

Sommaire / Contents

PRODUCTIONS ANIMALES ET PRODUITS ANIMAUX ANIMAL PRODUCTION AND ANIMAL PRODUCTS

113-119 Effets de la dose de gonadotrophines sur l'œstrus et la production d'embryons chez les brebis Hamra et Ouled Djellal. *Effects of the gonadotropin dose on estrus and embryo production in Hamra and Ouled Djellal ewes.* Gharbi I., Dechicha A.S., Ferrouk M., Baazize-Ammi D., Kebbal S., Guetarni D. (en français)

RESSOURCES ALIMENTAIRES ET ALIMENTATION FEED RESOURCES AND FEEDING

121-129 Effet de la farine de feuilles de payaye (*Carica papaya*) et des enzymes alimentaires sur les performances, la digestibilité, la composition de la carcasse et du sang chez le poulet de chair. *Effect of pawpaw (*Carica papaya*) leaf meal and dietary enzymes on broiler performance, digestibility, carcass and blood composition.* Oloruntola O.D., Ayodele S.O., Oloruntola D.A. (in English)

ISSN 1951-6711

Publication du
Centre de coopération internationale
en recherche agronomique pour le développement
<http://revues.cirad.fr/index.php/REMT>
<http://www.cirad.fr/>

Directeur de la publication / *Publication Director:*
Michel Eddi, PDG / *President & CEO*

Rédacteurs en chef / *Editors-in-Chief:*
Gilles Balança, Denis Bastianelli, Frédéric Stachurski

Rédacteurs associés / *Associate Editors:*
Guillaume Duteurtre, Bernard Faye, Flavie Goutard,
Vincent Porphyre

Coordinatrice d'édition / *Publishing Coordinator:*
Marie-Cécile Maraval

Traductrices/*Translators:*
Marie-Cécile Maraval (anglais),
Suzanne Osorio-da Cruz (espagnol)

Webmestre/*Webmaster:* Christian Sahut

Maquettiste/*Layout:* Alter ego communication, Aniane, France

COMITÉ SCIENTIFIQUE / *SCIENTIFIC ADVISORY BOARD*

Hassane Adakal (NER), Nicolas Antoine-Moussiaux (BEL),
Michel Doreau (FRA), Mohammed El Khasmi (MAR),
Philippe Lescoat (FRA), Hamani Marichatou (NER),
Ayao Missohou (SEN),
Harentsoaniana Rasamoelina-Andriamanivo (MDG),
Jeremiah Saliki (USA, CMR), Jeevantee Sunita Santchurn (MUS),
Hakim Senoussi (DZA), Taher Srairi (MAR),
Hussaini Tukur (NGA), Jean Zoundi (BFA, FRA)



<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Cirad, Montpellier, février 2019

SANTÉ ANIMALE ET ÉPIDÉMIOLOGIE ANIMAL HEALTH AND EPIDEMIOLOGY

131-135 Dynamique des populations de tiques infestant les ovins dans les steppes arides de Tunisie. *Population dynamics of ticks infesting sheep in the arid steppes of Tunisia.* Elati K., Ayadi A.A., Khamassi Khbou M., Jdidi M., Rekik M., Gharbi M. (in English)

137-141 Caractérisation des types de bactéries isolés dans des élevages de poules pondeuses commerciales de l'Etat d'Ogun, Nigeria. *Characterization of bacterium types isolated from commercial laying hen farms in Ogun State, Nigeria.* Adebowale O., Adeyemo O. (in English)

143-147 Risque épidémiologique de la peste équine africaine chez les ânes au Burkina Faso. *Epidemiological risk of African horse sickness in donkeys in Burkina Faso.* Savadogo M., Sow A., Dahourou L.D., Cailleau A., Kalandi M., Sawadogo G.J. (en français)

Effets de la dose de gonadotrophines sur l'œstrus et la production d'embryons chez les brebis Hamra et Ouled Djellal

Ismail Gharbi^{1*} Amina Samia Dechicha¹ Mustapha Ferrouk¹
Djamila Baazize-Amami¹ Seddik Kebbal¹ Djamel Guetarni²

Mots-clés

Ovin, brebis Ouled Djellal, brebis Hamra, superovulation, pFSH, embryon animal, Algérie

Submitted: 1 April 2018

Accepted: 13 June 2018

Published: 29 October 2018

DOI: 10.19182/remvt.31639

Résumé

L'application des techniques de superovulation et de production d'embryons est incontournable pour la conservation des ressources génétiques ovines. L'objectif de la présente étude a été d'évaluer l'effet de l'administration de deux doses d'hormone folliculostimulante d'origine porcine (pFSH) sur le délai d'apparition et la durée de l'œstrus, la réponse ovarienne, et la production d'embryons chez les brebis des races Ouled Djellal (OD) et Hamra (H). Les brebis OD (n = 15) et H (n = 14) ont été synchronisées par la pose d'éponges vaginales imprégnées avec 40 mg d'acétate de fluorogestone (FGA), et superovulées par l'administration de 16 ou 20 UA de pFSH durant les trois derniers jours du traitement progestagène. Le septième jour après œstrus et saillie naturelle, les embryons ont été collectés par laparotomie. Chez les brebis OD le début de l'œstrus a été plus précoce avec l'utilisation de 20 UA qu'avec celle de 16 UA ($22,1 \pm 4,5$ vs $25,0 \pm 3,5$, $p < 0,05$), de même la durée de l'œstrus a été plus longue $40,0 \pm 7,1$ vs $34,0 \pm 6,6$, $p < 0,05$. Chez les brebis H l'augmentation de la dose de pFSH de 16 UA à 20 UA a induit une baisse de production d'embryons : taux de collecte $72,2$ vs $47,1$, $p < 0,001$; nombre de structures récoltées $5,9 \pm 3,4$ vs $3,6 \pm 2,1$, $p < 0,05$; nombre d'embryons récoltés $5,1 \pm 2,6$ vs $3,2 \pm 1,9$, $p < 0,05$; embryons de grade 1 et 2, $4,3 \pm 2,4$ vs $2,1 \pm 1,7$, $p < 0,01$. En revanche, chez les brebis OD le taux d'ovulation et la production d'embryons ont été nettement améliorés lors de l'utilisation d'une dose de 20 UA : nombre de corps jaunes $6,9 \pm 3,9$ vs $10,4 \pm 5,4$, $p < 0,05$; nombre d'embryons récoltés $5,1 \pm 2,6$ vs $3,2 \pm 1,9$, $p < 0,05$; embryons de grade 1 et 2, $2,2 \pm 1,6$ vs $4,3 \pm 1,7$, $p < 0,05$. Les résultats indiquent que la réponse ovulatoire, l'œstrus, et la production d'embryons sont influencés par la dose de la pFSH et par la race.

■ Pour citer cet article : Gharbi I., Dechicha A.S., Ferrouk M., Baazize-Amami D., Kebbal S., Guetarni D., 2018. Effects of the gonadotropin dose on estrus and embryo production in Hamra and Ouled Djellal ewes. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 71 (3) : 113-119, doi: 10.19182/remvt.31639

■ INTRODUCTION

En Algérie, Ouled Djellal (OD) et Hamra (H) comptent parmi les principales races ovines locales standardisées et normalisées (ITELV, 2012). Les ovins OD, plus importants numériquement (environ 11 340 000 têtes), représentent plus de 60 % du cheptel national (Moula, 2018). Par ailleurs, les ovins Hamra ont vu leur effectif

diminuer drastiquement, pour passer de 2 500 000 têtes dans les années 1980 à 55 800 têtes en 2003 (Feliachi et al., 2003). Les deux races ont connu des pratiques de croisements anarchiques ou non contrôlés (Djaout et al., 2017), situation qui favoriserait la disparition des standards phénotypiques, du potentiel génétique, et l'augmentation de la consanguinité dans les troupeaux. Les techniques de superovulation, de production et de transfert d'embryons sont d'un grand intérêt pour conserver les ressources génétiques ovines.

L'induction de la superovulation chez la brebis peut être réalisée par injection de gonadotrophine chorionique équine (eCG) ou d'extrait hypophysaire (hormones folliculostimulante / lutropine [FSH/LH]) (Gonzalez-Bulnes et al., 2004a). L'utilisation de la FSH permettrait une production plus importante d'embryons de qualité que celle de l'eCG (Oliveira et al., 2014 ; D'Alessandro et Martemucci, 2016). Chez les ovins, Baril et Guignot (2010) ainsi que Gibbons et Cueto (2011)

1. Institut des sciences vétérinaires, Université de Blida 1, BP 270 Blida 09000, Algérie.

2. Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université de Blida 1, Blida 09000, Algérie.

* Auteur pour la correspondance

Tél. : +213 06 63 68 75 97 ; email : ism_guarb@yahoo.fr



rapportent que l'utilisation de la FSH dans le protocole « classique » de superovulation permet d'obtenir en moyenne 12 à 15 ovulations, avec des résultats pouvant varier de 0 à 20. Cette grande variabilité dans la réponse à la superovulation demeure l'un des facteurs limitant la production d'embryons (Quan et al., 2011). En effet, elle est dépendante de nombreux facteurs intrinsèques comme l'âge, la race et le statut ovarien (Gonzalez-Bulnes et al., 2004a), et extrinsèques comme la saison, la nutrition, l'origine et la dose de gonadotrophine (Gonzalez-Bulnes et al., 2004a ; 2004b ; D'Alessandro et Martemucci, 2016).

Le facteur race représente approximativement 30 % de la variabilité des rendements d'embryons obtenus en réponse au traitement FSH (Vivanco et al., 1994). Les différences de réponse superovulatoire entre les races sont liées au potentiel génétique des animaux (Baril et Guignot, 2010), à la prolificité différente des races, avec les meilleures réponses obtenues chez les races fortement prolifiques (Picazo et al., 1996 ; Dufour et al., 2000 ; Baril et Guignot, 2010). Néanmoins, des différences de rendement de superovulation ont été aussi trouvées en comparant des races non-prolifiques, où une interaction entre le type de gonadotrophine utilisé et la race a été décrite (Picazo et al., 1996). Ces différences entre races semblent être dues au recrutement et à la croissance d'un nombre élevé de follicules antraux présents dans l'ovaire au début du traitement FSH (Rebolledo et al., 2017), à des taux d'ovulation différents et à une fluctuation de la sécrétion de FSH et LH en réponse aux gonadotrophines exogènes (Ammoun et al., 2006).

La dose de gonadotrophines exogènes est un facteur clé pour l'obtention de réponses superovulatoires optimales et homogènes (Boscós et al., 1997). De nombreux travaux montrent qu'il existe un effet dose-réponse de la FSH où les doses totales efficaces et recommandées chez la brebis sont comprises entre 16 et 20 mg (Gibbons et Cueto, 2011 ; Oliveira et al., 2014). Elles peuvent cependant s'avérer insuffisantes ou au contraire excessives pour certains génotypes particuliers (Baril et Guignot, 2010). L'utilisation d'une faible dose de FSH diminuerait le nombre de follicules recrutés, le taux d'ovulation et par conséquent le nombre d'embryons transférables (Boscós et al., 1997 ; Gibbons et Cueto, 2011).

En revanche, l'administration d'une dose supérieure à 16 voire 20 mg n'entraîne pas l'augmentation de la réponse ovulatoire (Gibbons et Cueto, 2011). Au contraire, elle peut provoquer une stimulation prolongée des follicules anovulatoires qui produisent des œstrogènes à des concentrations élevées et persistantes pendant la première phase lutéale, induisant ainsi la libération anticipée de prostaglandine F2 α (PGF2 α) et la régression prématurée des corps jaunes (Maciel et al., 2017), phénomène aboutissant à la diminution du nombre d'embryons transférables (D'Alessandro et al., 1996 ; Maciel et al., 2017). De plus, quand plusieurs follicules sont stimulés par de fortes doses, les limitations physiques de l'ovaire, comme la diminution de l'apport sanguin aux follicules, le dérèglement des mécanismes endocriniens et la production excessive de stéroïdes ovariens, interfèrent avec le développement folliculaire ou l'ovulation (Katanya et al., 2009).

A notre connaissance, aucun essai de superovulation et de production d'embryons n'a concerné les races locales Hamra et Ouled Djellal. Ainsi cette étude proposait d'évaluer l'effet de l'administration de deux doses de FSH d'origine porcine (pFSH) sur les caractéristiques œstrales, la réponse ovarienne et la production d'embryons chez les brebis Ouled Djellal et Hamra.

■ MATERIEL ET METHODES

Animaux et cadre de l'expérimentation

L'étude a concerné des brebis et des béliers provenant des stations d'expérimentation de l'Institut technique des élevages (ITELV ; institution étatique de préservation des races pures) d'Ain M'Lila et de

Saïda, régions considérées comme les berceaux d'origine respectivement des races Ouled Djellal et Hamra. Les animaux ont été transportés et élevés dans un système semi-intensif (bergerie) sous éclairage naturel dans la ferme expérimentale de l'Université de Blida située à 50 kilomètres d'Alger (36° 28' N et 2° 49' E).

Les expérimentations ont été menées durant la période de reproduction (septembre à novembre). Elles ont concerné 29 brebis donneuses présentant un bon état sanitaire : 15 OD (5 primipares et 10 multipares) âgées de 2 à 5 ans et d'un poids vif variant entre 36 et 61 kg ; et 14 H (4 primipares et 10 multipares) âgées de 2 à 6 ans et d'un poids vif variant entre 28 et 58 kg. Quatorze béliers (7 OD et 7 H) reproducteurs âgés de 3 à 7 ans et d'un poids vif variant entre 52 et 78 kg ont été utilisés pour la détection des chaleurs et les saillies. Les animaux sélectionnés ont été déparasités un mois avant le début de l'étude avec de l'albendazole (Valbazen suspension, Pfizer Animal Health) et de l'ivermectine (Ivomec injectable, Merial, France). Leur régime alimentaire se composait de foin complété avec 500 grammes de concentré par animal par jour ; l'eau était distribuée *ad libitum*.

Protocole hormonal

Dans une étude croisée, toutes les brebis ont été soumises à deux protocoles de superovulation successifs (T₁ et T₂) à deux mois d'intervalle (figure 1). L'œstrus a été induit par le retrait, après 14 jours, d'une éponge vaginale imprégnée de 40 mg d'acétate de fluorogestone (FGA) (Chronogest, Intervet, France). Chaque brebis a été superovulée par l'administration successive de 16 ou 20 unités Armour (UA) de pFSH purifiée (Stimufol, Replibiol, Université de Liège, Belgique). La pFSH (160 μ g ou 200 μ g ; une unité de 1 mg UA = 10 μ g de FSH pure) a été administrée à doses décroissantes en six injections réalisées matin et soir au cours des trois derniers jours du traitement par le progestagène. Les deux dernières injections de pFSH ont été enrichies par addition respectivement de 60 μ g et 90 μ g de pLH (FSH/LH = 0,4 et 0,3). Une injection intramusculaire de 125 mg de cloprosténol (Estrumate : analogue de PGF₂ α , solution injectable, Intervet) a été réalisée le jour et le lendemain de la récolte des embryons afin d'éviter une gestation.

Détection de l'œstrus et saillie

La détection de l'œstrus a été réalisée à l'aide de béliers entiers munis d'un tablier toutes les quatre heures, de la 12^e à la 96^e heure après le retrait de l'éponge vaginale. Toute donneuse restant immobile lors du chevauchement par le bélier détecteur a été considérée en chaleurs et mise en contact avec le bélier reproducteur. Une double saillie en main a été aussi réalisée, à 32 et 44 heures après le retrait de l'éponge vaginale avec des béliers reproducteurs (de la race respective) à raison d'un mâle pour cinq brebis.

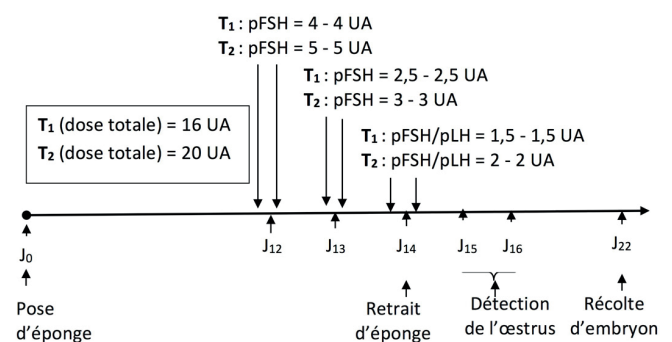


Figure 1 : protocoles de traitements de synchronisation et de superovulation des brebis de race Hamra et Ouled Djellal à la ferme expérimentale de l'Université de Blida en Algérie.

Dénombrement des corps jaunes, récolte, recherche et classification des embryons

Pour éviter de récolter chirurgicalement les femelles présentant un nombre de corps jaunes inférieur à 2, la réponse ovarienne a été évaluée par laparoscopie sept jours après le début de l'œstrus (Baril et al., 1993), par le dénombrement des corps jaunes et des follicules anovulatoires. Les embryons ont été récoltés par laparotomie médioventrale selon le protocole conventionnel utilisé chez les petits ruminants (Baril et al., 1993). La laparoscopie et la laparotomie ont été effectuées sous anesthésie générale par l'administration intramusculaire de 0,2 mg/kg de poids vif de xylazine (Rompun Bayer Ag, Leverkusen, Germany) et de 5 mg/kg de poids vif de kétamine (Imalgène1000, Merial, Lyon, France).

Les embryons ont été récoltés par lavage successif rétrograde des deux cornes (Baril et al., 1993). Il consiste à injecter, au niveau de la base de la corne utérine, 40 ml de tampon PBS (*phosphate-buffered saline* ; IMV Technologies, L'Aigle, France) supplémenté de 4% de BSA (*bovine serum albumine* ; IMV Technologies). La récupération du milieu de récolte a été réalisée à l'extrémité opposée de la corne, près de la jonction utéro-tubaire par ponction et insertion d'un cathéter de collecte muni d'une aiguille de perfusion émoussée (figure 2).

Après filtration et décantation du milieu de récolte, une recherche et un classement des embryons selon les critères morphologiques décrits par Robertson et Nelson (1999) ont été réalisés sous loupe binoculaire et microscope inversé (x 20 à 400). Les embryons ont été classés selon les critères morphologiques de l'International Embryo Transfer Society (IETS ; Robertson et Nelson, 1999), à savoir :

- grade 1, excellent (embryons congelables) ; l'embryon est symétrique et sphérique ; les blastomères sont uniformes en taille, couleur et densité ; le stade de développement est en adéquation avec la date de récolte ; au moins 85 % des cellules sont intactes et rattachées à la masse cellulaire ; la zone pellucide est lisse et sphérique ;
- grade 2, bon ou satisfaisant (embryons transférables mais non-congelables) ; des irrégularités modérées concernent la forme globale de l'embryon, la taille, la couleur ou la densité de ses cellules ; au moins 50 % de sa masse cellulaire est intacte ;
- grade 3, médiocre (embryons non-transférables et non-congelables) ; des irrégularités majeures concernent la forme de l'embryon, la taille, la couleur ou la densité de ses cellules ; au moins 25 % de sa masse cellulaire est intacte ;
- grade 4, développement arrêté (embryon mort ou dégénéré).

Paramètres évalués et analyses statistiques

Les paramètres suivants ont été évalués : le délai d'apparition de l'œstrus (intervalle de temps compris entre le retrait de l'éponge vaginale et la première acceptation du chevauchement), la durée de l'œstrus (intervalle de temps compris entre la première et la dernière acceptation du chevauchement), le pourcentage de brebis en œstrus (nombre [nb.] de brebis détectées en œstrus / nb. total de brebis traitées x 100), le pourcentage de récolte (nb. d'ovocytes non-fécondés et d'embryons récoltés / nb. total de corps jaunes x 100), le pourcentage de fécondation (nb. d'embryons récoltés / nb. total d'ovocytes non-fécondés et d'embryons récoltés x 100), et le pourcentage d'embryons de grade 1 et 2 (nb. d'embryons de grade 1 et 2 / nb. total d'embryons x 100).

Les données relatives à l'œstrus (début et durée de l'œstrus), à la qualité des embryons (grade 1, 2, 3 et 4), aux ovocytes non-fécondés et aux embryons récoltés ont été soumises à une analyse de la variance (Anova). Le test t de Student a été utilisé pour comparer l'effet de la race et du traitement sur la réponse ovarienne (corps jaunes, follicules anovulatoires). Les pourcentages des femelles en œstrus, de collecte, de fécondation et d'embryons de grade 1 et 2 par traitement, ont été analysés en utilisant le test du Chi carré. Le logiciel SYSTAT (version 10) a été utilisé pour toutes les analyses statistiques (niveau de signification $p \leq 0,05$).

■ RESULTATS

Effet de la dose de pFSH sur le comportement œstral, la réponse ovarienne et la production d'embryons

L'œstrus a été détecté chez la totalité des brebis OD et H de 16 à 32 heures (soit en moyenne $23,2 \pm 3,8$ h) après le retrait de l'éponge vaginale. Sa durée a été de $36,1 \pm 7,2$ h (figure 3).

Chez les brebis OD traitées avec 20 UA l'œstrus a été plus précoce qu'avec 16 UA ($22,1 \pm 4,5$ h vs $25,0 \pm 3,5$ h, $p = 0,05$) ; de même la durée moyenne de l'œstrus a été significativement plus longue ($40,0 \pm 7,1$ h vs $34,0 \pm 6,6$ h, $p = 0,02$) et un plus grand nombre de corps jaunes a été observé ($10,4 \pm 5,4$ vs $6,9 \pm 3,9$, $p = 0,05$) (tableau I). En outre, le nombre moyen de structures récoltées a eu tendance à être plus élevé à la dose de 20 UA ($6,1 \pm 3,7$ vs $4,0 \pm 2,3$, $p = 0,07$) et le nombre moyen d'embryons récoltés a été significativement plus élevé ($5,1 \pm 2,3$ vs $3,2 \pm 2,0$, $p = 0,02$). Aucune différence significative n'a été observée entre les deux traitements pour le taux de collecte (60,1 % vs 58,6 %, $p = 0,81$) et de fécondation (83,7 % vs 80,3 %, $p = 0,59$). L'appréciation de la qualité des embryons a révélé que chez les brebis OD le nombre moyen d'embryons de grade 1 et 2 a été significativement ($p = 0,01$ et $p = 0,006$) plus élevé avec 20 UA qu'avec 16 UA. Concernant le nombre moyen d'embryons de grade 3 et 4, aucune différence significative n'a été observée entre les deux traitements (tableau II).

