dilutions de raison 3,16) dans du PBS contenant 0,5 % d'ovalbumine, sont mis en contact avec l'antigène durant 16 heures à 4 °C. Les plaques sont ensuite à nouveau lavées et incubées à 4 °C pendant 2 heures avec du PBS contenant 0,5 % d'ovalbumine et un sérum anti-immunoglobulines de bovin conjugué à la peroxydase. Les plaques ainsi préparées sont lavées une dernière fois avant de déposer le substrat (peroxyde d'urée) et une substance chromogène (orthophénylène diamine). Après une

demi-heure d'incubation à l'obscurité, la réaction est arrêtée avec de l'HCl 6 N. La lecture au spectrophotomètre (Multiskan ELISA) peut alors avoir lieu. Le titre obtenu est la dernière dilution qui exprime une densité optique significativement différente du témoin cellulaire préparé dans les mêmes conditions que l'antigène.

Histopathologie

La liste des prélèvements effectués pour l'examen histopathologique est donnée dans la rubrique «protocole expérimental». Chez tous les animaux, quatre prélèvements ont été effectués à des localisations similaires au niveau de chaque testicule. Les échantillons ont été fixés au formol neutralisé à 10 %, inclus à la paraffine, coupés à 6 μ et colorés à l'hématoxyline-éosine.

Pour l'évaluation semi-quantitative, un comptage de 40 tubes séminifères a été effectué pour chaque testicule en vue de déterminer la proportion de tubes contenant des spermatogonies, des spermatocytes primaires, des spermatides, des spermatozoïdes mûrs et des cellules de Sertoli.

Microscopie électronique

Des fragments de testicule d'environ 0,5 mm³ ont été fixés pendant 18 heures en OsO₄ (1 %), bichromate de potassium (1 %), dans un tampon cacodylate (pH 6,8). Ils ont été lavés en eau distillée, contrastés à l'acétate d'uranyle (1 %), déshydratés et inclus dans un mélange à parts égales d'epon et de résine Spurr. Les coupes ultrafines obtenues au microtome Ultracut (Reichert) ont été post-contrastées au citrate de plomb et examinées au microscope électronique Siemens 102. La méthode du contraste négatif à l'acétate d'uranyle a été utilisée pour la mise en évidence de particules virales.

Protocole expérimental

Trois taurillons (n° 2, 3 et 4) ont été inoculés par voie intratesticulaire à l'aide de 10⁶ ufp (unités formant plaques) de la souche

V. Test. par testicule. Le quatrième taureau (n° 1) servait de témoin et a reçu un volume identique de surnageant de culture de cellules non infectées (jour 0). Des écouvillons nasaux, conjonctivaux et prépucciaux, des prélèvements de salive et de sang ont été réalisés pour y titrer le virus, tous les jours jusqu'au jour 14, puis tous les 2 jours jusqu'au jour 28 et à la fin de l'expérience (jour 34). Les résultats positifs ont été confirmés en IFI. Les symptômes ont été recueillis les mêmes jours. Le volume testiculaire a été estimé selon la formule de Toelle et Robison (1985). Du sang a été prélevé tous les 2 jours pendant la durée de l'expérience pour les examens hématologiques (globules rouges, hémocrite, hémoglobine, volume corpusculaire moyen, concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine, hémoglobine corpusculaire moyenne, plaquettes et formule leucocytaire), biochimiques (protéines totales, albumine, globuline et fibrinogène) et sérologiques. Des prélèvements de sperme ont été effectués tous les 2 jours jusqu'au jour 14 et ensuite une fois avant chaque castration pour un examen qualitatif et un essai d'isolement viral selon la technique à l'œuf citraté (Loewen et Darcel, 1985).

Une castration unilatérale a été pratiquée aux jours 5 et 25 chez l'animal témoin (n° 1), aux jours 11 et 20 chez le taureau 2 et aux jours 15 et 25 chez le taureau 3. Le taureau 4 a été sacrifié au jour 5 et différents organes ont été prélevés : rate, foie, reins, poumons, parotide, thymus, ganglions, vessie, pénis, vésicules séminales, prostate, canaux déférents, testicules, épидидymes, trachée et cavités nasales. Un examen bactériologique et un examen histopathologique ont été réalisés pour chaque organe ainsi qu'un examen semi-quantitatif du contenu des tubes séminifères.