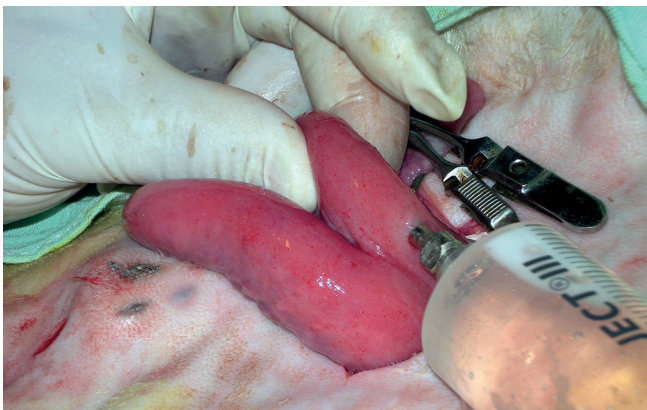
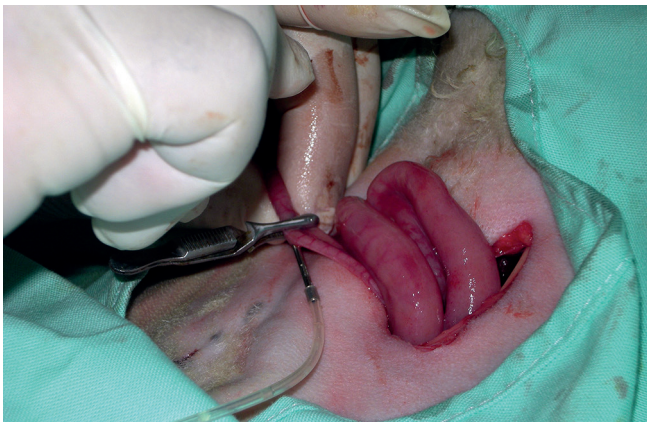


Figure 2 : méthode de collecte rétrograde des embryons à la ferme expérimentale de l'Université de Blida en Algérie ; en haut : mise en place d'un cathéter de collecte au niveau de la jonction utéro-tubaire ; en bas : injection de PBS au niveau de la base de la corne utérine. (© I. Gharbi)

Tableau I

Effet de la dose de pFSH et de la race ovine sur les caractéristiques de l'œstrus et la réponse ovarienne à la ferme expérimentale de l'Université de Blida en Algérie

	Ouled Djellal		Hamra	
	Dose de pFSH		Dose de pFSH	
	16 UA	20 UA	16 UA	20 UA
Brebis traitées	15	15	14	14
Brebis en œstrus	15/15	15/15	14/14	14/14
Début de l'œstrus ¹ (h)	22,1 ± 4,5 ^b	25,0 ± 3,5 ^a	23,1 ± 2,3	22,6 ± 4,3
Durée de l'œstrus ¹ (h)	34,0 ± 6,6 ^a	40,0 ± 7,1 ^b	34,6 ± 6,2	35,7 ± 8,1
Corps jaunes ¹	6,9 ± 3,9 ^a	10,4 ± 5,4 ^b	8,5 ± 3,5	7,4 ± 3,7
Follicules anovulatoires ¹ (≥ 4 mm)	0	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,3	0

¹ Moyenne ± écart type. Les valeurs présentant sur une même ligne des lettres en exposant sont significativement différentes (^a vs ^b, p ≤ 0,05).

Chez les brebis H aucune différence significative n'a été observée entre les deux traitements pour le délai d'apparition de l'œstrus (environ 23 h, p = 0,66) et la durée de l'œstrus (environ 35 h, p = 0,67). Le traitement avec 20 UA a induit un nombre moins élevé de corps jaunes qu'avec 16 UA (7,4 ± 3,7 vs 8,5 ± 3,5, p = 0,44) (tableau II). En outre, l'augmentation de la dose d'hormone de 16 UA à 20 UA a eu un effet significativement négatif sur le taux de collecte (72,2 vs 47,1, p < 0,001), le nombre moyen de structures récoltées (5,9 ± 3,4 vs 3,6 ± 2,1, p = 0,03) et le nombre d'embryons récoltés (5,1 ± 2,6 vs 3,2 ± 1,9, p = 0,04) de grade 1 (p = 0,01) et de grade 2 (p = 0,03). Aucune différence significative n'a été observée entre les deux traitements pour le nombre moyen d'embryons de grade 3 et 4 (tableau II).

Effet de la race sur le comportement œstral, la réponse ovarienne et la production d'embryons

A la dose de 16 UA l'œstrus est apparu plus précocement (p = 0,09) chez les brebis H (23,1 ± 2,3 h) que chez les brebis OD (25,0 ± 3,5 h). Aucune différence significative (p = 0,26) n'a été observée entre les deux races pour la réponse ovulatoire. Néanmoins, chez les brebis H le rendement de la production d'embryons a été significativement plus élevé que chez les brebis OD avec un taux de collecte de 72,2 vs 58,6 (p = 0,03), un nombre moyen d'embryons récoltés de 5,1 ± 2,6 vs 3,2 ± 2,0 (p = 0,03), de grade 1 de 3,2 ± 2,1 vs 1,7 ± 1,0 (p = 0,02), de grade 2 de 1,1 ± 0,8 vs 0,5 ± 0,8 (p = 0,05), et un taux d'embryons de grade 1 et 2 de 85,9 % vs 69,4 % (p = 0,02) (tableau II).

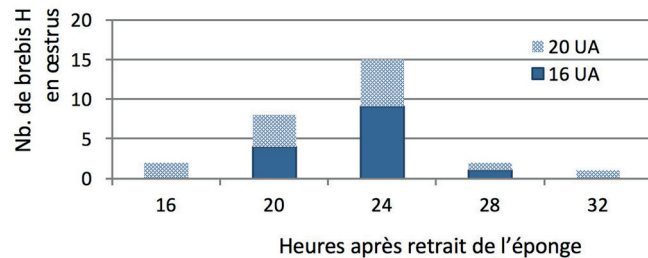
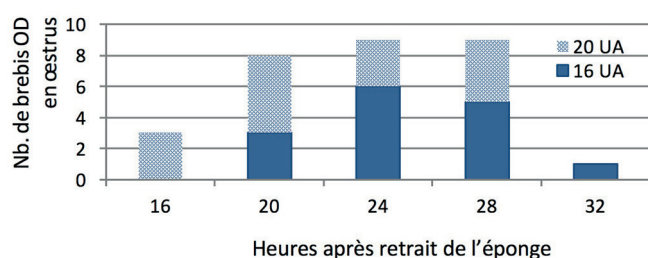


Figure 3 : début de l'œstrus chez les brebis Ouled Djellal (OD) et Hamra (H) traitées avec 16 UA et 20 UA de pFSH à la ferme expérimentale de l'Université de Blida en Algérie.

Tableau II

Effet de la dose de pFSH (16 UA, 20 UA) et de la race ovine sur la production d'embryons à la ferme expérimentale de l'Université de Blida en Algérie

	Ouled Djellal		Hamra	
	Dose de pFSH		Dose de pFSH	
	16 UA	20 UA	16 UA	20 UA
Brebis récoltées	15	15	14	14
Structures récoltées ¹	4,0 ± 2,3	6,1 ± 3,7 ^a	5,9 ± 3,4 ^a	3,6 ± 2,1 ^b
Taux de récolte (%)	58,6 ^a	60,1 ^a	72,2 ^c	47,1 ^d
Embryons ¹	3,2 ± 2,0 ^a	5,1 ± 2,3 ^b	5,1 ± 2,6 ^b	3,2 ± 1,9 ^a
Ovocytes non fécondés ¹	0,8 ± 0,9	1,0 ± 1,4	0,8 ± 1,2	0,4 ± 0,5
Taux de fécondation (%)	80,3	83,7	85,5	89,8
Qualité des embryons ¹				
Grade 1	1,7 ± 1,0 ^{a,e}	3,0 ± 1,6 ^f	3,2 ± 2,1 ^{b,f}	1,6 ± 1,2 ^e
Grade 2	0,5 ± 0,8 ^{a,e}	1,3 ± 0,6 ^f	1,1 ± 0,8 ^b	0,5 ± 0,8 ^{c,e}
Grade 3	0,5 ± 0,6	0,1 ± 0,3	0,1 ± 0,3	0,2 ± 0,5
Grade 4	0,5 ± 0,6	0,7 ± 0,7	0,7 ± 0,9	0,9 ± 0,8
Embryons de grade (1 et 2) ¹	2,2 ± 1,6 ^e	4,3 ± 1,7 ^f	4,3 ± 2,4 ^f	2,1 ± 1,7 ^e
Taux d'embryons de grade (1 et 2) (%)	34/49 (69,4) ^a	65/77 (84,4) ^{b,e}	61/71 (85,9) ^{b,e}	29/44 (65,9) ^f

¹ Moyenne ± écart type. Les valeurs présentant sur une même ligne des lettres en exposant sont significativement différentes (^a vs ^b, ^a vs ^c, ^a vs ^d, ^b vs ^c, p ≤ 0,05 ; ^e vs ^f, p < 0,01 ; ^c vs ^d, p < 0,001).

A la dose de 20 UA, la durée de l'œstrus tendait à être plus longue chez les brebis OD (40,0 ± 7,1) que chez les brebis H (35,7 ± 8,1) (p = 0,10). De plus, le nombre moyen de corps jaunes chez les brebis OD tendait à être significativement plus élevé (10,4 ± 5,4 vs 7,4 ± 3,7, p = 0,09). Un effet significatif de la race sur le rendement de la superovulation a aussi été mis en évidence. Chez les brebis OD le taux de collecte (60,1 vs 47,1, p = 0,04), le nombre moyen de structures récoltées (6,1 ± 3,7 vs 3,6 ± 2,1, p = 0,02), d'embryons récoltés (5,1 ± 2,3 vs 3,2 ± 1,9, p = 0,02), de grade 1 (3,0 ± 1,6 vs 1,6 ± 1,2, p = 0,01), de grade 2 (1,3 ± 0,6 vs 0,5 ± 0,8, p = 0,003), et le taux d'embryons de grade 1 et 2 (84,4 vs 65,9, p = 0,01) ont été significativement plus élevés que chez les brebis H.

■ DISCUSSION

Cette étude a confirmé l'effet significatif de la dose de pFSH et de la race sur la réponse à un traitement de superovulation. Il est à noter que la comparaison des deux doses de pFSH chez les deux races a été réalisée au moyen d'un protocole expérimental contrôlé et des conditions standardisées. Le choix de ce protocole sous forme d'étude croisée a révélé l'effet du traitement pFSH et de la race et ainsi d'accroître le potentiel de notre étude. En effet, ce type de méthode où chaque brebis est son propre témoin permet de réduire le nombre de sujets nécessaires (essais de petits effectifs), d'améliorer la fiabilité des résultats et est particulièrement indiqué si la variabilité de la réponse interindividuelle est importante (Vray et al., 2004).

Nos protocoles de superovulation ont induit l'apparition d'un œstrus chez 100 % des brebis des deux races. L'intervalle moyen entre le retrait de l'éponge et le début de l'œstrus, compris entre 16 et 32 heures, a ainsi été comparable à celui rapporté par Baril et al. (1993) chez des brebis Lacaunes traitées avec 20 UA. Le recours à une dose de 20 UA a contribué chez la race OD à induire l'apparition plus précoce et plus longue de l'œstrus. Cette observation a été rapportée également par d'autres auteurs (Baril et al., 1993 ; D'Alessandro et Martemucci, 2004). Dans la présente étude, les brebis n'ont pas reçu d'injection de PGF₂α en fin de traitement de superovulation pour contrôler le cycle œstral. En effet, chez la brebis, l'effet des prostaglandines (PGF₂α ou ses analogues synthétiques) dans les protocoles de traitements de synchronisation et de superovulation a été étudié, mais les conclusions sont contradictoires et leur rôle n'a pas clairement été établi. Il semble que l'utilisation de PG altère le transport des spermatozoïdes et diminue le taux de gravidité et de récolte des embryons (Fierro et al., 2013). De plus, selon ces auteurs, l'altération du taux d'ovulation et de la capacité stéroïdogénique des follicules préovulatoires, la qualité des embryons, et la prolificité après l'administration de PG sont controversées.

Chez les brebis OD le nombre de corps jaunes a augmenté avec l'augmentation de la dose de pFSH. A la dose de 20 UA, le nombre de corps jaunes a été comparable à celui obtenu par Lopez-Junior et al. (2006) chez des brebis Morada Nova (10,2 ± 1,2), mais inférieur à celui rapporté par Baril et Guignot (2010) chez les brebis Black Belly (13,9 ± 4,9). A l'inverse chez les brebis H, le nombre de corps jaunes a diminué avec l'augmentation de la dose. Cet effet de la dose a également été rapporté par Buckrell et al. (1990) chez la race Dall's (*Ovis dalli dalli*). Le nombre de corps jaunes obtenus après injection de 16 UA de pFSH a été similaire à celui rapporté par Chagas e Silva et al. (2003) chez les brebis Saloia, mais plus faible que celui observé par Boscos et al. (1997) chez les brebis Chios. Il semblerait donc utile de pouvoir déterminer la dose optimale d'un traitement de superovulation au moyen d'une courbe dose-réponse (Baril et al., 1993). Selon Kanitz et al. (2002), l'utilisation de doses croissantes de FSH permet une augmentation significative du nombre d'ovulations jusqu'à l'obtention d'un plateau. Toutefois l'augmentation de la dose n'induit pas nécessairement celle du nombre d'ovulations.

Selon nos observations, les doses de 16 UA et de 20 UA de pFSH semblent devoir être réservées respectivement aux brebis H et OD. Il y aurait donc bien une sensibilité différente des races à la dose injectée (González et al., 2001). Cette observation a également été rapportée chez d'autres races de brebis et chez la chèvre. Avec le même traitement pFSH, le nombre moyen d'ovulations est inférieur chez les chèvres Alpines par rapport à celui observé chez les chèvres Créoles (Baril et Guignot, 2010). La réponse ovulatoire des brebis Lacaunes est inférieure à celle des brebis prolifiques Romanov x Préalpes lorsqu'elles sont traitées avec une dose de 16 mg de pFSH (Torres et Cognié, 1984). Pour une dose de 20 UA, les réponses sont très élevées chez la Booroola et très faibles chez la Mérinos de Rambouillet (Baril et Guignot, 2010). Dans notre étude, l'efficacité moindre du

traitement pFSH observée chez la race H par rapport à la race OD était peut-être due à une population folliculaire différente (Cognié et al., 2003 ; Gonzalez-Bulnes et al., 2004b ; Baril et Guignot, 2010), en lien avec sa prolificité (Picazo et al., 1996 ; Boscos et al., 1997), ou encore son degré de consanguinité (Baril et Guignot, 2010). Il n'est pas exclu que cette réponse différente soit liée à un comportement cinétique différent des gonadotrophines exogènes, à une dynamique folliculaire différente ou encore à une sensibilité plus élevée de récepteurs ovariens à la FSH (Dufour et al., 2000). De plus, selon Ammoun et al. (2006) et Rahman et al. (2014) la différence de poids qui existe entre les races peut aussi influencer les mécanismes de distribution et d'élimination des gonadotrophines.

L'administration de doses décroissantes de pFSH permet l'obtention d'une réponse ovulatoire plus élevée que celle à base de doses constantes (Cognié et al., 2003 ; Gonzalez-Bulnes et al., 2004a), et un apport croissant de LH en fin de traitement améliore la réponse ovulatoire (Cognié et al., 2003 ; D'Alessandro et al., 2005). L'apport de pLH décalé par rapport à la FSH semble correspondre à l'environnement hormonal physiologique du follicule en croissance terminale (Cognié et al., 2003). Une faible incidence des follicules anovulatoires a été observée chez les deux races. Il est à noter que, comparé à la gonadotrophine chorionique équine (eCG), le traitement à base de FSH/LH permet de réduire l'incidence des follicules anovulatoires et l'hypertrophie des ovaires (Martemucci et al., 1997, Cognié, 1999), et d'obtenir un taux élevé et synchrone des ovulations (Cognié, 1999).

Les pourcentages de récolte d'embryons obtenus par voie chirurgicale chez les races OD et H après traitement avec 16 ou 20 UA ont été comparables à ceux rapportés par Gonzalez Bulnes et al. (2004a), Ammoun et al. (2006), et Lopez-Junior et al. (2006) (50 à 75 %) chez les races Manchega ou Morada Nova. La voie chirurgicale semble donc bien devoir être privilégiée par rapport à la voie cervicale ou laparoscopique (Baril et al., 1993 ; Gibbons et Cueto, 2011). La diminution du nombre d'embryons récoltés semble être due à l'effet inhibiteur exercé par le ou les follicules dominants présents au début d'un traitement de superovulation (Baril et Guignot, 2010 ; Gonzalez-Bulnes et al., 2002 ; Veiga-Lopez et al., 2006).

Les pourcentages de fertilisation observés chez les races OD et H ont été légèrement inférieurs à ceux de plus de 90 % rapportés par Bari et al. (2003). Cette réduction serait imputable aux effets hormonaux indirects induits par la superovulation sur la synthèse des œstrogènes et donc la libération de l'hormone LH (Cognié et al., 2003 ; Gonzalez Bulnes et al., 2004a). Le nombre moyen et le pourcentage d'embryons de grade 1 et 2 obtenus dans la présente étude ont été plus élevés après injection de 20 UA et 16 UA respectivement chez les brebis OD et H. Ces constatations confirment que, chez la brebis, le nombre et la qualité d'embryons transférables sont aussi dépendants de la race (Baril et Guignot, 2010). En utilisant la même dose de 20 UA de FSH, Guignot et al. (2009), et Baril et Guignot (2010) rapportent des taux d'embryons transférables faibles et comparables (2,4 ± 2,5), respectivement chez les races Ile de France et Mérinos de Rambouillet. En revanche, un nombre élevé d'embryons transférables (22,8 ± 9,9) a été obtenu par Baril et Guignot (2010) chez la Booroola. Le nombre élevé d'embryons de très bonne qualité obtenu chez certaines races semble être la conséquence d'une forte réponse ovulatoire au traitement FSH (Cognié et al., 2003 ; Baril et Guignot, 2010).

■ CONCLUSION

Cette étude confirme les effets de la race et de la dose de pFSH sur les caractéristiques œstrales, la réponse ovarienne et le nombre d'embryons obtenus. La dose de pFSH semble devoir être adaptée à la race. Les contraintes liées à la production d'embryons chez l'espèce ovine imposent son utilisation dans le cadre de stations expérimentales

avant d'envisager sa diffusion sur le terrain. Cette stratégie permettrait l'élaboration d'une banque d'embryons qui seraient par la suite transférés en vue de la mise en place d'une sélection massale et la préservation voire l'amélioration du patrimoine ovine algérien.

Remerciements

Les auteurs remercient Messieurs Gérard Baril de l'Institut national de recherche agronomique de Tours, France, et Jean-François Beckers de la Faculté de médecine vétérinaire de Liège, Belgique, pour leurs contribution et collaboration permanentes.

REFERENCES

- Amoun I., Encinas T., Veiga-Lopez A., Ros J.M., Contreras I., Gonzalez-Añoover P., Cocero M.J., et al., 2006. Effects of breed on kinetics of ovine FSH and ovarian response in superovulated sheep. *Theriogenology*, **66** (4): 896-905, doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.02.024
- Bari F., Khalid M., Haresign W., Murray A., Merrell B., 2003. Factors affecting the survival of embryos after transfer within a MOET program. *Theriogenology*, **59** (5-6): 1265-1275, doi: 10.1016/S0093-691X(02)01162-7
- Baril G., Brebion P., Chesne P., 1993. Manuel de formation pratique pour la transplantation embryonnaire chez la brebis et la chèvre. FAO, Rome, Italie, 183 p. (Production et santé animales ; 115)
- Baril G., Guignot F., 2010. Production d'embryons *in vivo* et transfert chez les petits ruminants : synthèse des applications / résultats selon les races. *Rencontres Rech. Rumin.*, **17** : 153-158
- Boscos C., Vainas E., Kouskoura T.H., Vafiadis D., Dellis S., 1997. Superovulatory response of Chios and Friesian ewes to two FSH-P dose levels. *Reprod. Domest. Anim.*, **32** (4): 195-198, doi: 10.1111/j.1439-0531.1997.tb01281.x
- Buckrell B.C., Gartley C.I., Mehren K.G., Goodrowe K.L., 1990. Superovulation in Dall's sheep (*Ovis dalli dalli*). *Theriogenology*, **33** (1): 201, doi: 10.1016/0093-691X(90)90625-4
- Chagas e Silva J., Lopes da costa L., Cidadão R., Robalosilva J., 2003. Plasma progesterone profiles, ovulation rate, donor embryo yield and recipient embryo survival in native Salvia sheep in the fall and spring breeding seasons. *Theriogenology*, **60** (3): 521-532, doi: 10.1016/S0093-691X(03)00045-1
- Cognié Y., 1999. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, **51** (1): 105-116, doi: 10.1016/S0093-691X(98)00235-0
- Cognié Y., Baril G., Poulin N., Mermillod P., 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goats. *Theriogenology*, **59** (1): 171-188, doi: 10.1016/S0093-691X(02)01270-0
- D'Alessandro A.G.D., Martemucci G., 2004. Efficiency of superovulatory treatment with FSH-p for *in vivo* embryo production in dairy ewes: multiple versus single dose regimen. *J. Anim. Vet. Adv.*, **3** (6): 388-393
- D'Alessandro A.G.D., Martemucci G., 2016. Superovulatory response to gonadotrophin FSH/LH treatment and effect of progesterin supplement to recipients on survival of transferred vitrified embryos in goats. *Theriogenology*, **85** (2): 296-301, doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.09.038
- D'Alessandro A.G.D., Martemucci G., Taibi L., 2005. How the FSH/LH ratio and dose numbers in the p-FSH administration treatment regimen, and insemination schedule affect superovulatory response in ewes. *Theriogenology*, **63** (6): 1764-1774, doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.08.002
- D'Alessandro A.G.D., Martemucci G., Totoda F., Gambacorta M., Manchisi A., 1996. Superovulation and embryo production in ewes using a commercial pFSH. *Small Rumin. Res.*, **19** (3): 255-261, doi: 10.1016/0921-4488(95)00765-2
- Djaout A., Afri-Bouzebda F., Chekal F., El-Bouyahiaoui R., Rabhi A., Boubekeur A., Benidir M., et al., 2017. Etat de la biodiversité des « races » ovines algériennes. *Gen. Biodiv. J.*, **1** (1) : 1-17
- Dufour J.J., Cognié Y., Mermillod P., Mariana J.C., Romain R.F., 2000. Effects of the Booroola fec gene on ovarian follicular populations in superovulated Romanov ewes pretreated with a GnRH antagonist. *J. Reprod. Fertil.*, **118** (2): 85-94, doi: 10.1530/reprod/118.1.85
- Feliachi K., Kerboua M., Abdelfettah M., Ouakli K., Selhab F., Boudjadjji A., Takoucht A., et al., 2003. Rapport national sur les ressources génétiques animales. Ministère de l'Agriculture et du Développement rural, Commission nationale AnGR, Algérie, 46 p.
- Fierro S., Gil J., Viñoles C., Olivera-Muzante J., 2013. The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: A review. *Theriogenology*, **79** (3): 399-408, doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.10.022
- Gibbons A., Cueto M., 2011. Training manual for embryo transfer in sheep and goats. INTA-EEA, San Carlos de Bariloche, Argentine, 35 p. (Comunicación técnica PA; 559)
- Gonzalez F., Calero P., Beckers J.F., 2001. Induction of superovulation in domestic ruminants. In: Biotechnology in animal husbandry (Eds. Renaville R., Burny A.). Kluwer Academic, Netherlands, 209-223
- Gonzalez-Bulnes A., Baird D.T., Campbell B.K., Cocero M.J., Garcia-Garcia R.M., Inskip E.K., Lopez-Sebastian A., et al., 2004a. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *J. Reprod. Fertil.*, **16** (6): 421-435, doi: 10.10371/RD04033
- Gonzalez-Bulnes A., Garcia-Garcia R.M., Souza C.J.H., Santiago-Moreno J., Lopez-Sebastian A., Cocero M.J., Baird D.T., 2002. Patterns of follicular growth in superovulated ewes and influence on endocrine and ovarian response. *Reprod. Domest. Anim.*, **37** (6): 357-361, doi: 10.1046/j.1439-0531.2002.00385.x
- Gonzalez-Bulnes A., Santiago-Moreno J., Garcia-Garcia R.M., Souza C.J.H., Lopez-Sebastian A., Mcneilly A.S., 2004b. Effect of GnRH antagonist treatment on gonadotrophin secretion, follicular development and inhibin A secretion in goats. *Theriogenology*, **61** (5): 977-985, doi: 10.1016/j.theriogenology.2003.07.003
- Guignot F., Baril G., Dupont F., Cognié Y., Folch J., Alabart J.L., Poulin N., et al., 2009. Determination of sex and scrapie resistance genotype in preimplantation ovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, **76** (2): 183-90, doi: 10.1002/mrd.20940
- Institut technique des élevages, 2012. Infos élevages. Bull. trimestriel n° 1. ITELV, Alger, Algérie, 4 p.
- Kanitz W., Beckers J.F., Schneider F., Kanitz E., Leiding C., Nohner H.P., Pohland R., 2002. Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reprod. Nutr. Dev.*, **42** (6): 587-599, doi: 10.1051/rnd: 2002045
- Katanya J.F., Pawel M.B., King W.A., 2009. Relationship between circulating concentrations of ovarian steroids and the superovulatory responses in anestrous ewes following a multiple-dose pFSH regimen. *Small Rumin. Res.*, **82** (2-3): 144-148, doi: 10.1016/j.smallrumres.2009.01.014
- Lopes-Junior E.S., Maia E.L., Paula N.R., Teixeira D.I.A., Villarreal A.B.S., Rondina D., Freitas V.J.F., 2006. Effect of age of donor on embryo production in Morada Nova (white variety) ewes participating in a conservation programme in Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.*, **38** (7-8): 555-561, doi: 10.1007/s11250-006-4344-1
- Maciel G.S., Rodriguez M.G.K., Da Silva P.D.A., Nociti R.P., Santos V.J.C., Uscategui R.A.R., Feliciano M.A.R., et al., 2017. Ovarian superstimulation treatment for multiple ovulation and embryo transfer programs in sheep. *Investigação*, **16** (8): 30-36, doi: 10.26843/investigacao.v16i8.1888
- Martemucci G., Totoda F., Facciolongo A.M., D'Alessandro A.G.D., Gambacorta M., 1997. Ovarian response serum oestradiol-17B concentration and embryo yielded in anoestrus ewes treated with gonadotrophin pituitary extracts. *Zoot. Nutr. Anim.*, **23**: 81-88
- Moula N., 2018. Caractérisation de la race ovine algérienne Tazegzawth. *Tropicicultura*, **36** (1) : 43-53
- Oliveira M.E.F., Feliciano M.A.R., D'Amato C.C., Oliveiraa L.G., Bicudob S.D., Fonseca J.F., Vicentea W.R.R., et al., 2014. Correlations between ovarian follicular blood flow and superovulatory responses in ewes. *Anim. Reprod. Sci.*, **144** (1-2): 30-37, doi: 10.1016/j.anireprosci.2013.10.012
- Picazo R.A., Cocero M.J., Barragán M.L., López-Sebastián A., 1996. Effects of LH administration at the end of an FSH superovulatory regimen on ovulation rate and embryo production in three breeds of sheep. *Theriogenology*, **45** (5): 1065-1073, doi: 10.1016/0093-691X(96)00033-7
- Quan F., Zhang Z., An Z., Hua S., Zhao X., Zhang Y., 2011. Multiple factors affecting superovulation in Poll Dorset in China. *Reprod. Domest. Anim.*, **46** (1): 39-44, doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01551.x
- Rahman M.R., Rahman M.M., Wan Khadijah W.E., Abdullah R.B., 2014. Follicle stimulating hormone (FSH) dosage based on body weight enhances ovulatory responses and subsequent embryo production in goats. *Asian Australas. J. Anim. Sci.*, **27** (9): 1270-1275, doi: 10.5713/ajas.2013.13786

- Rebolledo A.D., Manzanero G.V., Romero A.A., Franco J.Q., Rodriguez J.B., Lorca J.R., Ugalde J.R., 2017. Follicular population at the onset of a superovulatory treatment and ovarian response in hair ewes. *Romanian Biotechnol. Lett.*, **22** (2): 12427-12431
- Robertson I., Nelson R., 1999. Certification and identification of embryos. In: Procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology, emphasizing sanitary precautions, 3rd Edn. International Embryo Transfer Society, Champaign, IL, USA, 109-122
- Torres S., Cognié Y., 1984. Superovulation and egg transfer in the ewe. *Reprod. Nutr. Dev.*, **24** (5A): 623-631, doi: 10.1051/rnd:19840510
- Veiga-Lopez A., Gonzalez-Bulnes A., Tresguerres J.A.F., Dominguez V., Ariznavarreta C., Cocero M.J., 2006. Causes, characteristics and consequences of anovulatory follicles in superovulated sheep. *Domest. Anim. Endoc.*, **30** (2): 76-87, doi: 10.1016/j.domaniend.2005.06.001
- Vivanco H.M., Greaney K.B., Varela H., 1994. Explaining the variability in superovulatory responses and yield of transferable embryos in sheep embryo transfer. *Theriogenology*, **41** (1): 329, doi: 10.1016/S0093-691X(05)80239-0
- Vray M., Girault D., Hoog-Labouret N., Porcher R., Thalabard J.-C., 2004. Méthodologie des essais cliniques de petits effectifs. *Thérapie*, **59** (3) : 273-279, doi : 10.2515/therapie:2004054

Summary

Gharbi I., Dechicha A.S., Ferrouk M., Baazize-Ammi D., Kebbal S., Guetarni D. Effects of the gonadotropin dose on estrus and embryo production in Hamra and Ouled Djellal ewes

The application of superovulation and embryo production techniques is essential for the conservation of sheep genetic resources. The objective of this study was to evaluate the effect of two doses of porcine follicle-stimulating hormone (pFSH) on the onset and duration of estrus, the ovarian response and the production of embryos in sheep of Ouled Djellal (OD) and Hamra (H) breeds. OD ewes (n = 15) and H ewes (n = 14) were synchronized by the insertion of vaginal sponges impregnated with 40 mg of fluorogestone acetate (FGA), and superovulated by the administration of 16 or 20 AU of pFSH during the last three days of progestagen treatment. On day seven after estrus and natural mating the embryos were collected by laparotomy. In OD ewes treated with 20 AU the onset of estrus occurred earlier than in those treated with 16 AU (22.1 ± 4.5 vs 25.0 ± 3.5 , $p < 0.05$), and the duration of estrus was longer (40.0 ± 7.1 vs 34.0 ± 6.6 , $p < 0.05$). In H ewes, the increase in the pFSH dose from 16 AU to 20 AU induced a decrease in embryo production: collection rate 72.2 vs. 47.1 , $p < 0.001$; number of structures collected 5.9 ± 3.4 vs 3.6 ± 2.1 , $p < 0.05$; number of embryos harvested 5.1 ± 2.6 vs 3.2 ± 1.9 , $p < 0.05$; 1-and-2-grade embryos 4.3 ± 2.4 vs 2.1 ± 1.7 , $p < 0.01$. On the other hand, in OD ewes treated with 20 AU the ovulation rate and embryo production were significantly improved: number of corpora lutea 6.9 ± 3.9 vs 10.4 ± 5.4 , $p < 0.05$; number of embryos harvested 3.2 ± 2.0 vs 5.1 ± 2.3 , $p < 0.05$; 1- and 2-grade embryos 2.2 ± 1.6 vs 4.3 ± 1.7 , $p < 0.05$. The results indicate that the ovulatory response, estrus, and embryo production are influenced by the dose of pFSH and the breed.

Keywords: sheep, Ouled Djellal ewe, Hamra ewe, superovulation, pFSH, animal embryo, Algeria

Resumen

Gharbi I., Dechicha A.S., Ferrouk M., Baazize-Ammi D., Kebbal S., Guetarni D. Efecto de la dosis de gonadotropina sobre el estro y la producción del embrión en ovejas Hamra y Ouled Djellal

La aplicación de técnicas de superovulación y producción de embriones es esencial para la conservación de los recursos genéticos de las ovejas. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de dos dosis de hormona estimulante del foliculo porcino (pFSH) sobre la aparición y la duración del estro, la respuesta ovárica y la producción de embriones en ovejas de razas Ouled Djellal (OD) y Hamra (H). Las ovejas OD (n = 15) y H (n = 14) se sincronizaron mediante la inserción de esponjas vaginales impregnadas con 40 mg de acetato de fluorogestone (FGA), y superovuladas mediante la administración de 16 o 20 UA de pFSH durante los últimos tres días de tratamiento con progestágenos. Al día siete post estro y apareamiento natural, se recolectaron los embriones mediante laparotomía. En ovejas OD tratadas con 20 UA, el inicio del estro ocurrió antes que en aquellas tratadas con 16 UA ($22,1 \pm 4,5$ vs $25,0 \pm 3,5$, $p < 0,05$), la duración del estro fue mas prolongada ($40,0 \pm 7,1$ vs $34,0 \pm 6,6$, $p < 0,05$). En las ovejas H, el aumento en la dosis de pFSH de 16 UA a 20 UA indujo una disminución en la producción de embriones: tasa de recolección $72,2$ vs $47,1$, $p < 0,001$; número de estructuras recogidas $5,9 \pm 3,4$ vs $3,6 \pm 2,1$, $p < 0,05$; número de embriones recolectados $5,1 \pm 2,6$ vs $3,2 \pm 1,9$, $p < 0,05$; embriones de grado 1 y 2, $4,3 \pm 2,4$ vs $2,1 \pm 1,7$, $p < 0,01$. Por otro lado, en ovejas OD tratadas con 20 UA, la tasa de ovulación y la producción de embriones mejoraron significativamente: número de cuerpos lúteos $6,9 \pm 3,9$ vs $10,4 \pm 5,4$, $p < 0,05$; número de embriones recolectados $3,2 \pm 2,0$ vs $5,1 \pm 2,3$, $p < 0,05$; embriones de grado 1 y 2, $2,2 \pm 1,6$ vs $4,3 \pm 1,7$, $p < 0,05$. Los resultados indican que la dosis de pFSH y la raza influyen en la respuesta ovulatoria, el estro y la producción de embriones.

Palabras clave: ovino, oveja Ouled Djellal, oveja Hamra, superovulación, pFSH, embrión animal, Argelia

Effect of pawpaw (*Carica papaya*) leaf meal and dietary enzymes on broiler performance, digestibility, carcass and blood composition

Olugbenga David Oloruntola^{1,2*} Simeon Olugbenga Ayodele²
Deborah Adebukola Oloruntola³

Keywords

Broiler chickens, animal feeding, papayas, enzymes, animal performance, Nigeria

Submitted: 8 July 2017
Accepted: 12 July 2018
Published: 29 October 2018
DOI: 10.19182/remvt.31640

Summary

Exogenous enzymes and phytogetic feed additives are proposed as alternatives to antibiotic growth promoters in poultry production. This study assessed the effect of pawpaw leaf meal (PLM) inclusion and enzyme (E) supplementation in the diet of broiler chickens. In total, 288 Arbor-Acre day-old broiler chickens were used. Four diets were formulated to be isocaloric and isonitrogenous: diet 1, control (0% PLM, 0% E), diet 2 (0% PLM, 0.05% E), diet 3 (5% PLM, 0% E), and diet 4 (5% PLM, 0.05% E). Each diet was replicated six times with 12 chickens in each batch. E improved ($p < 0.05$) the body weight gain at three weeks. The dry matter (DM), crude protein (CP), ether extract and ash digestibility were improved ($p < 0.05$) with E, whereas PLM inclusion produced ($p < 0.05$) an increase in DM and CP digestibility. The E x PLM effect was significant ($p < 0.05$) for DM and CP digestibility. E improved ($p < 0.05$) the slaughter weight and reduced the liver weight. Platelets varied across diets and increased ($p < 0.05$) with enzyme supplementation. E reduced ($p < 0.05$) low-density lipoproteins (LDL), whereas PLM reduced ($p < 0.05$) cholesterol and LDL. In conclusion, the association of E and PLM improved chicken growth, and E or PLM inclusion should benefit chicken health.

■ How to quote this article: Oloruntola O.D., Ayodele S.O., Oloruntola D.A., 2018. Effect of pawpaw (*Carica papaya*) leaf meal and dietary enzymes on broiler performance, digestibility, carcass and blood composition. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 71 (3): 121-129, doi: 10.19182/remvt.31640

■ INTRODUCTION

Intensive poultry production in developing countries could be further enhanced through feeding strategies that promote feed utilization in relation to bird performances. Before 2003 in the United Kingdom, the inclusion of antibiotics as growth promoters in animal

feed was widely adopted following the reported growth stimulation observed (Bedford, 2000). Thus according to Falção-e-Cunha et al. (2007), antibiotics have the ability to decrease feed usage per production unit with concomitant increase in production performance. This is in addition to the fact that antibiotics can help reduce the disease burden, inhibit pathogenic microorganisms, and reduce microbial toxic metabolites, epithelium turn over, intestinal motility and bacterial deconjugation of bile salt (Falção-e-Cunha et al., 2007). However, the ban on the use of antibiotics in animal feed has fueled the search for alternative animal growth promoters in the form of enzyme supplementation (García et al., 2008) and phytogetic feed additives (Oloruntola et al., 2018). Enzyme supplementation has been reported to improve changes in the intestinal environment, including the viscosity of the digesta, which may promote contact among nutrients, endogenous enzymes and absorptive mucosae, thus enhancing the usage of the diet by the concerned animal (Lázaro et al., 2003; Mateos et al., 2010).

1. Animal Science Department, Adekunle Ajasin University, Akungba Akoko, Nigeria.

2. Department of Agricultural Technology, The Federal Polytechnic, Ado Ekiti, Nigeria.

3. Department of Microbiology, The Federal University of Technology, Akure, Nigeria.

* Corresponding author

Tel: +234 80 35 84 16 26; Email: oloruntoladavid@gmail.com



<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Phytogenic feed additives are gradually gaining prominence in animal feeding to improve their performance and boost their immune response (Oloruntola et al., 2016b). These products include pawpaw whose leaf has been previously identified by Oloruntola et al. (2018) as a natural source of papain, chymopapain A and B, and papaya peptidase A. Papain is proteolytic and thus capable of enhancing protein digestion (Oloruntola et al., 2018). In addition, the papaya leaf contains broad-spectrum phytochemicals including alkaloids and phenols. Phenolic compounds have high antioxidant activity and free radical scavenging capacity, with the mechanism of inhibiting enzymes responsible for reactive oxygen species production (Kahkonen et al., 2001).

The antibacterial, antifungal, antiviral, neuroprotective and antifertility activities of papaya have also been documented (Kadiri et al., 2016). It is conceivable that the nutritive and phytogenic potentials of the papaya leaf could be used as a growth promoter in broiler chicken feed. Hematological and serum biochemistry assay of livestock can show the physiological disposition of animals to nutrition, meaning that they can be a reflection of the physiological responsiveness of animals to feed and feeding (Oloruntola et al., 2016b). In addition, deviation in the relative internal organ weight of animals has been reported to be indicative of a possible response of their internal organs to toxins in their feed (Ayodele et al., 2016). Therefore, the assessment of the effect of enzymes and pawpaw leaf meal on the performance, carcass, physiological status of the animals, especially the hematology and serum biochemistry, is important. The objective of this study was thus to assess the effect of exogenous enzymes and pawpaw leaf meal inclusion on the performance and physiological status of broiler chickens.

■ MATERIALS AND METHODS

Experimental site, animal management and design

The experiment was carried out at the Teaching and Research Farm Department of the Agricultural Technology, The Federal Polytechnic, Ado Ekiti, Nigeria. In total, 288 Arbor-Acre one-day-old unsexed broiler chicks were randomly distributed into 24 pens of 12 birds each. The pens were allotted to four dietary treatment groups arranged in six replications. The experimental design was of a completely randomized design in a 2 x 2 factorial arrangement, i.e. diets with 0 and 50 g/kg pawpaw leaf meal (PLM), and diets with 0 and 0.5 g/kg enzymes added after feed manufacturing. PLM was included in diets 3 and 4 by replacing palm kernel cake and soybean meal (Table I).

The birds were placed on wood shaving litter in controlled pens. The temperature was controlled within the range of 32 ± 2°C on days 1 to 7, then reduced by 2°C on each successive week and thereafter maintained at 28 ± 2°C until the end of the experiment. In the first week, the birds were exposed daily to 23 hours of lighting and 1 hour of darkness, and thereafter to 18 hours of lighting and 6 hours of darkness until the end of the experiment. The birds were fed their respective experimental diets and water *ad libitum* for six weeks.

Experimental diets

The enzyme used was a commercial complex (Bioenzyme PH) whose composition is presented in Table II. Fresh pawpaw leaves were harvested from the Teaching and Research Farm at about 6:00 GMT, chopped into smaller pieces, air dried for 14 days, hammer milled and kept in an airtight container before use. The pawpaw leaf meal was analyzed in triplicate for proximate composition using an AOAC method (1990) (Table III). PLM was further analyzed for alkaloids (Harbone, 1973), saponins (Shad et al., 2013), tannins (Van-Burden and Robinson, 1981) and flavonoids (Shad et al., 2013). Phytates and oxalates were determined according to Wheeler and Ferrel (1971), and Day and Underwood (1986), respectively.

Table I

Gross composition of broiler starter diets with/without 5% pawpaw leaf meal, or with (+E) / without (-E) enzyme*

Enzyme	Diet 1	Diet 2	Diet 3	Diet 4
	-E	+E	-E	+E
Pawpaw leaf meal	0.00	0.00	5.00	5.00
Maize (%)	50.00	50.00	50.00	50.00
Groundnut cake (%)	10.50	10.50	10.50	10.50
Soybean meal (42% CP) (%)	25.00	25.00	23.00	23.00
Fish meal (72% CP) (%)	4.00	4.00	4.00	4.00
Palm kernel cake (%)	6.00	6.00	3.00	3.00
Bone meal (%)	3.00	3.00	3.00	3.00
Oyster shell (%)	0.50	0.50	0.50	0.50
Premix** (%)	0.25	0.25	0.25	0.25
Methionine (%)	0.30	0.30	0.30	0.30
Lysine (%)	0.15	0.15	0.15	0.15
Salt (%)	0.30	0.30	0.30	0.30
Chemical composition				
Crude protein (%)	23.92	23.90	23.82	23.83
Crude fiber (%)	3.19	3.21	3.77	3.76
Crude fat (%)	4.20	4.21	4.15	4.14
Calculated composition				
Ca (% DM)	1.56	1.56	1.55	1.55
Available P (% DM)	0.72	0.72	0.71	0.71
ME (kcal/kg)	2,914	2,914	2,920	2,920
Methionine (% DM)	0.57	0.57	0.54	0.54
Lysine (% DM)	1.31	1.31	1.26	1.26

* Enzymes at 0.5 g/kg feed were added after feed manufacturing.