Des essais d'isolement ont été entrepris à partir des organes broyés (testicules et épидидymes de chaque animal et les différents organes prélevés chez l'animal sacrifié). Les différents broyats ont été inoculés à un tapis confluent de cellules GBK. Après 10 jours, les cellules ont subi un cycle de congélation-

décongélation et un titrage viral a été entrepris. Les titrages qui se sont révélés positifs ont été confirmés en IFI. Un examen en IFI a également été entrepris sur des coupes des organes prélevés. Les cellules des testicules prélevés et les lymphocytes sanguins isolés selon la méthode décrite par Brochier et al. (1984) ont été mis en culture et en coculture avec les cellules GBK pour réisoler le virus.

Les sérums des taurillons 1, 2 et 3 (jour 34) et du taurillon 4 (jour 4) ont été testés par séroneutralisation pour détecter la présence d'anticorps anti virus BVD. La présence de virus BVD a également été recherchée par IFI dans les testicules et les leucocytes.

RESULTATS

Examen clinique

Les 4 animaux sont restés cliniquement sains pendant toute la durée de l'expérience. Les volumes testiculaires n'ont pas varié significativement. Le taureau témoin (n° 1) a présenté une orchio-épididymite aiguë unilatérale gauche au jour 5 (jour de castration). Les testicules des 3 infectés (n° 2, 3 et 4) sont restés normaux de même que le testicule droit du taureau 1. L'examen du sperme a révélé une alternance de mobilité et d'immobilité des spermatozoïdes pour les taureaux 1 et 3. Les spermatozoïdes des taureaux 2 et 4 n'ont présenté de la mobilité qu'au jour -1 de l'expérience. Les volumes des éjaculats et le nombre de spermatozoïdes par unité de volume sont restés relativement constants pendant toute la durée de l'expérience. Les taurillons n'ont pas exprimé de grandes modifications dans leur instinct sexuel à chevaucher une femelle œstrogénisée et la couleur de leur sperme est restée inchangée.

Examens hématologiques et biochimiques

Les différents examens entrepris n'ont pas révélé d'altération significative au niveau hématologique et biochimique.

Examen histopathologique

Les seules lésions significatives observées chez les taurillons se situaient au niveau génital à l'exception de quelques foyers inflammatoires discrets, de caractère interstitiel, au niveau trachéal, pulmonaire, hépatique, splénique et rénal chez l'animal 4.

Des lésions d'épididymite subaiguë lymphocytaire ont été observées chez les animaux 2, 3 et 4 ainsi que des lésions de type aigu et subaigu chez l'animal 1. Les amas lymphoïdes du tissu interstitiel étaient le plus souvent à localisation périvasculaire.

Dans les prélèvements examinés, le tissu testiculaire était infiltré par un œdème séreux diffus. De plus, on observait une raréfaction diffuse et importante de la lignée séminale avec, dans les cas les plus sévères, des plages de tubes séminifères ne contenant que des spermatogonies et des cellules de Sertoli (tableau 1). Des cellules inflammatoires à noyau rond, à localisation périvasculaire ou sous forme de nodules lymphoïdes, ont été observées dans le parenchyme testiculaire de 2 taurillons (n° 2 et 3).

Microscopie électronique

L'examen en microscopie électronique sur coupes de testicules n'a pas permis de mettre en évidence la présence de particules virales ni la présence d'altérations caractéristiques d'une infection virale.

TABLEAU 1. — Examen semi-quantitatif du contenu des tubes séminifères exprimant la proportion de cellules séminales dans les testicules des 4 taureaux.