** Per kilogram of diet (mg): vitamin A (as all-trans retinol), 3.6 mg; cholecalciferol, 0.09 mg; vitamin E (as d-α-tocopherol), 44.7 mg; vitamin K3, 2 mg; thiamine, 2 mg; riboflavin, 6 mg; pyridoxine hydrochloride, 5 mg; vitamin B12, 0.2 mg; biotin, 0.1 mg; niacin, 50 mg; D-calcium pantothenate, 12 mg; folic acid, 2 mg; Mn, 80 mg; Fe, 60 mg; Cu, 8 mg; I, 1 mg; Co, 0.3 mg; Mo, 1 mg

Table II

Composition of Bioenzyme PH

Enzyme	Composition/kg	Activity
Cellulase	700,000 UA	Breaks down feed fiber into glucose.
α-amylase	800,000 UA	Converts starch into glucose and maltose.
Phytase	1,200 FTU	Releases phosphorus which is bound as phytate.
Protease	8,000,000 UP	Hydrolyzes proteins.
β-glucanase	300,000 UBG	Breaks down glucans which are polysaccharides.
Lipase	20,000 UI	Breaks down feed oil and fat, and produces energy.
Xylanase	500,000 UX	Converts feed xylan into xylose by hydrolysis.

Source: Biomix, Sabaneta, Colombia

Table III

Proximate and phytochemical composition of pawpaw leaf meal using AOAC 1990's method

Components	Concentration
Crude protein (%)	26.14
Crude fiber (%)	16.05
Ash (%)	1.64
Ether extract (%)	5.40
Nitrogen-free extract (%)	40.95
Alkaloid (g/kg)	28.10
Saponin (g/kg)	16.90
Tannin (g/kg)	0.01
Flavonoid (g/kg)	63.00
Phytate (g/kg)	20.18
Oxalate (g/kg)	6.11

Table IV

Gross composition of broiler finisher diets with/without 5% pawpaw leaf meal, or with (+E) / without (-E) enzyme *

Enzyme	Diet 1	Diet 2	Diet 3	Diet 4
	-E	+E	-E	+E
Pawpaw leaf meal	0.00	0.00	5.00	5.00
Maize (%)	60.00	60.00	60.00	60.00
Groundnut cake (%)	6.50	6.50	7.0	7.0
Soybean meal (42% CP) (%)	20.00	20.00	17.50	17.50
Fish meal (72% CP) (%)	3.00	3.00	3.00	3.00
Palm kernel cake (%)	6.00	6.00	3.00	3.00
Bone meal (%)	3.00	3.00	3.00	3.00
Oyster shell (%)	0.50	0.50	0.50	0.50
Premix** (%)	0.25	0.25	0.25	0.25
Methionine (%)	0.30	0.30	0.30	0.30
Lysine (%)	0.15	0.15	0.15	0.15
Salt (%)	0.30	0.30	0.30	0.30
Chemical composition				
Crude protein (%)	20.04	20.06	20.02	20.01
Crude fiber (%)	2.85	2.84	3.42	3.43
Crude fat (%)	3.51	3.53	3.48	3.49
Calculated composition				
Ca (% DM)	1.48	1.48	1.47	1.47
Available P (% DM)	0.68	0.68	0.67	0.67
ME (kcal/kg)	2,988	2,988	3,000	3,000
Methionine (% DM)	0.51	0.51	0.50	0.50
Lysine (% DM)	1.09	1.09	1.03	1.03

* Enzymes at 0.5 g/kg were added after feed manufacturing.

** Per kilogram of diet (mg): vitamin A (as all-trans retinol), 3.6 mg; cholecalciferol, 0.09 mg; vitamin E (as d- α -tocopherol), 44.7 mg; vitamin K3, 2 mg; thiamine, 2 mg; riboflavin, 6 mg; pyridoxine hydrochloride, 5 mg; vitamin B12, 0.2 mg; biotin, 0.1 mg; niacin, 50 mg; D-calcium pantothenate, 12 mg; folic acid, 2 mg; Mn, 80 mg; Fe, 60 mg; Cu, 8 mg; I, 1 mg; Co, 0.3 mg; Mo, 1 mg

CP: crude protein; DM: dry matter; ME: metabolizable energy

Four isocaloric and isoproteinacious experimental diets were formulated. They were designated as diet 1 or control (0% PLM, 0% E), diet 2 (0% PLM, 0.05% E), diet 3 (5% PLM, 0% E) and diet 4 (5% PLM, 0.05% E) (Table I). Diets 1 and 3 were not enzyme supplemented but had pawpaw leaf meal inclusion at 0% and 5% level, respectively, whereas diets 2 and 4 were enzyme supplemented at the rate of 0.05% but had PLM inclusion at 0% and 5% level, respectively. The calculated composition of experimental diets at starter (1 to 21 days of age) and grower-finisher (22 to 35 days of age) phases are shown in Tables I and IV, respectively, and were formulated to meet the nutritional requirements of broiler chickens.

Performance and apparent digestibility

The birds were weighed individually at the beginning of the trial and weekly. Feed consumption and mortality were recorded daily during the whole experiment. The weekly final weight gain was determined by subtracting the initial weight of birds from the final weight. The feed conversion ratio (FCR) was calculated as the ratio of feed consumed to weight gain, whereas the mortality was calculated as the number of deaths per treatment per day. Five birds were randomly selected from each replicate at 35 days of age, housed individually in a metabolism cage for fecal collection and apparent digestibility determination of dry matter (DM), crude protein (CP), ether extract (EE) and ash based on procedures described by Vogtman et al. (1975). Feed was supplied *ad libitum*; after the first three days of adaptation, feed intake and feces were recorded during four days. Droppings were collected twice daily, thoroughly mixed and weighed. Aliquots from each day samples were frozen at -20°C and bulked at the end of the fourth day. Thereafter, the bulked samples were weighed and dried in a forced air circulation oven at 60°C for 12 hours. The dried droppings were later ground (0.5 mm screen) and analyzed for proximate composition. Apparent digestibility were expressed as (feed intake - fecal) \times 100 / feed intake.

Bird slaughtering, blood collection, carcass and organ evaluation

At 42 days old, three birds from each replicate were randomly selected, tagged, starved overnight, weighed and slaughtered by cutting the jugular veins, allowing blood to flow freely into a bottle containing ethylene diaminetetra acetic acid (EDTA), and a plain bottle for hematology and serum chemistry analysis, respectively. The serum was separated from the blood samples and frozen at -20°C

before analysis. Thereafter, the slaughtered chickens were defeathered after scalding in hot water (55–60°C) for 30 seconds, dressed and eviscerated. The dressed weights were estimated. The internal organs (liver, heart, lung and gizzard) were excised, weighed and expressed as a percentage of the slaughtered weight.

Blood parameter analysis

The packed cell volume, red blood cells, mean cell hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration, mean cell volume, hemoglobin concentration and white blood cells were determined according to Lambs (1981). Total protein, albumin, globulin, cholesterol, high-density lipoprotein, low-density lipoprotein (LDL), bilirubin, and alanine transaminase were determined with Reflectron Plus 8C79 kit (Roche Diagnostic, GombH Mannheim, Germany).

Data analysis

All data on performance, digestibility, blood parameters and carcass evaluation were subjected to analysis of variance from general linear model procedures for complete randomized design with two-enzyme

levels x two PLM levels factorial arrangement of treatments. The data were tested for enzyme, PLM, and interaction of enzyme with PLM. When the treatment effect was significant ($p < 0.05$), means were separated with Duncan's multiple range test using SPSS version 20.

■ RESULTS

Chemical composition of pawpaw leaf meal, performance of broiler chicken and digestibility of nutrients

Pawpaw leaf meal contained high crude protein (26.14%), crude fiber (16.05%) contents and phytochemicals such as alkaloids, saponins, tannins, flavonoids, phytates and oxalates at reasonable levels (Table III). Table V shows that at three weeks old the body weight (BW) gain of broiler chickens in diet 4 was significantly ($p < 0.05$) higher than that in the other diets. At six weeks old, the BW gain of birds fed enzyme supplemented diets (diets 2 and 4) was similar but significantly ($p < 0.05$) higher than that with diets 1 and 3. Enzyme supplementation significantly ($p < 0.05$) improved the BW gain at three and six weeks, whereas PLM inclusion increased it ($p < 0.05$) at six weeks of age. The interaction of enzyme x PLM was not significant ($p > 0.05$) at three and six weeks of age.

Enzyme supplementation (E) numerically improved the feed intake and feed conversion ratio, whereas PLM inclusion numerically improved the feed conversion ratio but decreased the feed intake at both starter and finisher phases. Table VI shows that the apparent

digestibility of DM and CP was improved ($p < 0.05$) in enzyme and/or PLM supplemented diets (diets 2, 3 and 4) compared to control. The ether extract and ash digestibility in birds fed the control diet were similar to those of diet 3 with 5% PLM, but lower than those of diets 2 and 4. E significantly ($p < 0.05$) improved DM, CP, EE and ash digestibility, whereas PLM inclusion significantly ($p < 0.05$) increased DM and CP digestibility. The interaction effect of E and PLM was significant ($p < 0.05$) for DM and CP digestibility (Table VI).

Carcass traits, internal organ weight and blood parameters

Table VII shows the effect of PLM and E on the carcass and relative internal organ weight of broiler chickens. The slaughter weights (SW) of broiler chickens in diets 2 and 4 were similar to those fed diet 3 but higher ($p < 0.05$) than those fed the control diet. The relative liver weight of broiler chickens fed diets 1 and 4 was similar, but it was significantly ($p < 0.05$) high in chickens fed diet 3. E significantly ($p < 0.05$) improved SW, reduced the liver weight and tended to improve ($p = 0.08$) the dressed weight (DW), whereas PLM tended to increase ($p = 0.06$) SW. E was not significant ($p > 0.05$) for the dressed weight percentage (DWP), and kidney, heart, lung and gizzard relative weights, whereas PLM was not significant ($p > 0.05$) for DW, DWP and the relative weights of internal organs (kidney, liver, heart, lung and gizzard). The interaction of E and PLM was not significant ($p > 0.05$) for the carcass and all the relative internal organ weights measured.

Table V
Effect of pawpaw leaf meal and enzyme supplementation on the performance of broiler chickens

Diet	Body weight gain (g)		Feed intake (g)		Feed conversion ratio	
	1-3 weeks	1-6 weeks	1-3 weeks	1-6 weeks	1-3 weeks	1-6 weeks
1	805 ^c	2,583 ^b	1,003	3,113	1.24	1.21
2	832 ^{ab}	2,722 ^a	1,019	3,174	1.23	1.16
3	813 ^{bc}	2,678 ^{ab}	993	3,139	1.22	1.17
4	837 ^a	2,792 ^a	993	3,130	1.19	1.12
SEM	4.97	27.95	7.12	40.40	0.01	0.02
P value	0.03	0.02	0.59	0.97	0.35	0.41
ENZ						
0	809 ^b	2,631 ^b	998	3,126	1.23	1.18
0.05	835 ^a	2,757 ^a	1,006	3,152	1.20	1.14
SEM	4.82	26.87	10.57	66.07	0.02	0.02
P value	0.01	0.01	0.62	0.79	0.24	0.21
PLM						
0	819	2,653 ^b	1,011	3,144	1.24	1.18
50	825	2,735 ^a	993	3,134	1.20	1.15
SEM	4.82	26.87	10.57	66.07	0.02	0.02
P value	0.34	0.05	0.27	0.92	0.19	0.27
ENZ x PLM						
SEM	6.82	38.01	14.95	93.43	0.23	0.74
P value	0.85	0.75	0.59	0.72	0.34	0.84

Diet 1: control; no addition of pawpaw leaf nor enzyme; Diet 2: enzyme supplement of 0.5 g/kg feed, no pawpaw leaf meal; Diet 3: 5% pawpaw leaf meal, no enzyme; Diet 4: 5% pawpaw leaf meal + enzyme supplement

^{a, b, c} Means with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

ENZ: enzyme (g/kg); PLM: pawpaw leaf meal (g/kg); SEM: standard error of means

Table VI

Effect of pawpaw leaf meal and enzyme supplementation on the apparent digestibility (%) of broiler chickens

Diet	DM	CP	CF	EE	ASH
1	79.4 ^b	71.0 ^b	51.7	72.3 ^b	70.0 ^b
2	88.4 ^a	78.5 ^a	55.5	78.0 ^a	76.4 ^a
3	87.7 ^a	76.0 ^a	50.0	70.2 ^b	71.2 ^b
4	88.7 ^a	76.8 ^a	54.8	74.8 ^{ab}	74.8 ^a
SEM	1.38	1.041	1.11	1.09	0.87
P value	0.01	0.03	0.29	0.04	0.01
ENZ					
0	83.2 ^b	75.2 ^b	50.9	71.3 ^b	70.6 ^b
0.05	88.6 ^a	79.8 ^a	55.1	76.4 ^a	75.6 ^a
SEM	1.15	1.13	1.47	1.09	0.61
P value	0.01	0.02	0.07	0.01	0.01
PLM					
0	83.9 ^b	75.2 ^b	53.6	75.2	73.2
50	87.9 ^a	79.8 ^a	52.4	72.5	73.0
SEM	1.15	1.13	1.47	1.09	0.61
P value	0.04	0.02	0.57	0.12	0.83
ENZ × PLM					
SEM	1.63	1.60	2.08	1.54	0.87
P value	0.05	0.04	0.81	0.72	0.14

Diet 1: control; no addition of pawpaw leaf nor enzyme; Diet 2: enzyme supplement of 0.5 g/kg feed, no pawpaw leaf meal; Diet 3: 5% pawpaw leaf meal, no enzyme; Diet 4: 5% pawpaw leaf meal + enzyme supplement

^{a, b} Means with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

ENZ: enzyme (g/kg); PLM: pawpaw leaf meal (g/kg); DM: dry matter (%); CP: crude protein (%); CF: crude fiber (%); EE: ether extract (%); SEM: standard error of means

Table VIII shows the effects of PLM and E on hematological indices of broiler chickens. These effects and their interaction were not significant ($p > 0.05$) for all the hematological parameters except the platelets. The levels of platelets in chickens fed E and/or PLM diets (diets 2, 3 and 4) were higher than those fed the control diet. Platelets significantly ($p < 0.05$) increased with E. Red blood cells tended to increase ($p = 0.09$) with E, and the interaction of E and PLM was significant ($p < 0.05$) for platelets.

The serum metabolites were similar in the experimental diets except for cholesterol and LDL that were significantly ($p < 0.05$) higher in the control diet than in the other diets. E significantly ($p < 0.05$) reduced LDL, whereas PLM significantly ($p < 0.05$) reduced cholesterol and LDL. The E and PLM interaction was significant ($p < 0.05$) for LDL (Table IX).

■ DISCUSSION

Phytogenic feed additives or phytobiotics are used to boost livestock feed properties with the aim of improving performances. There were slight variations in the chemical composition of PLM in this study compared to values obtained by other authors. For instance in our study, the CP value of PLM (26.14%) was lower than that of 27.50% reported by Kadiri et al. (2016). The crude fiber value (16.05%) recorded for PLM was also higher than that of 5.60% reported by

Kadiri et al. (2016). These various reports may arise from the natural variability of plant secondary metabolite and chemical compositions (Nahak, 2014; Valenzuela-Grijalva et al., 2017).

The chemical composition of PLM in this study showed that it could be used as a plant protein source and phytogenic feed additive in monogastric nutrition. The presence of alkaloids and flavonoids in PLM indicates its antimicrobial and antioxidant potentials (Shad et al., 2013). Enzyme supplementation has been explored to improve the performance of broilers (Choct, 2006). In our study, multienzyme supplementation improved the BW gain at three and six weeks. This result agrees with that of Hossain et al. (2016) who reported significant growth of broilers when diets were supplemented with microbial enzymes. The improvement in BW gain due to enzyme supplementation in this study may be ascribed in part to the fact that exogenous enzymes could have helped to break down non-starch polysaccharides, antinutritional factors typified by phytates and oxalates with attendant improvement in the biological value of the diet (Choct, 2006). In addition, E could have changed the intestinal environment – e.g. viscosity of digesta – leading to better contact between nutrients, endogenous enzymes and absorptive mucosa (Bedford, 1995).

In this study, although the multienzyme supplementation was able to improve the BW gain, it could only numerically improve the feed intake and conversion ratio. This numeric increase in feed intake due to enzyme supplementation may originate from the activity of supplemented enzymes that enhances the availability of certain trace minerals (e.g. Cu, Zn, Mn) known to stimulate a greater feed intake in broiler chickens (Larbier and Leclercq, 1994). The increased feed intake may also be the consequence of the faster growth of birds caused by E, which results in higher nutritional requirements (Hossain et al., 2016); chicks increase their feed intake in order to meet their nutritional requirements (Shrivastava et al., 1981). However, the present result disagrees in part with Olukosi et al. (2007) who reported an increase in the body weight gain, feed intake and feed efficiency in broilers fed rye- and wheat-based diets with xylanase supplementation. Variations may result in part from nutrient density reductions in control diets, and varied concentrations and compositions of exogenous enzymes used in these studies.

The influence of phytochemicals on the growth performance of farm animals has been linked to their antibacterial activity, stimulation of digestive fluid secretion and decreased intestinal PH, which result in enhanced nutrient utilization efficiency, reduced gut disorder and improved health (Ayodele et al., 2016). In addition, the enzyme (papain) present in PLM has been involved in enhancement of protein digestion and utilization, and as digestive tract cleanser (Oloruntola et al., 2018). According to Kadiri et al. (2016), papain also plays a crucial role in biological processes because of its ability to break down organic molecules made of amino acids (crucial nutrients for growth). This may explain the reasons behind the numeric increase in BW gain of broiler chicks with the 50 g/kg PLM diet. Furthermore, the nonsignificant interactive effect of E and PLM suggests that these two factors were independent from one another in broiler chicken nutrition: the presence or activity of one factor did not affect that of the other.

Enzymes are added to animal diets to make up some compounds in feed that cannot be broken down by the digestive enzymes. Enzyme supplementation in this study may have improved dry matter digestibility, crude protein, ether extract and ash digestibility. Protease, one of the components of the multienzymes used in this study might have played a major role in increasing crude protein digestibility by augmenting endogenous production of peptidase and thereby improving the digestibility of dietary protein. In addition, proteases may hydrolyze protein-based antinutrients (Ghazi et al., 2002), thus improving amino acid utilization efficiency and reducing protein turnover in

Table VII

Effect of pawpaw leaf meal and enzyme supplementation on the carcass and relative internal organ weight (% SW) of broiler chickens

Diet	SW	DW	DWP	KID	LIV	HRT	LUN	GIZ
1	2,608 ^b	1,282	79.8	0.66	2.53 ^{ab}	0.59	0.66	3.65
2	2,745 ^a	1,374	78.9	0.52	1.92 ^c	0.53	0.63	3.28
3	2,702 ^{ab}	1,366	80.2	0.71	2.76 ^a	0.55	0.66	3.73
4	2,812 ^a	1,383	76.3	0.65	2.00 ^{bc}	0.51	0.64	3.39
SEM	27.55	16.93	0.87	0.04	0.13	0.22	0.03	0.10
P value	0.03	0.11	0.45	0.47	0.03	0.71	0.99	0.39
ENZ								
0	2,655 ^b	1,324	80.0	0.69	2.64 ^a	0.57	0.66	3.69
0.05	2,779 ^a	1,378	77.6	0.58	1.96 ^b	0.52	0.63	3.34
SEM	26.65	19.53	1.24	0.06	0.13	0.03	0.05	0.14
P value	0.01	0.08	0.21	0.26	0.01	0.33	0.73	0.12
PLM								
0	2,677	1,328	79.3	0.59	2.22	0.56	0.65	3.46
50	2,757	1,374	78.3	0.68	2.38	0.53	0.65	0.57
SEM	26.65	19.53	1.24	0.05	0.13	0.03	0.05	0.14
P value	0.06	0.13	0.56	0.33	0.40	0.66	0.99	0.62
ENZ × PLM								
SEM	37.69	27.62	1.76	0.08	0.18	0.05	0.08	0.19
P value	0.73	0.21	0.41	0.65	0.67	0.81	0.97	0.92

Diet 1: control; no addition of pawpaw leaf nor enzyme; Diet 2: enzyme supplement of 0.5 g/kg feed, no pawpaw leaf meal; Diet 3: 5% pawpaw leaf meal, no enzyme; Diet 4: 5% pawpaw leaf meal + enzyme supplement

^{a, b, c} Means with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

SW: slaughtering weight (g/bird); ENZ: enzyme (g/kg); PLM: pawpaw leaf meal (g/kg); DW: dressed weight (g/bird); DWP: dressed weight percentage (% SW); KID: kidney (% SW); LIV: liver (% SW); HRT: heart (% SW); LUN: lung (% SW); GIZ: gizzard (% SW); SEM: standard error of means

Table VIII

Effect of pawpaw leaf meal and enzyme supplementation on hematological indices of broiler chickens

Diet	PCV	HB	RBC	WBC	LYM	MON	GRA	PLAT
1	36.0	8.66	2.84	111.4	85.2	19.0	7.2	5.1 ^c
2	42.6	9.43	2.97	116.9	92.5	16.7	7.7	11.8 ^a
3	41.8	7.43	2.69	119.0	97.6	13.2	8.2	10.5 ^a
4	44.3	8.83	2.90	124.9	100.8	17.2	6.9	7.5 ^b
SEM	1.63	0.38	0.05	2.54	3.94	1.24	1.03	0.83
P value	0.33	0.34	2.34	0.33	0.58	0.46	0.98	0.01
ENZ								
0	38.9	8.04	2.76	115.2	91.4	16.1	7.7	7.8 ^b
0.05	43.5	9.13	2.94	120.9	96.7	16.9	7.3	9.7 ^a
SEM	2.22	0.52	0.06	3.44	5.80	1.78	1.69	0.48
P value	0.19	0.18	0.09	0.27	0.54	0.75	0.87	0.02
PLM								
0	39.3	9.04	2.90	114.1	88.9	17.8	7.4	8.5
50	43.1	8.13	2.79	122.0	99.2	15.2	7.6	9.0
SEM	2.22	0.52	0.06	3.44	5.83	1.78	1.69	0.48
P value	0.26	0.25	0.26	0.15	0.24	0.32	0.96	0.46
ENZ × PLM								
SEM	3.14	0.74	0.09	4.87	8.25	2.51	2.39	0.67
P value	0.53	0.68	0.64	0.96	0.80	0.24	0.73	0.00