	TAUREAU 1		TAUREAU 2		TAUREAU 3		TAUREAU 4	
	Testicule G. jour 5	Testicule D. jour 25	Testicule G. jour 11	Testicule D. jour 20	Testicule G. jour 15	Testicule D. jour 25	Testicule G. jour 5	Testicule D. jour 5
Spermatogonies	10/10	10	10	10	10	10	10	10
Spermatocytes 1	9,75	10	10	10	10	10	10	9
Spermatides	10	9,75	10	9,50	9,50	8,75	10	9,25
Spermatozoïdes	4,50	5,50	7,50	5,75	7,25	6	8	7
Cellules de Sertoli	10	10	10	10	10	10	10	10

Examen virologique des organes prélevés

Les essais d'isolement viral et l'IFI sur coupe ont été négatifs pour tous les organes prélevés sur le taureau 4, excepté le testicule droit. Le tableau 2 présente les résultats d'isolement viral à partir de culture et de coculture de cellules testiculaires ainsi que l'IFI sur les testicules prélevés. Un virus cytopathogène a été isolé de l'épididyme gauche du taureau témoin. L'IFI sur culture de cellules GBK infectées par le broyat d'épididyme a permis d'exclure la présence de BHV-4. La microscopie électronique a mis en évidence la présence d'un poxvirus (figure 1). Aucun contaminant bactérien n'a été isolé. Les cultures de lymphocytes n'ont jamais exprimé le virus de même que les plasmas et leucocytes. Aucune virémie n'a donc été mise en évidence.

Excrétion virale

Le sperme et la salive n'ont jamais révélé la présence de particules virales infectieuses. Les sécrétions prépucciales présentaient des contaminations bactériennes fréquentes. L'excrétion virale au niveau nasal et oculaire est présentée dans la figure 2. Aucune excrétion virale n'a été détectée chez les taureaux 1 et 4.

Réponse immunitaire

Les taureaux 2 et 3 ont commencé à produire des anticorps entre le 14^e et le 16^e jour. Les sérums de ces 2 animaux ont atteint un plafond correspondant à la dilution 1/3160 entre le jour 20 et le jour 24 (figure 3). Le taureau 1 est resté négatif jusque la fin de l'expérience et le taureau 4 a été sacrifié avant de présenter une séroconversion.

TABLEAU 2. — Mise en évidence de la multiplication virale au niveau des testicules.

	Isolement par broyage d'organe	Isolement par culture directe	Isolement par coculture	Immuno- fluorescence
JOUR 5				
Taureau 1	0	0	0	0
Testicule G.				
Taureau 4	0	0	0	0
Testicule G.				
Taureau 4	+	0	0	0
Testicule D.				
JOUR 11				
Taureau 2	0	0	0	0
Testicule G.				
JOUR 15				
Taureau 3	0	0	+	+
Testicule G.				
JOUR 20				
Taureau 2	0	0	+	0
Testicule D.				
JOUR 25				
Taureau 3	0	0	+	+
Testicule D.				
Taureau 1	0	0	0	0
Testicule D.				

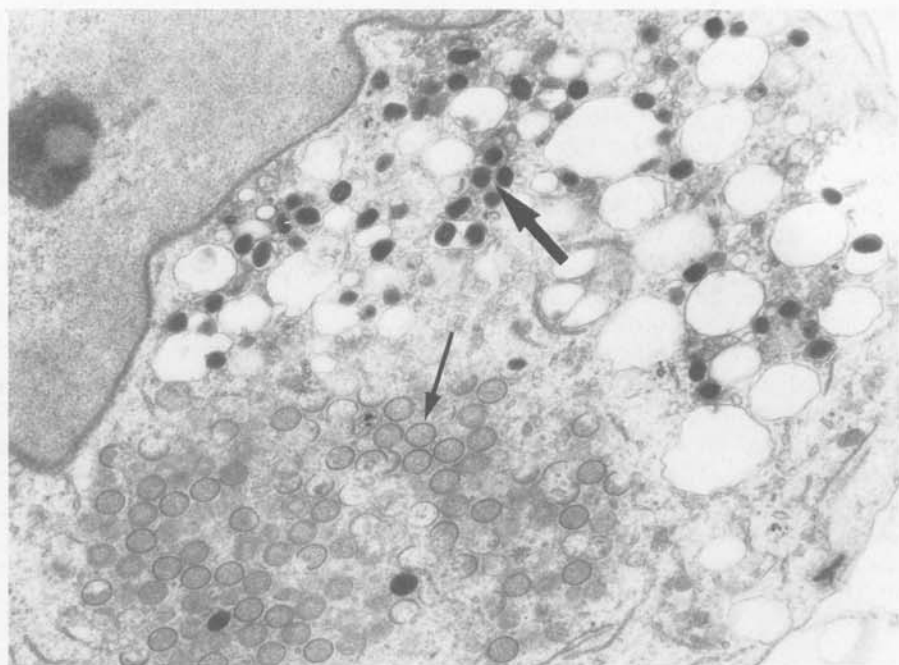


Fig. 1. — cellule de Fetal Lamb Kidney (FLK) infectée par le broyat du testicule gauche du taureau témoin, au grossissement 12.000× en microscopie électronique. Le cytoplasme contient des particules de poxvirus en début (grosse flèche) et en fin (petite flèche) de maturation.