Diet 1: control; no addition of pawpaw leaf nor enzyme; Diet 2: enzyme supplement of 0.5 g/kg feed, no pawpaw leaf meal; Diet 3: 5% pawpaw leaf meal, no enzyme; Diet 4: 5% pawpaw leaf meal + enzyme supplement

^{a, b, c} Means with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

ENZ: enzyme (g/kg); PLM: pawpaw leaf meal (g/kg); PCV: packed cell volume (%); HB: hemoglobin (g/L); RBC: red blood cells ($\times 10^{12}/L$); WBC: white blood cells ($\times 10^9/L$); LYM: lymphocytes ($\times 10^9/L$); MON: monocytes ($\times 10^9/L$); GRA: granulocytes ($\times 10^9/L$); PLAT: platelets ($\times 10^9/L$); SEM: standard error of means

Table IX

Effect of pawpaw leaf meal and enzyme supplementation on serum metabolites of broiler chickens

Diet	TPR	ALB	GLO	CHO	HDL	LDL	BIL	ALT
1	4.16	2.89	1.27	4.99 ^a	1.93	2.72 ^a	7.10	16.61
2	4.19	2.98	1.20	3.60 ^{ab}	2.03	1.03 ^b	7.14	16.10
3	4.15	2.94	1.21	2.89 ^b	1.60	1.22 ^b	7.06	16.11
4	4.17	3.57	1.24	2.97 ^b	2.13	1.11 ^b	7.08	16.16
SEM	0.46	0.41	1.17	0.32	0.09	0.23	0.27	0.26
P value	1.00	0.95	0.99	0.04	0.25	0.01	1.00	0.91
ENZ								
0	4.16	2.91	1.27	3.94	1.76	1.97 ^a	7.08	16.36
0.05	4.18	3.27	1.20	3.28	2.08	1.07 ^b	7.11	16.13
SEM	0.77	0.67	1.21	0.33	0.12	0.18	0.44	0.43
P value	0.98	0.71	1.24	0.21	0.11	0.01	0.96	0.71
PLM								
0	4.18	2.93	1.17	4.29 ^a	1.98	1.87 ^a	7.12	16.35
50	4.16	3.25	0.99	2.93 ^b	1.86	1.16 ^b	7.07	16.14
SEM	0.77	0.67	1.24	0.33	0.13	0.19	0.44	0.43
P value	0.99	0.74	1.22	0.02	0.54	0.02	0.94	0.72
ENZ × PLM								
SEM	1.09	0.95	0.28	0.47	0.17	0.26	0.62	0.60
P value	0.99	0.78	0.96	0.16	0.26	0.02	0.98	0.65

Diet 1: control; no addition of pawpaw leaf nor enzyme; Diet 2: enzyme supplement of 0.5 g/kg feed, no pawpaw leaf meal; Diet 3: 5% pawpaw leaf meal, no enzyme; Diet 4: 5% pawpaw leaf meal + enzyme supplement

^{a, b} Means with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

ENZ: enzyme (g/kg); PLM: pawpaw leaf meal (g/kg); TPR: total protein (g/dl); ALB: albumin (g/dl); GLO: globulin (g/dl); CHO: cholesterol (mg/dl); HDL: high-density lipoprotein (mmol/L); LDL: low-density lipoprotein (mmol/L); BIL: bilirubin ($\mu\text{mol/L}$); ALT: alanine amino transferase (U/L); SEM: standard error of means

birds. Phytase improves ileal fat digestibility by reducing endogenous loss and improving dietary nutrient solubility, thereby causing reduction in the undigested fraction (Selle et al., 2010). Supplementary microbial phytase has also been reported to improve bioavailability of dietary phosphorus and other minerals bound to phytates (Um and Palk, 1999). These may be responsible for the increase in ether extract and ash digestibility recorded in this study. The improvement in dry matter and crude protein digestibility due to PLM inclusion in this study may be in part due to the activities of a proteolytic enzyme (papain), an effective natural digestive aid, which aids break down proteins. Worthy of mention is the interaction effect of E and PLM on dry matter and crude protein digestibility in the study; the two factors could synergize one another to achieve optimal digestibility.

The increase in the slaughter weight obtained with E may be due to a better utilization of essential nutrients needed for growth in the birds; the enzymes present in multienzyme supplementation have been reported to enhance nutrient utilization by breaking down materials that interfere with digestion, absorption and utilization of nutrients. In addition, the improvement in the carcass trait due to E which translated to a mere increase in the dressed weight in this study agrees with a report by Ogunsiye et al. (2015) on broiler chickens fed roxazyme G2G supplemented cassava plant meals. Thus, apart from the diet, the carcass yields in broilers are affected by a number of factors, including slaughtering condition, sex, genetics and live weight (Havenstein et al., 2003; Bricket et al., 2007). Comparison of the relative organ weights between treated and untreated groups can be useful to predict the toxic effect of test materials. Liver hypotrophy as a result of enzyme supplementation in this study can be beneficial to health since cases of liver hypertrophy have been linked to increased liver activity through increased digestive enzyme production, when there

are herbal supplementation or antinutrients in the plant-based diet (Abou-Elkhair et al., 2014) as in this study. Therefore, in this study the breakage of antinutrients by exogenous enzymes might have normalized the activities of the liver. However, similar kidney, lung and gizzard weights across diets suggest that E, PLM and their interaction did not affect these organ weights.

Hematological indices are used to determine the health status and nutritional state of animals (Aletor and Egberongbe, 1992). The hematological indices determined in the present study were within the normal range reported by Mirtuka and Rawnsley (1997) and were not significantly affected by E and PLM in most cases. This indicates the nutritional adequacy of these factors. However, there was an increase in most erythrocytic indices in E diet. This suggests possible support of this main factor (enzyme) for adequate or normal hematopoiesis. E might enhance the utilization of minerals and vitamins (such as iron, copper, vitamin B, folic acids, among others) needed for blood formation. Several authors (Um and Palk, 1999; Hossain et al., 2016) have reported on improving the bioavailability of minerals (some of which play a significant role in blood formation) by phytase supplementation. White blood cells are part of the immune system which fights infections. Therefore, the tendency to increase in blood parameters was also related to the increase in digestibility in the present study. The increase in WBC and lymphocytes by enzyme supplementation and PLM inclusion in this study may imply that these factors produced an immunomodulatory effect in the birds, as reported by Oloruntola et al. (2016b).

Platelets, which are produced by the bone marrow, help in blood clotting and wound healing. The significant numerical increase in platelets in broiler chicks fed E and PLM diets, respectively, further

confirmed the health protection effect against excessive blood loss in the birds. In addition, the significant interactive effect of E and PLM shows that combining these factors might promote healing and prevent blood loss. Some phytochemicals such as saponin present in leaf meals have been reported to exert a hypocholesterolemic effect and reduce gut cholesterol uptake through intraluminal physicochemical interaction (Yilkal, 2015). This may be responsible for the decrease in cholesterol in PLM inclusive diets, suggesting that PLM have hypocholesterolemic properties. In addition, the decrease in LDL due to the two main factors (E and PLM) and cholesterol level due to PLM inclusion further support the wholesomeness of the dietary treatment in promoting health in broiler chickens. This result agrees with Oloruntola et al. (2016b), who reported a decrease in serum cholesterol

concentration when including enzyme and Alchornea leaf meal in the diet of broiler chickens.

■ CONCLUSION

Enzyme supplementation (0.5 g/kg) improved the BW gain of broilers. It also improved DM, CP, EE, and ash digestibility, whereas PLM inclusion (50 g/kg) enhanced DM and CP digestibility. E improved SW in broiler chickens. No negative effects of enzymes nor of PLM on the other studied parameters were observed. Enzyme supplementation (0.05%) in broiler chickens improved their performance, whereas enzyme supplementation (0.05%) and PLM inclusion (5%) promoted nutrient digestibility and health benefits.

REFERENCES

- Abou-Elkhair R., Ahmed H.M., Selim S., 2014. Effect of pepper (*Piper nigrum*), tumeric powder (*Curcuma longa*) and coriander seeds (*Coriandrum sativum*) and their combinations as feed additives on growth performance, carcass traits, some blood parameters and humoral immune response of broiler chickens. *Asian Australas. J. Anim. Sci.*, **27** (6): 847-854, doi: 10.5713/ajas.2013.13644
- Aletor V.A., Egberongbe O., 1992. Feeding differently processed soya bean. Part 2: An assessment of haematological responses in chickens. *Nahrung*, **36**: 364-369, doi: 10.1002/food.19920360406
- AOAC, 1990. Official methods of analysis, Vol. 1, 15th Edn. AOAC, Arlington, VA, USA
- Ayodele S.O., Oloruntola O.D., Agbede J.O., 2016. Effect of *Alchornea cordifolia* leaf meal inclusion and enzyme supplementation on performance and digestibility of rabbits. *World Rabbit Sci.*, **24**: 201-206, doi: 10.4995/wrs.2016.3933
- Bedford M.R., 1995. Mechanism of action and potential environmental benefits from the use of feed enzymes. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **53**: 145-155, doi: 10.1016/0377-8401(95)02018-U
- Bedford M., 2000. Removal of antibiotic growth promoters from poultry diets: implications and strategies to minimise subsequent problems. *World Poul. Sci.*, **56** (4): 347-365, doi: 10.1079/WPS20000024
- Brickett K.E., Dahiya J.P., Classen H.L., Gomis S., 2007. Influence of dietary nutrient density, feed form, and lighting on growth and meat yield of broiler chickens. *Poult. Sci.*, **86**: 2172-2181, doi: 10.1093/ps/86.10.2172
- Choct M., 2006. Enzymes for the feed industry, past, present and future. *World Poul. Sci. J.*, **6** (2): 5-15, doi: 10.1079/WPS200480
- Day R.A., Underwood A.L., 1986. Qualitative analysis, 5th Edn. London, Prentice Hall, UK / New Delhi, India, 701 p.
- Falçao-e-Cunha L., Castro-Solla L., Maertens L., Marounek M., Pinheiro V., Freire J.L., Mourao J.L., 2007. Alternatives to antibiotic growth promoters in rabbit feeding: a review. *World Rabbit Sci.*, **15**: 127-140, doi: 10.4995/wrs.2007.597
- García M., Lázaro R., Latorre M.A., Gracia M.I., Mateos G.G., 2008. Influence of enzyme supplementation and heat processing of barley on digestive traits and productive performance of broilers. *Poult. Sci.*, **87**: 940-948, doi: 10.3382/ps.2007-00266
- Ghazi S., Rooke J.A., Galbraith H., Bedford M.R., 2002. The potential for the improvement of the nutritive value of soya-bean meal by different proteases in broiler chicks and broiler cockerels. *Br. Poult. Sci.*, **43**: 70-77, doi: 10.1080/00071660120109935
- Harborne J.B., 1973. Phytochemical methods. Chapman and Hall, London, UK, 49-188
- Havenstein G.B., Ferket P.R., Qureshi M.A., 2003. Carcass composition and yield of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poult. Sci.*, **82**: 1509-1518, doi: 10.1093/ps/82.10.1509
- Hossain M.A., Iji P.A., Islam A.M.F., 2016. Gross responses and apparent digestibility of amino acid and mineral in broiler chickens fed vegetable-based starter diets supplemented with microbial enzymes. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.*, **40**: 1-7, doi: 10.3906/vet-1504-65
- Kadiri O., Olawoye B., Fawale O.S., Adalumo O.A., 2016. Nutraceutical and antioxidant properties of the seeds, leaves and fruits of *Carica papaya*: Potential relevance to human diet, the food industry and the pharmaceutical industry. A review. *Turkish J. Agric. Food Sci. Tech.* **4** (12): 1039-1052, doi: 10.24925/turjaf.v4i12.1039-1052.569
- Kahkonen M.P., Hopia A.I., Heinonen M., 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, **49**: 4076-4082, doi: 10.1021/jf010152t
- Lamb G.N., 1981. Manual of veterinary laboratory technique. CIBA-GEIGY, Nairobi, Kenya, 96-97 p.
- Larbier M.L., Wiseman J., Leclercq B., 1994. Nutrition and feeding of poultry. Nottingham University Press, Loughborough, UK, 101-118
- Lázaro R., García M., Aranibar M.J., Mateos G.G., 2003. Effect of enzyme addition to wheat, barley and rye-based diets on nutrient digestibility and performance of laying hens. *Br. Poult. Sci.*, **44**: 256-265, doi: 10.1080/0007166031000085616
- Mateos G.G., Rebollar P.G., de Blass C., 2010. Minerals, vitamins and additives. In: Nutrition of the rabbit (Eds. de Blass C., Wise J.). CAB-I, Wallingford, UK, 151-162, doi: 10.1079/9781845936693.0119
- Mirtuka B.M., Rawnsley H.N., 1977. Clinical biochemical and haematological references values in normal experimental animals. Masson, New York, USA, 270 p.
- Nahak G., Suar M., Sahu R.K., 2014. Antioxidant potential and nutritional values of vegetables: A Review. *Res. J. Med. Plant.*, **8** (2): 50-81
- Ogunsipe M.H., Adejumo J.O., Agbede J.O., Asaniyan E.K., 2015. Effect of roxazyme G2G supplementation on cassava plant meal fed to broiler chickens. *Livest. Res. Rural Dev.*, **27** (12), www.lrrd.org/lrrd27/12/ogun27240.htm
- Oloruntola O.D., Agbede J.O., Onibi G.E., Igbasan F.A., 2016a. Replacement value of rumen liquor fermented cassava peels for maize in growing rabbit. *Arch. Zootec.*, **65** (249): 89-97
- Oloruntola O.D., Ayodele S.O., Adeyeye S.A., Ogunsipe M.H., Daramola O.T., Ayedun E.S., 2018. Effect of pawpaw leaf meal and multi-enzyme supplementation in the diet on performance, digestibility, and oxidative enzyme status of rabbits. *J. Basic Appl. Zool.*, **79**: 26, doi: 10.1186/s41936-018-0039-1
- Oloruntola O.D., Ayodele S.O., Agbede J.O., Oloruntola D.A., 2016b. Effect of feeding broiler chickens with diets containing *Alchornea cordifolia* leaf meal and enzyme supplementation. *Arch. Zootec.*, **65** (252): 489-498
- Olukosi O.A., Bedford M.R., Adeola O., 2007. Xylanase in diets for growing swine and broiler chicks. *Can. J. Ani. Sci.*, **87**: 227-235, doi: 10.4141/CJAS06005

- Selle P.H., Ravindran V., Cowieson A.J., Bedford M.R., 2010. Phytate and phytase. In: *Enzymes in farm animal nutrition* (Eds. Michael R.B., Gary G.P.). CABI, Wallingford, UK, 160-205, doi: 10.1079/9781845936747.0054
- Shad M.A., Nawaz H., Rehman T., Ikram M., 2013. Determination of biochemical, phytochemicals and antioxidative properties of different part of *Cichorium intybus* L.: A comparative study. *J. Anim. Plant Sci.*, **23** (4): 1060-1066
- Shrivastava H.P., Sadagopan V.R., Johri T.S., Chand S., 1981. Sunflower seed meal for poultry-a review. *Indian Poultry Gazette*, **65**: 100-112
- Um J.S., Palk I.K., 1999. Effect of microbial phytase supplementation on egg production, egg shell quality and mineral retention of laying hens fed different levels of phosphorus. *Poult. Sci.*, **78**: 75-79, doi: 10.1093/ps/78.1.75
- Valenzuela-Grijalva N.V., Pinelli-Saavedra A., Muhlia-Almazan A., Dominguez-Diaz D., Gonzalez-Rios H., 2017. Dietary inclusion effects of phytochemicals as growth promoters in animal production. *J. Anim. Sci. Technol.*, **58**: 8, doi: 10.1186/s40781-017-0133-9
- Van-Burden T.P., Robinson W.C., 1981. Formation of complexes between protein and tannin acid. *J. Agric. Food Chem.*, **1**: 77
- Vogtman H., Pfirter P., Prabuck A.L., 1975. A new method of determining metabolisability energy and digestibility of fatty acids in broiler diets. *Br. Poult. Sci.*, **16**: 531-534, doi: 10.1080/00071667508416222
- Wheeler E.L., Ferrel R.E., 1971. A method for phytic acid determination in wheat and wheat fractions. *Cereal Chem.*, **48**: 312-316
- Yilkal T., 2015. Important anti-nutritional substances and inherent toxicants of feeds. *Food Sci. Quality Manag.*, **36**: 40-47

Résumé

Oloruntola O.D., Ayodele S.O., Oloruntola D.A. Effet de la farine de feuilles de papaye (*Carica papaya*) et des enzymes alimentaires sur les performances, la digestibilité, la composition de la carcasse et du sang chez le poulet de chair

Des enzymes exogènes et des additifs alimentaires phyto-gènes sont proposés en alternative aux antibiotiques utilisés comme promoteurs de croissance dans la production de volaille. Cette étude a évalué l'effet de l'incorporation de farine de feuilles de papaye (FFP) et de la supplémentation en enzymes (E) dans le régime alimentaire des poulets de chair. Au total, 288 poulets de chair Arbor Acre d'un jour ont été utilisés. Quatre régimes alimentaires ont été formulés pour être isocaloriques et isoprotéiques : régime 1, témoin (0 % FFP, 0 % E), régime 2 (0 % FFP, 0,05 % E), régime 3 (5 % FFP, 0 % E) et régime 4 (5 % FFP, 0,05 % E). Chaque régime a été répliqué six fois avec 12 poulets dans chaque lot. E a amélioré ($p < 0,05$) le gain de poids à trois semaines. La digestibilité de la matière sèche (MS), des protéines brutes (PB), des matières grasses et des cendres a été améliorée ($p < 0,05$) avec E, alors que l'incorporation de FFP a augmenté ($p < 0,05$) la digestibilité de la MS et des PB. L'interaction E x FFP a été significative ($p < 0,05$) pour la digestibilité de la MS et des PB. E a amélioré ($p < 0,05$) le poids à l'abattage et a diminué le poids du foie. Les plaquettes sanguines ont varié selon les régimes et ont augmenté ($p < 0,05$) avec E. E a réduit ($p < 0,05$) les lipoprotéines de basse densité (LDL), alors que FFP a réduit ($p < 0,05$) le cholestérol et les LDL. En conclusion, l'association de E et de FFP a amélioré la croissance des poulets, et la supplémentation en enzymes ou en FFP serait bénéfique pour la santé des poulets.

Mots-clés : poulet de chair, alimentation des animaux, papaye, enzyme, performance animale, Nigeria

Resumen

Oloruntola O.D., Ayodele S.O., Oloruntola D.A. Efecto de la harina de hoja de papaya (*Carica papaya*) y de las enzimas exógenas en la dieta sobre el rendimiento de los pollos de engorde, la digestibilidad y la composición de la carcasa y de la sangre

Se proponen enzimas exógenas y aditivos fitogénicos para alimentos como alternativas a los antibióticos promotores de crecimiento en la producción avícola. Este estudio evaluó el efecto de la inclusión de la harina de hoja de papaya (HHP) y la suplementación con enzimas (E) en la dieta de pollos de engorde. En total se utilizaron 288 pollos de engorde de Arbor-Acre de un día de edad. Se formularon cuatro dietas para ser isocalóricas e isonitrógenas: dieta 1, control (0% HHP, 0% E), dieta 2 (0% HHP, 0,05% E), dieta 3 (5% HHP, 0% E) y dieta 4 (5% HHP, 0,05% E). Cada dieta se repitió seis veces con 12 pollos en cada lote. A las tres semanas E mejoró ($p < 0,05$) el aumento de peso corporal. La digestibilidad de la materia seca (MS), proteína cruda (PC), extracto de éter y ceniza ha sido mejorada ($p < 0,05$) con E, mientras que la inclusión de HHP produjo ($p < 0,05$) un aumento en la digestibilidad de la MS y la PC. El efecto E x HHP fue significativo ($p < 0,05$) para la digestibilidad de la MS y la PC. El peso de sacrificio mejoró con E ($p < 0,05$) y redujo el peso del hígado. Las plaquetas variaron con las dietas y aumentaron ($p < 0,05$) con la suplementación con enzimas. E redujo ($p < 0,05$) las lipoproteínas de baja densidad (LDL), mientras que HHP redujo ($p < 0,05$) el colesterol y LDL. En conclusión, la asociación de E y HHP mejoró el crecimiento del pollo, y la inclusión de E o HHP debería beneficiar la salud del pollo.

Palabras clave: pollo de engorde, alimentación de los animales, papayas, enzimas, desempeño animal, Nigeria

Population dynamics of ticks infesting sheep in the arid steppes of Tunisia

Khawla Elati^{1*} Ayet Allah Ayadi¹ Médiha Khamassi Khbou²
Mohamed Jdidi¹ Mourad Rekik³ Mohamed Gharbi¹

Keywords

Sheep, Metastigmata, *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*, *Hyalomma excavatum*, population dynamics, Tunisia

Submitted: 1 April 2017
Accepted: 29 August 2018
Published: 29 October 2018
DOI: 10.19182/remvt.31641

Summary

This study aimed to determine tick population dynamics infesting sheep in Gafsa region (Central Tunisia). Ticks were collected monthly over a year, from October 2013 to September 2014, from 57–64 randomly-included Barbarine-breed sheep. In total, 560 ticks were collected and identified. They belonged to two species: *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (98.6%) and *Hyalomma excavatum* (1.4%). Sheep were only infested from April to October with a maximum infestation prevalence (number of infested animals / number of examined animals) in August for *R. sanguineus* s.l. (83%), and in May for *H. excavatum* (7%). The highest infestation intensity (number of ticks / number of infested sheep) was 3.7 ticks per animal in August. These results should help sheep owners and veterinarians to implement efficient control programs against ticks and the pathogens they transmit.