Absence de contamination par le virus BVD

Aucune séroconversion envers le virus BVD n'a été décelée chez les taureaux durant l'expérience. Aucune contamination des testicules et des leucocytes sanguins par un virus BVD non cytopathogène n'a pu être mise en évidence en fin d'expérience, chez aucun animal.

DISCUSSION

Les taureaux n'ont pas montré de symptômes ou de signes cliniques, mais le virus s'est multiplié chez les animaux infectés, car ils ont présenté une séroconversion et ont excrété le virus par voies nasale et lacrymale. Aucune viré-

mie n'a été mise en évidence tout comme dans l'expérience de Mohanty (1973). Néanmoins, les excréctions virales nasale et lacrymale indiquent que le virus emprunte une phase de virémie. En effet, Osorio et Reed (1983) ont démontré la persistance d'une souche de BHV-4 associée aux leucocytes sanguins chez les bovins. Aucune excrétion virale n'a pu être détectée dans le sperme, bien que Loretu et al. (1974) aient isolé une souche de BHV-4 dans du sperme de taureau.

Le virus s'est multiplié durant une courte période au niveau des testicules; il a été réisolé directement par broyage d'organe jusqu'au jour 5. Ensuite, le virus s'est installé à l'état latent dans les

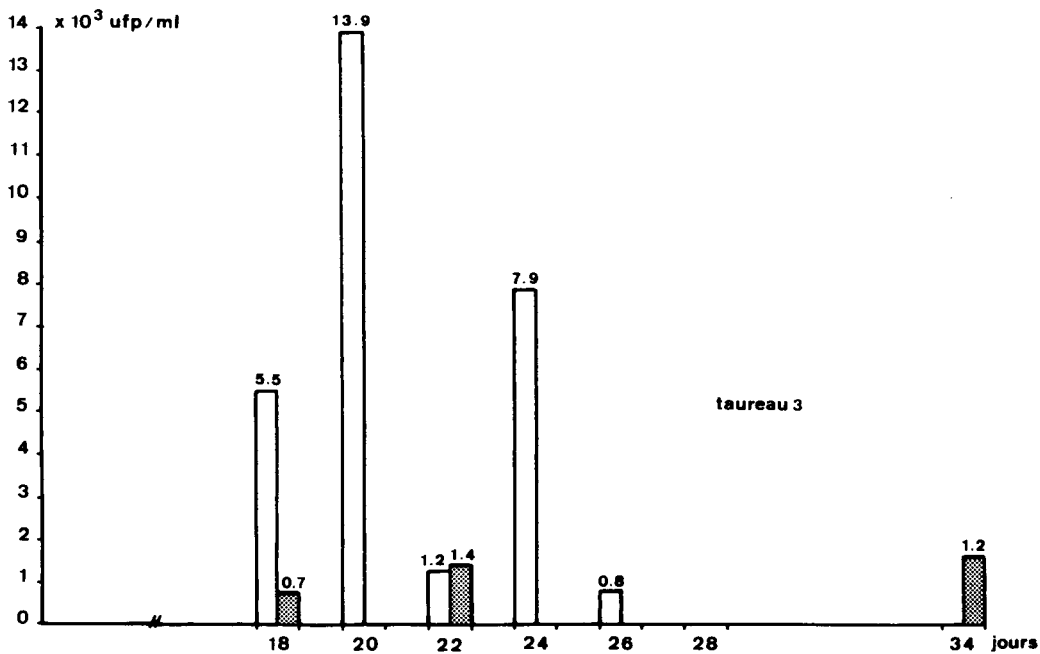
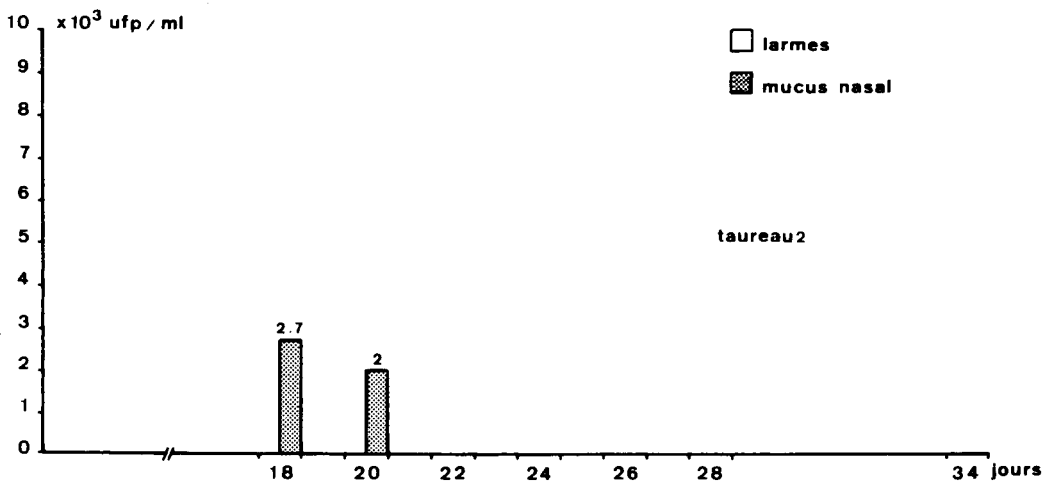