■ How to quote this article: Elati K., Ayadi A.A., Khamassi Khbou M., Jdidi M., Rekik M., Gharbi M., 2018. Population dynamics of ticks infesting sheep in the arid steppes of Tunisia. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 71 (3): 131-135, doi: 10.19182/remvt.31641

■ INTRODUCTION

Agriculture and most particularly extensive livestock production are vital for the livelihood of small landholders on the Southern Mediterranean shore. Sheep breeding is a major breeding activity in Tunisia. Its development is threatened by numerous constraints such as diseases, in particular tick-borne diseases. Ticks can cause hypersensitivity, inflammation and anemia impairing animal productivity. They also transmit several pathogens (parasites, bacteria and viruses), that can result in a high cost from loss of infected animals (Gharbi and Darghouth, 2014). In Tunisia, several of these ticks transmit pathogens to sheep with various prevalence and veterinary importance: *Theileria ovis* (Rjeibi et al., 2014), *Theileria lestoquardi*

(Rjeibi et al., 2016b), *Babesia ovis* (Rjeibi et al., 2014) and *Anaplasma ovis* (Ben Said et al., 2015).

Climate change is an important emerging risk factor affecting agriculture, human and livestock health (Keleman Saxena et al., 2016). This is particularly true in North Africa considered as a “hot spot for climate change” (Giorgi, 2006). Increases in temperature cause heat stress in livestock species, hence provoking reductions in growth rate, milk yield and reproductive performance (Das et al., 2016). Furthermore, these changes affect the spread and abundance of several vector arthropods such as ticks, mosquitoes and flies, leading to a modified transmission of several pathogens (Elbers et al., 2015). The proliferation of vector ticks caused by the temperature increase promotes the emergence of various diseases such as Crimean-Congo hemorrhagic fever (Leblebicioglu et al., 2015). More precisely, increases in temperature might on one hand provide a suitable environment for the spread of thermophilic tick species such as *Hyalomma marginatum* and *Rhipicephalus annulatus* (Domşa et al., 2016), and, on the other hand, result in the population decrease of species which prefer more temperate conditions, e.g. *Ixodes ricinus*.

Under such epidemiological and changing climate conditions, the study of tick infestation dynamics in sheep is crucial. The implementation of any tick control and, subsequently, tick-borne pathogen control programs cannot succeed if no specific data are available regarding the seasonal prevalence and local phenology of the tick species concerned. This study reports, for the first time to our knowledge, tick infestation dynamics in sheep in arid Tunisian steppes.

1. Laboratoire de parasitologie, Univ. Manouba, Institution de la recherche et de l'enseignement supérieur agricoles, Ecole nationale de médecine vétérinaire de Sidi Thabet, 2020 Sidi Thabet, Tunisie.

2. Laboratoire de maladies contagieuses-zoonoses, législation sanitaire, Univ. Manouba, Institution de la recherche et de l'enseignement supérieur agricoles, Ecole nationale de médecine vétérinaire de Sidi Thabet, 2020 Sidi Thabet, Tunisie.

3. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), Amman 11195, Jordan.

* Corresponding author

Tel.: +216 71 552 200; Fax: +216 71 552 441; Email: elati.khawla@gmail.com



<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

■ MATERIALS AND METHODS

The current survey was carried out in Sned locality, Gafsa District (34° 25' N, 8° 47' E; mean altitude 313 meters) (Figure 1). The locality is typical of the arid steppes of Central Tunisia with a maximum annual rainfall of 200 millimeters. In this region, the dry period extends from April to September and temperatures can reach a maximum of 49°C in summer. The mean minimum temperature is recorded in January and February (0°C).

Each month, a sample of 57–64 sheep, randomly chosen within a flock comprising 400 animals, were included in the survey. Selected animals were classified as young (less than one year old) or adult (over a year old). The sheep grazed during the day on natural pastures and were kept under a semi-intensive breeding system. Ewes were supplemented before mating, at the end of pregnancy and during early suckling. Males were kept in barns during the low grazing period. Animals were treated against ectoparasites with a diazinon formulation at 2.5% once a year (in May).

The sheep were monitored for one year, from October 2013 to September 2014. All surveyed sheep were thoroughly examined and ticks were collected in labeled flasks containing 70% ethanol and 10% glycerine. They were then identified according to Walker et al. (2003). Because of morphological similarities between *Rhipicephalus sanguineus* and *R. turanicus*, these two species were pooled in the *R. sanguineus sensu lato* (s.l.) group (Nava et al., 2015; Hekimoğlu et al., 2016). Results were expressed using two parasitological indicators (Margolis et al., 1982):

Infestation prevalence (%) = 100 × (num. of infested sheep / num. of examined sheep)

Tick infestation intensity = num. of ticks / num. of infested sheep

To compare infestation prevalence between age groups, gender and months, chi-square tests were performed with Epi-Info software (Dean et al., 2011). Comparison of tick infestation means were carried out with Student t test. Results were considered significant at 5% threshold.

■ RESULTS

No tick infestation was observed between November and March, whereas the infestation prevalence was maximal in August (83%). The overall maximum infestation intensity (3.7) was also observed in August (Table I).

Except in July, the infestation prevalence of female sheep was significantly higher than that of males (p = 0.05). There was no significant difference between the infestation prevalence according to age group, although a higher infestation prevalence was observed in young sheep in April, August and September, and in adults in May, June, July and October (p = 0.6). No significant differences were observed between infestation intensities from April to September according to the age group (p = 0.16).

Two tick species were collected: *R. sanguineus* s.l. (n = 552; 98.6%) and *Hyalomma excavatum* (n = 8; 1.4%). *Rhipicephalus* ticks were all attached to the ears, whereas *Hyalomma* ticks were mainly collected from the sternum (6/8). The activity peak of *R. sanguineus* s.l. was in August (83%). The few *H. excavatum* were collected only in May (7%), June and September (Table I). There were more female (56.7%; n = 313) than male *R. sanguineus* s.l. (43.3%; n = 239) (p < 0.001) (sex ratio M:F = 0.76). The same trend was observed for *H. excavatum* ticks (three male and five female ticks).

■ DISCUSSION

Two species were identified in the study: *R. sanguineus* s.l. and *H. excavatum*. In a similar survey, Rjeibi et al. (2015) showed the presence of five tick species in five districts of Tunisia (Jendouba, Ariana, Kairouan, Kebili and Tataouine) in different bioclimatic zones (humid, semiarid, arid and Saharan) (Figure 1): *R. turanicus* (45%), *H. excavatum* (41.8%) and *R. sanguineus* (4.6%) were present in all studied areas; *H. dromedarii* (7.8%) was collected in Tataouine District, and *R. camicasi* (0.7%) in Kebili District. Another survey carried out by Rjeibi et al. (2016b) in Kebili District, close to the location of the present study, revealed that *H. excavatum* was the most frequent tick in sheep, followed by *Rhipicephalus* spp. The variability among tick populations parasitizing sheep in different Tunisian areas may be related to both abiotic and biotic factors, i.e. the management systems, nature of pastures, cohabitation with other tick-host species (such as dromedaries in the South), and to the introduction of infested animals from other Tunisian regions and neighboring countries (Libya and Algeria). Climate conditions vary a lot from North (humid and subhumid) to South Tunisia (arid and Saharan). Several works show that some tick species are not adapted to the arid climate, e.g. *Ixodes* ticks; climate change could therefore lead to their disappearance and the appearance of other tick species (Estrada-Peña et al., 2013; Domşa, et al., 2016).

H. excavatum may be a two- or three-host tick. It is mainly present in Central and Southern Tunisia (Bouattour et al., 1999; Rjeibi et al., 2015; Rjeibi et al., 2016a) and transmits *Theileria lestoquardi* that has been reported in Kebili District (Rjeibi et al., 2016b). *R. sanguineus* s.l. is a three-host summer tick (Bouattour et al., 1999). *R. turanicus* is the most common sheep tick (Walker et al., 2003; Estrada-Peña et al., 2004). However, as in the present study, *R. sanguineus* has been reported as the most frequent tick species in sheep in North Central Spain (Estrada-Peña et al., 2004). On the other hand, Bouhous et al. (2011) mainly collected *Hyalomma impeltatum* (75.2%) from sheep in Algeria, to a lesser extent *R. sanguineus* (19.4%), and a few specimens of *H. marginatum*, *H. dromedarii*, *H. scupense*, *R. guilhoni* and *R. evertsi*.

In the present study, the maximum infestation prevalence was recorded in August: any control program should thus be applied

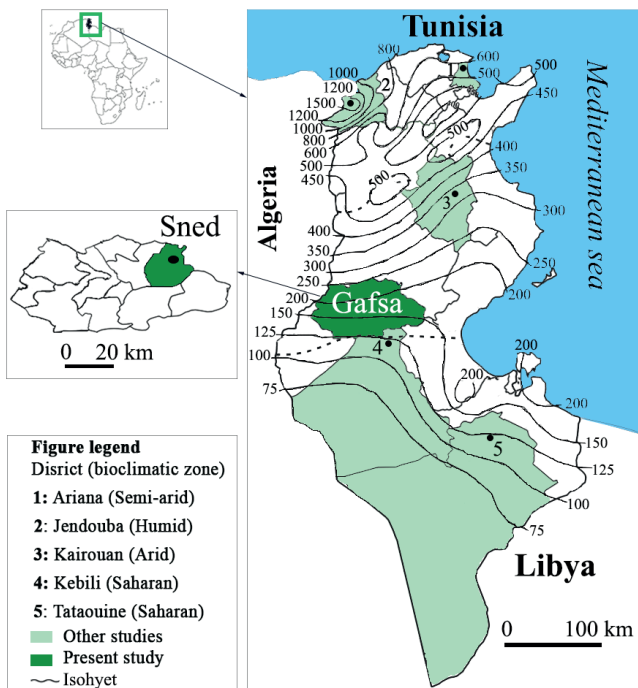


Figure 1 : Geographical localization of Sned locality, Gafsa District (studied area) and other regions where previous studies on ticks were carried out.

Table 1
 Monthly infestation indicators of sheep according to age and gender
 and monthly population dynamics of ticks according to their species in Tunisia

Indicators		Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.
Num. infested sheep / num. examined sheep (prevalence % and precision)	Male	0/26	0/26	0/26	0/26	0/26	0/26	0/6	0/3	5/10 (50 ± 31)	3/4 (75 ± 42)	1/6 (17 ± 30)	1/6 (17 ± 30)
	Female	3/38 (8 ± 9)	0/38	0/38	0/38	0/38	0/38	13/55 (24 ± 11)	27/58 (47 ± 13)	36/51 (71 ± 13)	36/55 (65 ± 13)	47/52 (90 ± 8)	37/51 (73 ± 12)
	Young	0/38	0/38	0/38	0/38	0/38	0/38	6/23 (26 ± 18)	12/29 (41 ± 18)	18/32 (56 ± 17)	12/23 (52 ± 20)	21/23 (91 ± 12)	17/23 (74 ± 18)
	Adult	3/26 (12 ± 12)	0/26	0/26	0/26	0/26	0/26	7/38 (18 ± 12)	15/32 (47 ± 17)	23/29 (79 ± 15)	27/36 (75 ± 14)	27/35 (77 ± 14)	21/34 (62 ± 16)
	Overall	3/64 (5 ± 5)	0/64	0/64	0/64	0/64	0/64	13/61 (21 ± 10)	27/61 (44 ± 12)	41/61 (67 ± 12)	39/59 (66 ± 12)	48/58 (83 ± 10)	38/57 (67 ± 12)
Infestation intensity (num. ticks / num. infested sheep)	Male	0	0	0	0	0	0	0	0	4 (20/5)	4 (12/3)	1 (1/1)	1 (1/1)
	Female	1.3 (4/3)	0	0	0	0	0	1.5 (19/13)	1.7 (45/27)	2.6 (93/36)	2.5 (90/36)	3.8 (178/47)	2.6 (97/37)
	Young	0	0	0	0	0	0	1.7 (10/6)	1.6 (19/12)	2.7 (48/18)	2.5 (30/12)	3.2 (68/21)	2.2 (37/17)
	Adult	1.3 (4/3)	0	0	0	0	0	1.3 (9/7)	1.7 (26/15)	2.8 (65/23)	2.7 (72/27)	4.1 (111/27)	2.9 (61/21)
	Overall	1.3 (4/3)	0	0	0	0	0	1.5 (19/13)	1.7 (45/27)	2.8 (113/41)	2.6 (102/39)	3.7 (179/48)	2.6 (98/38)
Total tick number	<i>R. s.</i>	4	0	0	0	0	0	19	39	112	102	179	97
	<i>H. e.</i>	0	0	0	0	0	0	0	6	1	0	0	1
Tick infestation prevalence = 100 x (num. sheep infested by tick sp. / num. examined sheep)	<i>R. s.</i>	3/64 (5 ± 5)	0	0	0	0	0	13/61 (21 ± 5)	27/61 (44 ± 12)	41/61 (67 ± 12)	39/59 (66 ± 12)	48/58 (83 ± 10)	38/57 (67 ± 12)
	<i>H. e.</i>	0	0	0	0	0	0	0	4/61 (7 ± 6)	1/61 (2 ± 3)	0	0	1/57 (2 ± 3)

R. s.: *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*; *H. e.*: *Hyalomma excavatum*

during this period. The tick infestation started in April and no infestation was observed during the cold months (from November to March) since the ticks were not active. Infestation onset is associated with the increase in temperature and photoperiod that promote the development and activity of ticks (Dantas-Torres and Otranto, 2013). Global warming projections for the study area show that infestations in the future may start much earlier in spring and/or late winter, which would extend the tick activity period.

There was no significant difference between the infestation prevalence in adult and young sheep, both groups being alternately most infested, which could be due to the monthly fluctuation of the examined sample. This aleatory difference was unexpected because lambs are at first monogastric and do not graze, and thus release lower quantities of attractive gases for ticks (Bouattour et al., 1996). They should thus be less infested than adults. Rjeibi et al. (2016b) also observed no difference in the infestation prevalence between different age groups, which could be because, in North Tunisia where pastures are very rich, young sheep graze with adults. In Gafsa District, where our study was carried out, the management system was

different: young sheep grazed near the farms with adults for a short period and were kept mostly inside.

Although the number of examined males was often, by far, lower than that of females, the results revealed that adult female sheep (except in July) were more at risk than males, which were only infested between June and September. The difference may be due to the fact that males were often kept in the farm and had fewer grazing periods than females, as they were used for mating or fattening. Moreover, females expressed immunodepression during pregnancy and lactation (Rehman et al., 2017).

The number of female ticks was higher than that of male for both *R. sanguineus* s.l. and *H. excavatum*, but it was not significant for the latter. Usually, the number of male ticks is higher because they spend a longer period attached to the animals, whereas female ticks engorge in more or less one week. This unusual observation could not be elucidated.

The identification of attachment sites increases the efficiency of tick control, whether it is by tick removal or acaricide application (Gharbi et al., 2013; Gharbi and Darghouth, 2014). A common attachment site

for *Rhipicephalus* ticks was near the ear tag, which is consistent with the fact that questing *Rhipicephalus* ticks attach when sheep are head-down grazing. On the other hand, *H. excavatum* was mainly collected from the sternum. In Iran, Loui Monfared et al. (2015) showed that 42% of sheep ticks (comprising 42.2% of *R. bursa* and 17.3% of *R. sanguineus*) were present on the head, 30% on the tail and in anal region, 18% on the udder, 8% on the groin, and 2% elsewhere. In Iraq, 85% of ticks (mainly *R. bursa*) were observed on the ears, 9.8% on the udder and 5.1% on the hind legs and around the eyes (Omer et al., 2007). The preferential attachment sites are thus humid, warm, not accessible to grooming and with richly vascularized thin skin. However, these sites vary according to the species present in the area: farmers have thus to adapt their tick control practices.

CONCLUSION

Further studies are needed to determine the direct effect of ticks on sheep health and the pathogens they transmit to them. Studying tick species, their preferential hosts and phenology enables veterinary services to make recommendations to farmers that help them choose the suitable control period, thus reducing expenses for acaricides. In light of our results, we recommend the use of acaricides on the heads of sheep between April and October to eradicate the majority of tick populations.

Acknowledgments

This study was funded by the 'Laboratoire d'épidémiologie des infections enzootiques des herbivores en Tunisie : application à la lutte' (ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche scientifique, Tunisie). The authors thank Messrs. Bechir Guesmi, Mokhtar Dhibi and Taoufik Lahmar for their support, and the sheep farmer who agreed to let them handle his animals.

REFERENCES

- Ben Said M., Belkahia H., Alberti A., Zobba R., Bousrih M., Yahiaoui M., Daaloul-Jedidi M., et al., 2015. Molecular survey of *Anaplasma* species in small ruminants reveals the presence of novel strains closely related to *A. phagocytophilum* in Tunisia. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, **15** (10): 580-590, doi: 10.1089/vbz.2015.1796
- Bouattour A., Darghouth M.A., Ben Miled L., 1996. Cattle infestation by *Hyalomma* ticks and prevalence of *Theileria* in *H. detritum* species in Tunisia. *Vet. Parasitol.*, **65** (3-4): 233-245, doi: 10.1016/S0304-4017(96)00951-X
- Bouattour A., Darghouth M.A., Daoud A., 1999. Distribution and ecology of ticks (Acari: Ixodidae) infesting livestock in Tunisia: an overview of eight years field collections. *Parassitologia*, **41** (suppl. 1): 5-10
- Bouhous A., Aissi M., Harhoura K., 2011. Prevalence of Ixodidae in sheep brought for slaughter in Adrar municipal abattoir, Southwest Algeria. *Sci. Parasitol.*, **12** (4): 197-201
- Dantas-Torres F., Otranto D., 2013. Species diversity and abundance of ticks in three habitats in Southern Italy. *Ticks Tick Borne Dis.*, **4** (3): 251-255, doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.11.004
- Das R., Sailo L., Verma N., Bharti P., Saikia J., Imtiwati, Kumar R., 2016. Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. *Vet. World*, **9** (3): 260-268, doi: 10.14202/vetworld.2016.260-268
- Dean A.G., Arner T.G., Sunki G.G., Friedman R., Lantinga M., Sangam S., Zubieta J.C., et al., 2011. Epi Info, a database and statistics program for public health professionals. CDC, Atlanta, GA, USA
- Domşa C., Sándor A.D., Mihalca A.D., 2016. Climate change and species distribution: possible scenarios for thermophilic ticks in Romania. *Geospat. Health*, **11** (2), 421, doi: 10.4081/gh.2016.421
- Elbers A.R.W., Koenraadt C.J.M., Meiswinkel R., 2015. Mosquitoes and *Culicoides* biting midges: vector range and the influence of climate change. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.*, **34** (1): 123-137
- Estrada-Peña A., Farkas R., Jaenson T.G.T., Koenen F., Madder M., Pascucci I., Salman M., et al., 2013. Association of environmental traits with the geographic ranges of ticks (Acari: Ixodidae) of medical and veterinary importance in the western Palearctic. A digital data set. *Exp. Appl. Acarol.* **59** (3): 351-366, doi: 10.1007/s10493-012-9600-7
- Estrada-Peña A., Quíez J., Sánchez Acedo C., 2004. Species composition, distribution, and ecological preferences of the ticks of grazing sheep in north-central Spain. *Med. Vet. Entomol.*, **18** (2): 123-133, doi: 10.1111/j.0269-283X.2004.00486.x
- Gharbi M., Darghouth M.A., 2014. A review of *Hyalomma scupense* (Acari, Ixodidae) in the Maghreb region: from biology to control. *Parasite*, **21**, 2, doi: 10.1051/parasite/2014002
- Gharbi M., Hayouni M.E., Sassi L., Dridi W., Darghouth M.A., 2013. *Hyalomma scupense* (Acari, Ixodidae) in northeast Tunisia: seasonal population dynamics of nymphs and adults on field cattle. *Parasite*, **20**, 12, doi: 10.1051/parasite/2013012
- Giorgi F., 2006. Climate change hot-spots. *Geophys. Res. Lett.*, **33** (8), L08707, doi: 10.1029/2006GL025734
- Hekimoğlu O., Sağlam İ.K., Özer N., Estrada-Peña A., 2016. New molecular data shed light on the global phylogeny and species limits of the *Rhipicephalus sanguineus* complex. *Ticks Tick Borne Dis.*, **7** (5): 798-807, doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.03.014
- Keleman Saxena A., Cadima Fuentes X., Gonzales Herbas R., Humphries D.L., 2016. Indigenous food systems and climate change: Impacts of climatic shifts on the production and processing of native and traditional crops in the Bolivian Andes. *Front. Publ. Health*, **4**, 20, doi: 10.3389/fpubh.2016.00020
- Leblebicioglu H., Ozaras R., Erciyas-Yavuz K., 2015. Emergence of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **109** (11): 676-678, doi: 10.1093/trstmh/trv083
- Loui Monfared A., Mahmoodi M., Fattahi R., 2015. Prevalence of ixodid ticks on cattle, sheep and goats in Ilam province, Iran. *J. Parasit. Dis.*, **39** (1): 37-40, doi: 10.1007/s12639-013-0267-8
- Margolis L., Esch G.W., Holmes J.C., Kuris A.M., Schad G.A., 1982. The use of ecological terms in parasitology (Report of an ad hoc committee of the American society of parasitologists). *J. Parasitol.*, **68** (1): 131-133, doi: 10.2307/3281335
- Nava S., Estrada-Peña A., Petney T., Beati L., Labruna M.B., Szabó M.P.J., Venzal J.M., et al., 2015. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). *Vet. Parasitol.*, **208** (1-2): 2-8, doi: 10.1016/j.vetpar.2014.12.021
- Omer L.T., Kadir M.A.A., Seitzer U., Ahmed J.S., 2007. A survey of ticks (Acari: Ixodidae) on cattle, sheep and goats in the Dohuk governorate, Iraq. *Parasitol. Res.*, **101** (suppl. 2): 179-181
- Rehman A., Nijhof A.M., Sauter-Louis C., Schauer B., Staubach C., Conraths F.J., 2017. Distribution of ticks infesting ruminants and risk factors associated with high tick prevalence in livestock farms in the semi-arid and arid agro-ecological zones of Pakistan. *Parasit. Vectors*, **10**, 190, doi: 10.1186/s13071-017-2138-0
- Rjeibi M.R., Darghouth M.A., Gharbi M., 2016a. Prevalence of *Theileria* and *Babesia* species in Tunisian sheep. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **83** (1):1-6, doi: 10.4102/ojvr.v83i1.1040
- Rjeibi M.R., Gharbi M., Mhadhbi M., Mabrouk W., Ayari B., Nasfi I., Jedidi M., et al., 2014. Prevalence of piroplasms in small ruminants in North-West Tunisia and the first genetic characterisation of *Babesia ovis* in Africa. *Parasite*, **21**, 23, doi: 10.1051/parasite/2014025
- Rjeibi M.R., Darghouth M.A., Omri H., Souidi K., Rekik M., Gharbi M., 2015. First molecular isolation of *Mycoplasma ovis* from small ruminants in North Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **82** (1), 912, doi: 10.4102/ojvr.v82i1.912
- Rjeibi M.R., Darghouth M.A., Rekik M., Amor B., Sassi L., Gharbi M., 2016b. First molecular identification and genetic characterization of *Theileria lestoquardi* in sheep of the Maghreb region. *Transbound. Emerg. Dis.*, **63** (3): 278-284, doi: 10.1111/tbed.12271
- Walker A.R., Bouattour A., Camicas J.L., Estrada-Peña A., Horak I.G., Latif A.A., Pegram R.G., et al., 2003. Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species. Bioscience Reports, Edinburgh, UK, 221 p.