Fig. 2. — Excrétions nasale et lacrymale du virus V. Test. chez les taureaux 2 et 3.

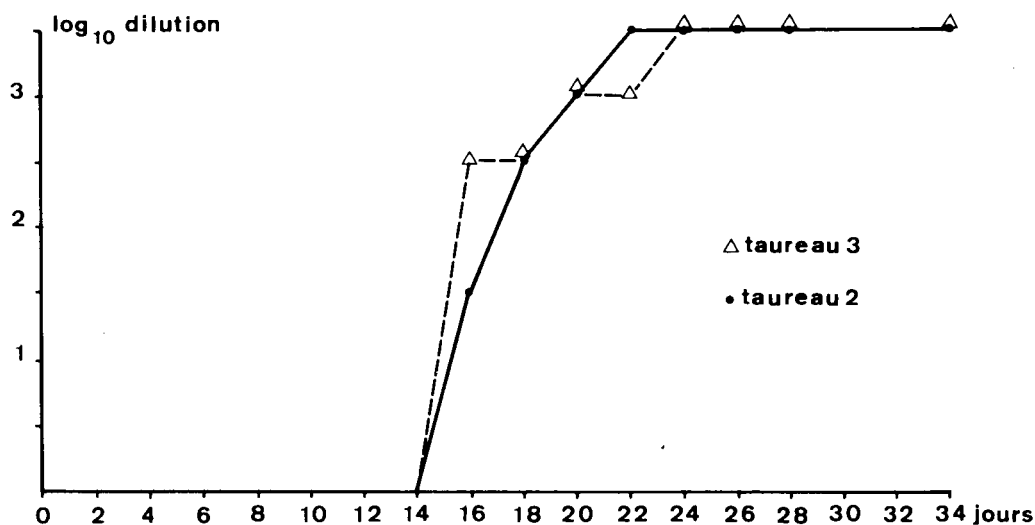


Fig. 3. — Mesure en ELISA du titre en anticorps anti BHV-4 exprimé en logarithme de base 10 de la dernière dilution positive.

testicules, car il a été réisolé en coculture (à partir du jour 15), ce qui indique qu'une réactivation *in vitro* était nécessaire.

La relative pauvreté de la lignée séminale peut être en rapport avec les lésions de l'épididyme ou en partie due au jeune âge des animaux. L'animal sacrifié présentait des lésions de type inflammatoire évolutif à plusieurs niveaux. Ces lésions, discrètes dans tous les cas, peuvent résulter de l'évolution d'une infection contractée dans le jeune âge. Les nodules lymphoïdes présents chez les 2 animaux infectés non sacrifiés peuvent être le signe d'une réaction testiculaire au développement viral, mais ces altérations histopathologiques n'ont pas l'ampleur des lésions observées par Hanzen et al. (1981), chez l'animal dont le virus a été isolé.