Résumé

Elati K., Ayadi A.A., Khamassi Khbou M., Jdidi M., Rekik M., Gharbi M. Dynamique des populations de tiques infestant les ovins dans les steppes arides de Tunisie

Cette étude a cherché à déterminer la dynamique des populations de tiques infestant les ovins dans la région de Gafsa (centre de la Tunisie). Les tiques ont été prélevées sur 57–64 moutons de race Barbarine choisis au hasard chaque mois pendant un an, d'octobre 2013 à septembre 2014. Au total, 560 tiques ont été collectées et identifiées. Elles appartenaient à deux espèces : *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (98,6 %) et *Hyalomma excavatum* (1,4 %). Les ovins n'ont été infestés que d'avril à octobre avec une prévalence maximale (nombre d'animaux infestés / nombre d'animaux examinés) en août pour *R. sanguineus* s.l. (83 %) et en mai pour *H. excavatum* (7 %). L'intensité d'infestation maximale (nombre de tiques / nombre d'animaux infestés) a été de 3,7 tiques par animal en août. Ces données seront très utiles pour les éleveurs d'ovins et les vétérinaires pour mettre en place des mesures de lutte efficaces contre les tiques et les pathogènes qu'elles transmettent.

Mots-clés : ovin, Metastigmata, *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*, *Hyalomma excavatum*, dynamique des populations, Tunisie

Resumen

Elati K., Ayadi A.A., Khamassi Khbou M., Jdidi M., Rekik M., Gharbi M. Dinámica poblacional de garrapatas que infestan ovejas en las estepas áridas de Túnez

Este estudio tuvo como objetivo determinar la dinámica de la población de garrapatas que infestan a las ovejas en la región de Gafsa (Túnez Central). Se recolectaron mensualmente garrapatas al azar de 57–64 ovejas de raza Barbarina. Los animales fueron monitoreados por un período de un año, desde octubre de 2013 hasta septiembre de 2014. Se recolectaron e identificaron 560 garrapatas. Las garrapatas pertenecieron a dos especies: *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (98,6%) y *Hyalomma excavatum* (1,4%). Las ovejas sólo se infestaron de abril a octubre con una prevalencia máxima de infestación (número de animales infestados / número de animales examinados) en agosto para *R. sanguineus* s.l. (83%), y en mayo para *H. excavatum* (7%). La mayor intensidad de infestación (número de garrapatas / número de ovejas infestadas) fue de 3,7 en agosto. Estos resultados deberían ayudar a los propietarios de ovejas y veterinarios a implementar programas de control eficientes contra las garrapatas y los patógenos que transmiten.

Palabras clave: ovino, Metastigmata, *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*, *Hyalomma excavatum*, dinámica de poblaciones, Túnez

Characterization of bacterium types isolated from commercial laying hen farms in Ogun State Nigeria

Oluwawemimo Adebawale^{1*} Olanike Adeyemo²

Keywords

Poultry, laying hen, Bacteria, commercial farming, health hazard, Nigeria

Submitted: 23 January 2018

Accepted: 12 June 2018

Published: 29 October 2018

DOI: 10.19182/remvt.31642

Summary

This study investigated the distribution of bacterium categories isolated from poultry feces and litters on commercial laying hen farms in Remo and Egba local government areas, Ogun State, Nigeria. In total 29 species of lactose and non-lactose fermenters were recovered. Bacteria isolated from feces included *Aeromonas hydrophila* (27.5%), *Providencia stuartii* (15.5%), *Actinobacillus* sp. (9.1%), *Burkholderia cepacia* (7.7%), *Serratia marcescens* (4.9%), *Citrobacter diversus* (4.9%), *Klebsiella oxytoca* (4.2%), and *Enterobacter gergoviae* (4.2%). Others were *Escherichia coli* (2.1%), *Plesiomonas shigelloides* (2.1%), *Vibrio alginolyticus* (2.1%), *Morganella morganii* (2.1%), *Pantoea agglomerans* (1.4%), *Vibrio mimicus* (1.4%), *Pseudomonas aeruginosa* (1.4%), *Burkholderia pseudomallei* (1.4%), *Salmonella arizonae* (0.7%), *Klebsiella pneumonia* (0.7%), *Acinetobacter iwoffii* (0.7%), *Vibrio vulnificus* (0.7%), *Shewanella putrefaciens* (0.7%), *Proteus mirabilis* (0.7%) and *Proteus vulgaris* (0.7%). There was 66.7% similarity between the bacterium profile of litters and that of feces; some additional strains were identified in the litters. No variation ($p = 0.64$) was observed in the number of isolated bacterium types from feces and litter samples. However, the number of bacterium types isolated from fecal samples differed ($p = 0.002$) between the two studied areas. Results suggest that there is a potential risk of wide-range bacterial transmission within poultry populations, and to humans in close contact with them.

■ How to quote this article: Adebawale O., Adeyemo O., 2018. Characterization of bacterium types isolated from commercial laying hen farms in Ogun State Nigeria. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **71** (3): 137-141, doi: 10.19182/remvt.31642

■ INTRODUCTION

The poultry industry in Nigeria has been rapidly expanding in past years despite having faced several challenges such as the avian influenza outbreak in 2006 (Fagbamila et al., 2017). However, prospects have been hampered by several factors such as morbidity and mortality caused by enteric bacterial diseases, which are on the increase in

the poultry industry in Nigeria (Ojo et al., 2012). In addition, across the different regions of the country, the poultry sector is characterized by a low level of specialization and general weak level of biosecurity (Fagbamila et al., 2017).

Common bacterial diseases of poultry birds with huge impact on production and health in Nigeria include *Escherichia coli*, *Salmonella* serotypes and other enteric pathogens (Lutful Kabir, 2010). Apart from consequences on poultry production, many other species belonging to Enterobacteriaceae or non-Enterobacteriaceae have been implicated as opportunistic, nosocomial and foodborne pathogens responsible for a wide range of infections in humans, especially in critically ill or immunocompromised patients (Dowd et al., 2008; Gwida et al., 2014). Fecal contamination of poultry and poultry products with pathogens such as *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* and others have shown to constitute problems in food hygiene and processing, with increasing poultry meat spoilage and pathogen dissemination to consumers

1. Department of Veterinary Public Health and Reproduction, College of Veterinary Medicine, Federal University of Agriculture Abeokuta, Nigeria.

2. Department of Veterinary Public Health and Preventive Medicine, University of Ibadan, Nigeria.

* Corresponding author

Tel.: +234 (0)90 85 60 80 43; Email: oluwawemimo1@yahoo.com



<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

(Davies and Board, 1998; Zhao et al., 2001; Gwida et al., 2014). Besides, the global increase in resistance of Gram-negative bacteria to common antibiotics used for treatments in animals and humans has generated a huge public health concern.

Acquiring information on Gram-negative bacterium strains and populations (both Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae) circulating or present on poultry farms in Ogun State would be useful to develop efficient on-farm and food-safety mitigation strategies, conduct effective monitoring and surveillance of pathogens and antibiotic resistance, and, ultimately, reduce human exposure to zoonotic and opportunistic pathogens from poultry and poultry products. For these major concerns, we investigated and described diverse enteric bacterium types (Gram-negative bacilli) present in poultry feces and litters from commercial laying hen farms in Egba and Remo local government areas of Ogun State, Nigeria.

■ MATERIALS AND METHODS

Study area

Ogun State has the highest concentration of poultry farms in Nigeria, particularly laying hen production; it is also known as the Gateway State and shares a border with Benin to the west, and interstate boundaries with Oyo to the north, Lagos to the south and Ondo to the east (Afolabi et al., 2013; Adebowale et al., 2016). The study area is located in the southwestern zone of the country between 6.20°–7.80°N and 3.00–5.00°E, and covers 16,409.26 square kilometers.

Survey design and farm recruitment

A survey was conducted to determine and characterize the prevalence of enteric bacterium isolates from poultry farms in Ogun State. All registered commercial laying hen farms in the State were included in the population target. In total 113 such farms from Egba (n = 72) and Remo zones (n = 41) were selected and sampled based on address accessibility and farmers' willingness to participate (Figure 1). When the farms could not be accessed, we replaced them with other farms from the farm list.

The sample size was estimated according to Thrusfield (2007); the formula used was:

$$n = \frac{Z^2 \times P_{exp} \times (1 - P_{exp})}{d^2}$$

where Z is the degree of confidence (1.96), P the expected prevalence, and d the precision at 95% confidence level (5% in this study).

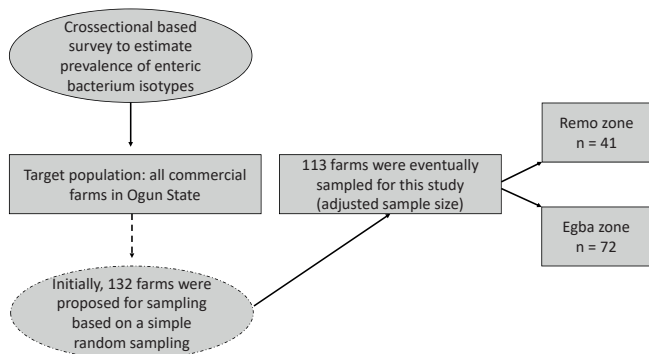


Figure 1: Recruitment flow chart of commercial poultry farms to characterize bacteria from feces and litters in Remo and Egba zones of Ogun State, Nigeria.

The adjusted sample size was estimated at 132 farms with expected frequency of at least 50%, and 5% precision at 95% confidence level: $n_{adj} = N \times n / N + n$

where n_{adj} is the adjusted sample size, N the sample size of the study population, n the sample size based on infinite population.

Sample collection

From each farm studied, five pooled fresh fecal droppings and poultry litters were randomly collected with sterile disposable gloves. Samples were labeled and transported in a cold box to the Department of Microbiology Laboratory, College of Veterinary Medicine, Federal University of Agriculture, Abeokuta, for microbiological examination. All samples were processed using conventional methods of cultivation.

Bacterium isolation and characterization

In total 2.5 g each of feces and litter were pre-enriched in 22.5 ml buffered peptone water (CM0509, Oxoid, UK) and incubated at 37°C for 18–24 hours. Thereafter, aliquots (a loop full) of enriched broth were inoculated on prepared sterile MacConkey agar plates (CM0115, Oxoid) and incubated at 37°C for 18–24 hours. Plates were observed for both lactose and non-lactose fermenting bacteria, with pink and straw-colored colonies, respectively. Discrete colonies were recultured on MacConkey agar plates. Purified isolates were identified and confirmed by using 24 different biochemical tests distributed in microplates (Microbact GNB 24E, Oxoid) and Microbact 2000 computer software package (Oxoid). Bacterial identification by Microbact is based on pH changes in various dehydrated substrates and substrate utilization (O'Hara, 2005). Briefly, according to the manufacturer's procedure, 1–3 colonies picked from each purified isolate were resuspended in physiological saline solution (0.85% NaCl); four drops of bacterium suspension used to inoculate Microbact micro well plates were then added. Two drops of mineral oil (MB1093A) were added to black wells, seals were replaced over wells which were incubated at 35°C ± 2°C for 18–24 hours. Subsequently, reagents such as indole Voges-Proskauer (V-P1, V-P11) and tryptophan deaminase (TDA) were added to corresponding wells as instructed by the manufacturer. The reactions with visible color changes were converted into an octal code (base 8 number system from 0 to 7), which was then entered in the Microbact computerized identification package for identification (O'Hara, 2005). Substrates included in the identification kit were lysine, ornithine, H₂S, glucose, mannitol, xylose, o-nitrophenyl-β-d-galactopyranoside (ONPG), indole, urease, V-P, citrate, TDA, nitrate, gelatin, malonate, inositol, sorbitol, rhamnose, sucrose, lactose, arabinose, adonitol, raffinose, salicin and arginine.

Statistical analysis

Prevalence with the 95% confidence interval was determined using Graphpad Quickcalcs online software package. Non-parametric Mann Whitney U test was used to compare variations in the number of bacterium types from different sample categories. All results generated with p value less than 0.05 were considered statistically significant. All graphic presentations and analyses were performed by Graphpad Prism 6.07, and Microsoft Excel 2013.

■ RESULTS

A wide range of different bacterium species were isolated including seventeen species of Enterobacteriaceae, and twelve of non-Enterobacteriaceae. The main Enterobacteriaceae isolated from poultry feces were, with 95% confidence interval (CI), *Providencia stuartii* (15.5%; CI 10.4–22.4), *S. marcescens* (4.9%; CI 2.2–10.0),

Citrobacter diversus (4.9%; CI 2.2–10.8), *K. oxytoca* (4.2%; CI 1.7–9.1) and *Enterobacter gergoviae* (4.2%, CI 1.7–9.1). Other types isolated included *Pantoea agglomerans* (4.2%), *Escherichia coli* (2.1%), *Plesiomonas shigelloides* (2.1%), *Morganella morganii* (2.1%), *Salmonella arizonae* (0.7%), *Klebsiella pneumoniae* (0.7%), *Proteus mirabilis* (0.7%) and *Proteus vulgaris* (0.7%) (Figure 2, top).

Furthermore, commonly isolated non-Enterobacteriaceae from feces included, with 95% CI, *Aeromonas hydrophila* (27.5%; CI 20.8–35.4), *Actinobacillus* species (9.1%; CI 5.3–15.1), *Burkholderia cepacia* (7.7%; CI 4.3–13.4), *Vibrio alginolyticus* (2.1%), *Vibrio mimicus* (1.4%), *Pseudomonas aeruginosa* (1.4%), *Burkholderia pseudomallei* (1.4%), *Acinetobacter iwoffii* (0.7%), *Vibrio vulnificus* (0.7%), *Shewanella putrefaciens* (0.7%). Overall, *Aeromonas hydrophila* was the most isolated species from feces samples (Figure 2, top).

With regard to litter samples, there was 66.7% similarity with bacterium profiles isolated from poultry feces, except for a few strains such as *Flavobacterium meningosepticum*, *Hafnia alvei* and *Moraxella* sp. The main Enterobacteriaceae identified from litters was, with 95% CI, *Klebsiella oxytoca* (11.5%; CI 6.3–20.3). Moreover, the most frequently isolated non-Enterobacteriaceae were *Aeromonas hydrophila* (22.1%; CI 14.6–32.0) and *Pseudomonas aeruginosa* (11.4%; CI 6.3–20.3) (Figure 2, bottom). No variation ($p = 0.64$) was observed in the number of bacterium types isolated from poultry feces and litter samples. However, there was a difference ($p = 0.002$) between the two studied areas in the number of bacterium types isolated from fecal samples (Figure 2, bottom).

DISCUSSION

Poultry farming has contributed to the economy of many countries and accounts for 25% of local meat production in Nigeria. However, productivity of poultry is faced with various disease challenges especially caused by enteric pathogens (Mshelbala et al., 2017). There are limited data that show the distribution of various enteric

bacterium types belonging to Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae in commercial laying hen farms in Ogun State, except in free-range local chickens (Ojo et al., 2012).

The present study was carried out to determine the distribution of various Gram-negative bacterium types of Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae in commercial laying hen farms in Ogun State. Microbact was used to group isolated bacteria because of its availability, cost (relatively cheap), and capacity to identify miscellaneous Enterobacteriaceae and other Gram-negative bacilli present in diverse biological samples. Microbact is reported to be very accurate and useful in routine flow work in microbiology, and a convenient means of identifying members of the family Enterobacteriaceae (Mugg and Hill, 1981).

In the study, most common Gram-negative rod-shaped bacteria identified belonged to the family Enterobacteriaceae or to non-Enterobacteriaceae – a few of which are highly pathogenic and associated with gastroenteritis and pneumonia in humans and animals. Others were opportunistic or nosocomial pathogens, which are clinically important and commonly found in the urinary or respiratory tract of critically ill or immunocompromised people. A study conducted by Kilonzo-Nthenge et al. (2013), which evaluated drug-resistant Enterobacteriaceae in retail poultry meat and beef showed that meat samples were contaminated with similar bacterium types isolated in our study. Such potential pathogenic bacterium types included *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Kluyvera* sp., *Morganella morganii*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella* sp. to mention a few. *Klebsiella oxytoca* was identified as the most commonly isolated pathogen in chicken and turkey meat (Kilonzo-Nthenge et al., 2013). Poultry meat becomes contaminated with gastrointestinal flora during processing and may serve as a vehicle for foodborne pathogens. Sabarinath et al. (2009) described similar strains as major contaminants in commercial chicken in the West Indies. Interestingly, unlike these two studies, the present study showed that *Providencia stuartii* was the most commonly isolated Enterobacteriaceae in poultry feces.

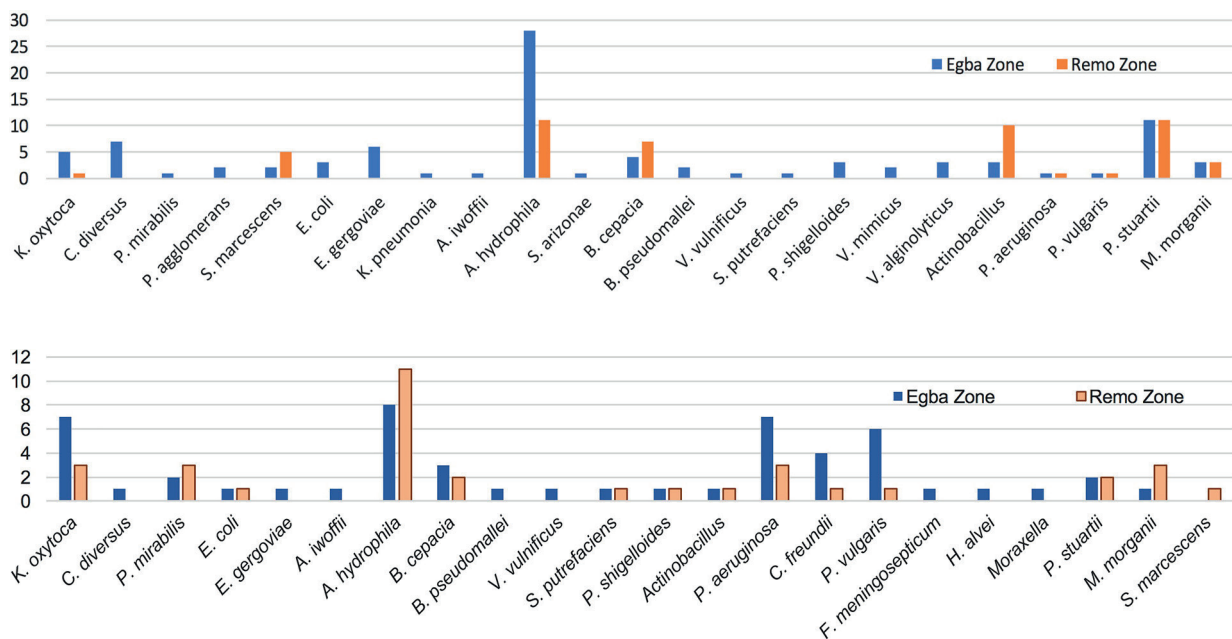


Figure 2: Distribution of bacterium types isolated from feces (top) and litters (bottom) on commercial laying hen farms in Remo and Egba zones of Ogun State, Nigeria. *Klebsiella oxytoca*; *Citrobacter diversus*; *Proteus mirabilis*; *Pantoea agglomerans*; *Serratia marcescens*; *Escherichia coli*; *Enterobacter gergoviae*; *Klebsiella pneumoniae*; *Acinetobacter iwoffii*; *Aeromonas hydrophila*; *Salmonella arizonae*; *Burkholderia cepacia*; *Burkholderia pseudomallei*; *Vibrio vulnificus*; *Shewanella putrefaciens*; *Plesiomonas shigelloides*; *Vibrio mimicus*; *Vibrio alginolyticus*; *Actinobacillus*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Proteus vulgaris*; *Providencia stuartii*; *Morganella morganii*; *Citrobacter freundii*; *Flavobacterium meningosepticum*; *Hafnia alvei*; *Moraxella*.

Providencia stuartii is reported to be isolated from human feces, burns, wounds, animals especially poultry, reptiles and the environment (Liu, 2011). Unlike the more pathogenic members of Enterobacteriaceae (*Salmonella*, *Escherichia coli* or *Shigella*) which have been widely studied, *P. stuartii* is a normal intestinal microflora of animals and humans but of clinical importance because of its implication in nosocomial infection outbreaks in communities and hospitals (Liu, 2011). It can cause severe infections in humans (especially in immunocompromised individuals), which range from diarrhea, urinary tract infections, endocarditis to septicemia (AlJehani et al., 2012). Infections are usually fatal because of its marked resistance to multiple antibiotics (Liu, 2011; AlJehani et al., 2012). This pathogen has been associated with poultry diseases and, like other Enterobacteriaceae, constitutes a major problem in meat hygiene and processing due to contamination and spoilage (Davies and Board, 1998).