Le taureau témoin a présenté une orchio-épididymite aiguë unilatérale gauche; un poxvirus a été isolé de son

épididyme gauche, mais aucun virus sérologiquement apparenté à la souche étudiée n'a pu être détecté. Des recherches sur le rôle du poxvirus isolé sont en cours.

Le virus est excrété par voies nasale et lacrymale, il pourrait donc se transmettre par contact au niveau des voies respiratoires antérieures comme Mohanty et al. (1972) l'ont constaté avec la souche DN599. Cette expérience d'infection primaire à l'aide d'une souche de BHV-4 n'a pas provoqué l'apparition de signes cliniques, comme pour la plupart des essais précédents d'infections expérimentales réalisées à l'aide d'une souche de BHV-4 (Ludwig, 1983). Cependant Wellemans et al. (1986) sont parvenus à reproduire des symptômes de métrite en infectant des vaches gestantes à l'aide d'une souche de BHV-4 (LVR 140). Des symptômes de métrite sont apparus une dizaine de jours après l'accouchement et ils étaient accompagnés d'une réponse immunitaire anamnétique. Les troubles

associés à l'infection par le BHV-4 pourraient être provoqués par une réactivation virale, ce qui expliquerait l'absence de symptômes dans cette expérience d'infection primaire et l'apparition de métrites dans l'expérience de Wellemans et al. (1986), plusieurs semaines après l'inoculation. Le virus s'installerait rapidement à l'état latent au niveau du testicule et ce n'est que sous l'effet d'un stimulus réactivant qu'il deviendrait pathogène.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement les Docteurs Hanzen et Delsaux pour leurs interventions chirurgicales, Mariane Vercoouter et Marcel Wittebrood pour leur précieuse collaboration technique, le laboratoire de bactériologie du professeur Kaeckenbeeck pour les analyses bactériologiques et le laboratoire d'analyses médicales d'Anderlecht pour les analyses biochimiques et hématologiques.

BIBLIOGRAPHIE

- ALEXANDER R.A., PLOWRIGHT W., HAIG D.A. Cytopathogenic agents associated with lumpy-skin disease of cattle. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, 1957, **5**, 489.
- BARTHA A., JUHASZ M., LIEBERMANN H. Isolation of a bovine herpesvirus from calves with respiratory disease and keratoconjunctivitis. *Acta Vet. Hung.*, 1966, **16**, 355.
- BELAK S., PALFI V. Characterization of a herpesvirus isolated from spontaneously degenerated bovine kidney cell culture. *Acta Vet. Hung.*, 1974, **24**, 249.
- BROCHIER B., THIRY E., DERBOVEN G., HANTON G., PASTORET P.-P. Effect of homologous delayed hypersensitivity testing specific and non-specific lymphoblastic transformation in cattle latently infected with bovine rhinotracheitis virus (bovine herpesvirus 1, BHV 1). *Ann. Rech. Vét.*, 1984, **15**, 483.
- GIBBS E.P.J., RWEYEMAMU M.M. Bovine herpesvirus 2 and 3. *Vet. Bull.*, 1977, **47**, 411.
- HANZEN C., DESSY-DOIZE C., THIRY E., WELLEMANS G., CALBERG-BACQ C.M., VINDEVOGEL H., DAGENAIS L., PASTORET P.-P. Aspects cliniques et anatomopathologiques de cas répétés d'orchite chez des taureaux reproducteurs en Belgique. *Ann. Méd. Vét.*, 1981, **125**, 261.
- LIEBERMANN H., SCHULZE P., KOKLES R., HANTSCHHEL H. Isolierung und Identifizierung eines weiteren neuartigen bovinen Herpesvirus. *Arch. Exp. Vet. Med.*, 1967, **21**, 761.
- LOEWEN K.G., DARCEL C. le Q. A comparison of two methods for the isolation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) from extended bovine semen. *Theriogenology*, 1985, **23**, 935.
- LORETU K., MARINOV P., GENOV I., BOHNEL H. Virus isolations from cases of infectious bovine pustulo-vulvovaginitis and posthitis in cattle in Tanzania. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, 1974, **22**, 303.
- LUDWIG H. Bovine herpesviruses. In : *The Herpesviruses*, vol. 2, edited by B. Roizman, Plenum Press, New York, 1983, 135-214.
- LUTHER P.D., BRADLEY P.G., HAIG D.A. Isolation and characterization of a herpesvirus from calf kidney cell cultures. *Res. Vet. Sci.*, 1971, **12**, 496.
- MOHANTY S.B. New herpesviral and rhinoviral respiratory infections. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1973, **163**, 855.
- MOHANTY S.B., HAMMOND R.C., LILLIE M.G. A new bovine herpesvirus and its effect on experimentally infected calves. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 1971, **34**, 394.
- MOHANTY S.B., LILLIE M.G., INGLING A.L., HAMMOND R.C. Effect of an experimentally induced herpesvirus infection in calves. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1972, **161**, 1008.
- OSORIO F.A., REED D.E. Experimental inoculation of cattle with bovine herpesvirus-4 : Evidence for a lymphoid-associated persistent infection. *Am. J. Vet. Res.*, 1983, **44**, 975.
- PARKS J.B., KENDRICK J.W. The isolation and partial characterization of a herpesvirus from a case of bovine metritis. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 1973, **41**, 211.
- POTGIETER L.N.D., MARE J. Assay and antigenic interrelationships of the recently isolated herpesviruses, DN 599, FTC and V 11. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 1974, **46**, 238.
- RWEYEMAMU M.M., LORETU K. Isolation of «non-syncytia forming» herpesvirus from cattle in Tanzania. *J. Comp. Path.*, 1973, **83**, 377.

- SMITH P.C., CUTLIP R.C., RITCHIE A.E., YOUNG J.K. A bovine herpesvirus associated with a disease of the upper respiratory tract of feedlot cattle. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1972, **161**, 1134.
- STORZ J. Comments on malignant catarrhal fever. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1968, **152**, 804.
- STORZ J., EHLERS B., TODD W.J. LUDWIG H. Bovine cytomegaloviruses: Identification and differential properties. *J. Gen. Virol.*, 1984, **65**, 697.
- THEODORIDIS A. Preliminary characterization of viruses isolated from cases of epididymitis and vaginitis in cattle. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 1978, **45**, 187.
- TOELLE V.D., ROBINSON O.W. Estimates genetic correlations between testicular measurements and female reproductive traits in cattle. *J. Anim. Sci.*, 1985, **60**, 89.
- 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. *Ann. Méd. Vét.*, 1981, **125**, 207.
- VAN DER MAATEN M.J., BOOTHE A.D. Isolation of a herpes-like virus from lymphosarcomatous cattle. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 1972, **37**, 87.
- WELLEMANS G., ANTOINE H., BROES A., CHARLIER G., VAN OPDENBOSCH E. Symptomatologie variée apparaissant lors de métrites chroniques associées à un virus herpes chez les bovins. *Ann. Méd. Vét.*, 1984, **128**, 65.
- WELLEMANS G., VAN OPDENBOSCH E., MAMMERICKX M. Inoculation expérimentale du virus LVR 140 (herpès bovin 4) à des vaches gestantes et non gestantes. *Ann. Rech. Vét.*, 1986, **17**, 89.

SUMMARY

Experimental infection of bulls by intratesticular injection of a Bovid herpesvirus 4 strain isolated from a case of orchitis

Four Belgian Blue bulls aged from 12 to 14 months were used in this experiment. They were free of BHV-4 and BVD infections. Three of them were inoculated by intratesticular route with 10^5 pfu of the BHV-4 strain in each testicle (day 0). The fourth bull was used as control and received the same volume of uninfected culture supernatant. Testicles were surgically removed at regular intervals. One of the infected bulls was killed on day 5 and several organs were removed for viral examination.

No clinical sign was recorded and no gross lesion was detected in infected bulls. Virus was reisolated in the testicles. Infected bulls showed a seroconversion beginning on day 16 and viral excretion was detected in ocular and nasal swabs from day 18 to day 34 post-infection (last day of experiment). A viral multiplication was therefore demonstrated in infected bulls and the virus was rapidly present in a latent state in the testicles but no orchitis was observed.