Other similar intestinal microfloras isolated from this study were *Proteus*, *Morganella*, *Citrobacter*, *Hafnia*, and *Serratia*. Furthermore, the presence of *E. coli*, *Salmonella*, and *Klebsiella pneumoniae* in poultry samples poses great economic and public health concern in terms of high mortality rate in birds associated with colibacillosis, salmonellosis, respiratory tract infections, and food safety (Miranda et al., 2008). For instance, *E. coli* is associated with diarrhea caused by varying enteropathogenic, enterotoxigenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroaggressive pathotypes. The presence of these highly pathogenic bacteria in feces and litter could prompt propagation within bird populations, and contamination of the environment and of the poultry food chain during processing, handling, or packaging of finished products (Miranda et al., 2008). Isolation of multiple pathogens on different farms in the studied areas also points to the poor sanitary conditions and biosecurity measures on many poultry farms in Nigeria. Improved hygiene primarily at farm level may be crucial to controlling the risk of bacterium propagation along the food chain.

With regard to non-Enterobacteriaceae from feces and litter samples *Aeromonas hydrophila* was the most isolated. This is not a surprise as *Aeromonas* has been reported particularly in poultry and isolated from sick and healthy commercial chickens in several studies conducted in Nigeria (Mailafia and Nok, 2009; Adeleke and Omafuvbe, 2009). *A. hydrophila* is considered as an opportunistic pathogen in poultry and incriminated in cases of fowl cholera outbreaks, a devastating disease in chickens in Nigeria (Mailafia and Nok, 2009). Furthermore, *A. hydrophila* has emerged as an important human pathogen associated with foodborne disease outbreaks and gastroenteritis ranging from mild diarrhea to cholera-like disease (Awaad et al., 2011; Evangelopoulou et al., 2015). Other than gastroenteritis, *Aeromonas* is responsible for meningitis, cellulitis, otitis, endocarditis, osteomyelitis, peritonitis, bacteremia, and septicemia, among other diseases (Albert et al., 2000). Considering in this study the high farm-level prevalence of *A. hydrophila*, people in close contact with birds especially poultry workers could be at high risk of exposure to infection, and dissemination. A study in Brazil reported a high prevalence of *A. hydrophila* in asymptomatic poultry farmers (18.5%), four of the farms studied had 50–75% of the workers contaminated, and 75% of farmers positive to the pathogen experienced frequent gastroenteric disorders (Zanella et al., 2012). In view of the present results, it is suggested that further work to investigate the prevalence of this pathogen in those closely in contact with poultry and reported cases of gastroenteritis should be conducted to evaluate public health and socioeconomic impacts.

Having an insight into the bacterium diversity of poultry farms would enable to develop efficient pathogen surveillance systems, mitigation strategies or guidance for reducing on-farm zoonotic and opportunistic pathogens. In addition, mortality or morbidity associated with infections and resistance, potential transmission to people working

closely with poultry especially poultry workers or handlers or veterinarians, and associated food safety consequences would be reduced.

■ CONCLUSION

The present study reported the presence of various potentially pathogenic bacteria belonging to Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae from laying hen litters and feces in Ogun State commercial farms. It suggests a potential risk of wide-range bacterial transmission within poultry populations to humans in close contact with poultry, and to consumers. Data from this study aimed to provide information for monitoring and system surveillance of farms for pathogens, and formulation of operable guidance and policies for reducing on farm pathogen presence, transmission and risk of exposure to the wider community. Further evaluation and susceptibility pattern of these isolates to commonly used antibiotics in the poultry industry in Ogun State may be needed.

Acknowledgments

The authors wish to thank Mr. P.A. Akinduti and Mrs. E. Kperegbeiy for technical assistance during this study.

REFERENCES

- Adebowale O.O., Adeyemo O.K., Awoyomi O., Dada R., Adebowale O., 2016. Antibiotic use and practices in commercial poultry laying hens in Ogun State Nigeria. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **69** (1): 41-45, doi: 10.19182/remvt.31170
- Albert M.J., Ansaruzzaman M., Talukder K.A., Chopra A.K., Kuhn I., Rahman M., Mollby R., 2000. Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. *J. Clin. Microbiol.*, **38** (10): 3785-3790
- AlJehani Y., Albuaainain H., Zakaria H., Makhdom F., Al-Ansari R., 2012. Necrotizing fasciitis: An unusual causative pathogen; A case report. *Int. J. Health Allied Sci.*, **1** (4): 286-289, doi: 10.4103/2278-344X.107899
- Davies A., Board R., 1998. The microbiology of meat and poultry. Aspen, Gaithersburg, MD, USA
- Dowd S.E., Callaway T.R., Wolcott R.D., Sun Y., McKeenan T., Hagevoort R.G., Edrington T.S., 2008. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiol.*, **8**: 125, doi:10.1186/1471-2180-8-125
- Evangelopoulou G., Filioussis G., Kritas S., Kantere M., Burriel A.R., 2015. Isolation and antimicrobial testing of *Aeromonas* sp., *Citrobacter* sp., *Cronobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia* sp., *Klebsiella* sp., and *Trabulsiella* sp. from the gallbladder of pigs. *Pol. J. Microbiol.*, **64** (2): 185-8
- Fagbamila I.O., Barco L., Mancin M., Kwaga J., Ngulokun S.S., Zavagnin P., Lettini A.A., et al., 2017. *Salmonella* serovars and their distribution in Nigerian commercial chicken layer farms. *PLoS One* **12** (3): e0173097, doi: 10.1371/journal.pone.0173097
- Gwida M., Hotzel H., Geue I., Tomaso H., 2014. Occurrence of Enterobacteriaceae in raw meat and in human samples from Egyptian retail sellers. *Int. Schol. Res. Notices*, **2014**, 565671, doi: 10.1155/2014/565671
- Kilonzo-Nthenge A., Rotich E., Nahashon S.N., 2013. Evaluation of drug-resistant Enterobacteriaceae in retail poultry and beef. *Poult. Sci.*, **92**: 1098-1107
- Liu D., 2011. Molecular detection of human bacterial pathogens. CRC Press, 1278 p.
- Lutfal Kabir, S.M., 2010. Avian colibacillosis and salmonellosis: A closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **7** (1): 89-114, doi: 10.3390/ijerph7010089

- Mailafia S., Nok A., 2009. Spectrophotometric determination of proteins associated with virulence in Nigerian strains of *Aeromonas* species. *Bayero. J. Pure. Appl. Sci.*, **2** (1): 105-108
- Miranda J.M., Guarddon M., Mondragon A., Vázquez B.I., Fente C.A., Cepeda A., Franco C.M., 2007. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. strains isolated from organic chicken, conventional chicken, and turkey meat: a comparative survey. *J. Food Prot.*, **70** (4): 1021-1024
- Mshelbwala F.M., Ibrahim N.D., Saidu S.N., Azeez A.A., Akinduti P.A., Kwanashie C.N., Kadiri A.K.F., et al., 2017. Motile *Salmonella* serotypes causing high mortality in poultry farms in three South-Western States of Nigeria. *Vet. Rec. Open*, **4**: e000247
- Mugg P., Hill A. 1981. Comparison of the Microbact-12E and 24E systems and the API-20E system for the identification of Enterobacteriaceae. *J. Hyg. Camb.*, **87** (2): 287-97, doi: 10.1017/S0022172400069503
- O'Hara C.M., 2005. Manual and automated instrumentation for identification of Enterobacteriaceae and other aerobic Gram-negative bacilli. *Clin. Microbiol. Rev.*, **18** (1): 147-62, doi: 10.1128/CMR.18.1.147-162.2005
- Ojo O.E., Awosile B., Agbaje M., Sonibare A.O., Oyekunle M.A., Kasali O.B., 2012. Quinolone resistance in bacterial isolates from chicken carcasses in Abeokuta, Nigeria: A retrospective study from 2005-2011. *Nig. Vet. J.*, **33** (2): 483-491
- Sabarinath A., Guillaume V., Guillaume B., Mathew V., DeAllie C., 2009. Bacterial contamination of commercial chicken eggs in Grenada, West Indies. *West Indian. Vet. J.*, **9** (2): 4-7
- Thrusfield M., 2007. Veterinary epidemiology. Blackwell Publishing, 610 p.
- Zanella J. de F.P., da Luz R.B., Fadanelli R., Figueir M.P., Delamare A.P.L., da Costa S.O.P., Echeverrigaray S., 2012. High prevalence of *Aeromonas* spp. in poultry farmers from a rural community of South Brazil. *Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.*, **20** (3): 93-98
- Zhao C., Ge B., De Villena J., Sudler R., Yeh E., Zhao S., Meng J., 2001. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, D.C., area. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67** (12): 5431-5436, doi: 10.1128/AEM.67.12.5431-5436.2001

Résumé

Adebowale O., Adeyemo O. Caractérisation des types de bactéries isolés dans des élevages de poules pondeuses commerciales de l'Etat d'Ogun, Nigeria

L'étude a porté sur la répartition des types de bactéries isolées à partir de fèces et de litières de volaille dans les élevages commerciaux de poules pondeuses des agglomérations de Remo et d'Egba, Etat d'Ogun, Nigeria. Au total, 29 espèces de fermenteurs du lactose et de non-fermenteurs du lactose ont été récoltées. Les bactéries isolées des fèces comprenaient *Aeromonas hydrophila* (27,5 %), *Providencia stuartii* (15,5 %), *Actinobacillus* sp. (9,1 %), *Burkholderia cepacia* (7,7 %), *Serratia marcescens* (4,9 %), *Citrobacter diversus* (4,9 %), *Klebsiella oxytoca* (4,2 %) et *Enterobacter gergoviae* (4,2 %). Les autres espèces étaient *Escherichia coli* (2,1 %), *Plesiomonas shigelloides* (2,1 %), *Vibrio alginolyticus* (2,1 %), *Morganella morganii* (2,1 %), *Pantoea agglomerans* (1,4 %), *Vibrio mimicus* (1,4 %), *Pseudomonas aeruginosa* (1,4 %), *Burkholderia pseudomallei* (1,4 %), *Salmonella arizonae* (0,7 %), *Klebsiella pneumonia* (0,7 %), *Acinetobacter iwoffii* (0,7 %), *Vibrio vulnificus* (0,7 %), *Shewanella putrefaciens* (0,7 %), *Proteus mirabilis* (0,7 %) et *Proteus vulgaris* (0,7 %). Il y avait 66,7 % de similarité entre le profil bactérien des litières et celui des fèces ; quelques souches supplémentaires ont été identifiées dans les litières. Aucune variation ($p = 0,64$) n'a été observée dans le nombre de types de bactéries isolés provenant d'échantillons de fèces et de litières. Cependant, le nombre de types de bactéries isolés à partir des matières fécales a été significativement différent ($p = 0,002$) entre les deux zones étudiées. Les résultats suggèrent qu'il existe un risque potentiel de transmission bactérienne à grande échelle au sein des populations de volailles, et aux humains qui y sont en contact étroit.

Mots-clés : volaille, poule pondeuse, Bactéria, agriculture commerciale, danger pour la santé, Nigeria

Resumen

Adebowale O., Adeyemo O. Caracterización de tipos de bacterias aisladas en granjas de gallinas ponedoras comerciales en el estado de Ogun, Nigeria

Este estudio investigó la distribución de categorías de bacterias aisladas de heces y camas de aves de corral en granjas comerciales de gallinas ponedoras en áreas de gobierno local de Remo y Egba, estado de Ogun, Nigeria. En total se recuperaron 29 especies de fermentadores de lactosa y no lactosa. Las bacterias aisladas de las heces incluyeron *Aeromonas hydrophila* (27,5%), *Providencia stuartii* (15,5%), *Actinobacillus* sp. (9,1%), *Burkholderia cepacia* (7,7%), *Serratia marcescens* (4,9%), *Citrobacter diversus* (4,9%), *Klebsiella oxytoca* (4,2%) y *Enterobacter gergoviae* (4,2%). Otras fueron *Escherichia coli* (2,1%), *Plesiomonas shigelloides* (2,1%), *Vibrio alginolyticus* (2,1%), *Morganella morganii* (2,1%), *Pantoea agglomerans* (1,4%), *Vibrio mimicus* (1,4%), *Pseudomonas aeruginosa* (1,4%), *Burkholderia pseudomallei* (1,4%), *Salmonella arizonae* (0,7%), *Klebsiella pneumonia* (0,7%), *Acinetobacter iwoffii* (0,7%), *Vibrio vulnificus* (0,7%), *Shewanella putrefaciens* (0,7%), *Proteus mirabilis* (0,7%) y *Proteus vulgaris* (0,7%). Hubo una similitud del 66,7% entre el perfil de bacterias de las camas y el de las heces; algunas cepas adicionales fueron identificadas en las camas. No se observó variación ($p = 0,64$) en el número de tipos de bacterias aisladas de heces y camas. Sin embargo, el número de tipos de bacterias aisladas de muestras fecales difirió ($p = 0,002$) entre las dos áreas estudiadas. Los resultados sugieren que existe un importante riesgo potencial de transmisión bacteriana entre las poblaciones de aves de corral, y para los humanos en contacto cercano con ellas.

Palabras clave: ave de corral, gallina ponedora, Bacteria, agricultura comercial, peligro para la salud, Nigeria

Risque épidémiologique de la peste équine africaine chez les ânes au Burkina Faso

Madi Savadogo¹ Adama Sow^{1*}
Laibané Dieudonné Dahourou¹ Aurélie Cailleau^{1,2}
Miguiri Kalandi¹ Germain Jérôme Sawadogo¹

Mots-clés

Ane, peste équine africaine, facteur de risque, séroprévalence, Burkina Faso

Submitted: 24 May 2017
Accepted: 27 August 2018
Published: 29 October 2018
DOI: 10.19182/remvt.31643

Résumé

Le virus de la peste équine africaine (PEA) provoque des épizooties sévères lorsqu'il est transmis aux chevaux par ses vecteurs, les culicoïdes. Une étude transversale a été réalisée dans cinq régions du Burkina Faso afin de déterminer la séroprévalence du virus chez les ânes et d'identifier les facteurs de risque potentiel. Au total, 460 sérums ont été prélevés dans 15 villages. Une analyse par dosage immunoenzymatique (ELISA) de compétition a été réalisée pour détecter les anticorps antiviral PEA. La séroprévalence apparente globale était de 72,6 %, témoignant du fait que les ânes étaient infectés par le virus de la PEA. Une analyse multivariée par régression logistique a été effectuée en vue de déterminer les facteurs affectant le niveau de séroprévalence. Celle-ci est apparue significativement différente entre les sites d'étude, confirmant le rôle de la zone agroécologique dans la survenue de la maladie. L'âge et le poids des animaux ont également eu un effet significatif sur la séroprévalence, contrairement au sexe, à la couleur de la robe et à la taille du troupeau. Cette étude a mis en évidence la circulation active du virus de la peste équine chez les ânes au Burkina Faso.

■ Pour citer cet article : Savadogo M., Sow A., Dahourou L.D., Cailleau A., Kalandi M., Sawadogo G.J., 2018. Epidemiological risk of African horse sickness in donkeys in Burkina Faso. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 71 (3): 143-147, doi: 10.19182/remvt.31643

■ INTRODUCTION

L'agriculture et l'élevage demeurent des secteurs économiques clés en Afrique au sud du Sahara. La traction animale est l'une des pratiques novatrices les plus accessibles aux paysans, et les équidés apportent près de 10 % de l'énergie nécessaire à l'agriculture (Vall et al., 2003). Les ânes sont utilisés en milieu rural pour le labour, l'exhaure de l'eau, le transport des personnes et des biens, notamment les intrants et les produits agricoles. Ils jouent également un rôle important en ville pour le transport des marchandises ou des matériaux de construction, et la collecte des ordures ménagères.

1. Ecole inter-Etats des sciences et médecine vétérinaires (EISMV), BP 5077, Dakar Fann, Sénégal.

2. Centre suisse de recherches scientifiques en Côte d'Ivoire (CSRS), Yopougon-Abidjan, Abidjan, Côte d'Ivoire.

* Auteur pour la correspondance
Email : wosamada@yahoo.fr



Au Burkina Faso, le cheptel asin était estimé en 2014 à environ 1 136 900 têtes (MRAH, 2015). Près de la moitié de cet effectif est exploitée comme animaux de trait (Havard et al., 2004). Les ânes se trouvent essentiellement dans les régions arides au nord et au centre du pays. Dans la partie sud, de nombreuses pathologies animales comme la trypanosomose (Sow, 2012) constituent de sérieuses menaces pour l'élevage de ces animaux.

La peste équine africaine (PEA) est une infection virale aiguë à subaiguë et non contagieuse des équidés. Maladie vectorielle transmise par les culicoïdes, elle est enzootique en Afrique subsaharienne et peut entraîner plus de 90 % de mortalité chez les chevaux lors de l'apparition d'un foyer (MacLachlan et Guthrie, 2010). Plusieurs études montrent la circulation du virus de la PEA chez les équidés dans certains pays de la sous-région (Akakpo et al., 2009 ; Ehizibolo, 2014). Les pertes économiques occasionnées par l'épizootie de PEA qui a éclaté au Sénégal en 2007 ont été évaluées à 1,6 million de dollars (Akakpo et al., 2009). Récemment, la PEA aurait provoqué d'importantes pertes au sein du cheptel équin burkinabé (Sow, 2012).

La situation de la pathologie reste cependant méconnue chez les ânes, les informations disponibles ne permettant pas aux acteurs de la santé animale d'évaluer le niveau du risque de PEA chez cette espèce animale. Par exemple, la prévalence sérologique du virus n'est pas bien connue alors que, selon certains auteurs, les ânes, même s'ils ne manifestent que rarement la maladie clinique, pourraient constituer un réservoir dans le cycle épidémiologique du virus et ainsi être à l'origine de risques élevés de mortalités pour les chevaux (Zientara et al., 2015). D'ailleurs, d'autres auteurs ont montré qu'une injection du virus de la PEA entraînait chez les ânes l'installation d'une virémie persistante allant de 12 à 58 jours, associée à une réponse humorale (Hamblin et al., 1998 ; El Hasnaoui et al., 1998).

La présente étude visait à améliorer les connaissances sur l'épidémiologie de la PEA chez les asins au Burkina Faso. De façon plus spécifique, il s'agissait de déterminer la prévalence sérologique et d'identifier les facteurs de risque épidémiologique de la maladie.

MATERIEL ET METHODES

Zone d'étude

L'étude a été conduite en septembre et octobre 2013 au Burkina Faso. Elle a été réalisée dans cinq des treize régions administratives, choisies aléatoirement et réparties dans trois zones agroclimatiques distinctes (figure 1). Les régions du Nord et du Sahel se trouvent dans la zone sahélienne où il pleut moins de 600 mm par an. Les régions du Centre et de l'Est se situent dans la zone soudano-sahélienne caractérisée par une pluviométrie annuelle d'environ 900 mm. La région des Hauts-Bassins, au sud du pays, est caractérisée par un climat soudanien avec une pluviométrie de plus de 1000 mm par an. Dans ces cinq régions, les ânes jouent un rôle important dans les activités champêtres et le transport.

Echantillonnage

Les ânes retenus pour la présente étude étaient majoritairement des mâles (74 %) et avaient un âge compris entre trois et vingt ans. La couleur de leur robe était essentiellement le gris (81 % des animaux) et le bai (14 %), les autres variantes de couleur représentant 5 % de l'échantillon.

Sur la base d'une prévalence attendue de 33,3 %, d'une précision souhaitée de 5 % et d'un niveau de confiance de 95 %, il fallait, selon Win Episcopo 2.0, un minimum de 342 animaux pour que l'échantillon soit représentatif de la population des ânes au Burkina Faso. Ce minimum a été largement dépassé puisque 460 échantillons ont été collectés dans les 15 villages retenus (tableau I). Les prélèvements

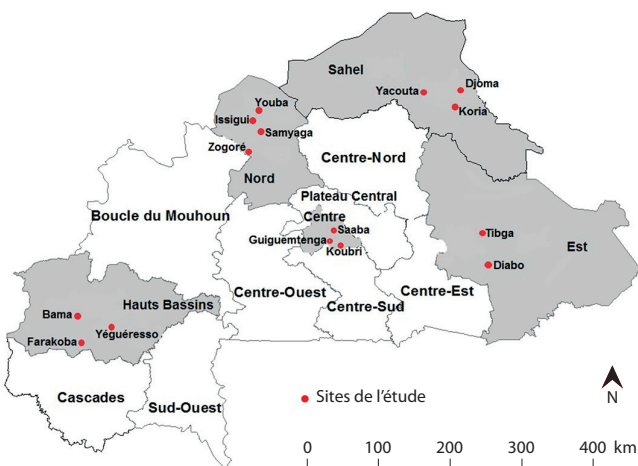


Figure 1 : localisation des sites d'étude au Burkina Faso.

Tableau I

Séroprévalence de la peste équine africaine chez les ânes en fonction de la localité, de l'âge, du poids, du sexe et de la taille de l'élevage en 2013 au Burkina Faso

Localité	Séroprévalence (%) (IC)	Odds ratio (IC)	P
Bama (n = 35)	65,7 (50,0–81,4)	NC	0,04
Yéguéresso (n = 38)	68,4 (53,6–83,2)	1,7 (0,6–5,0)	
Farakoba (n = 20)	50,0 (28,1–71,9)	0,6 (0,2–2,1)	
Samyaga (n = 40)	70,0 (55,8–84,2)	1,2 (0,4–3,4)	
Issigui (n = 19)	73,7 (53,9–93,5)	1,1 (0,3–4,4)	
Youba (n = 22)	59,1 (38,5–79,6)	0,8 (0,3–2,5)	
Zogoré (n = 18)	66,7 (44,9–88,4)	0,8 (0,3–3,0)	
Koria (n = 39)	76,9 (63,7–90,1)	1,2 (0,4–3,5)	
Djoma (n = 20)	65,0 (44,1–85,9)	0,6 (0,1–2,1)	
Yacouta (n = 18)	66,7 (44,9–88,4)	0,8 (0,2–2,6)	
Tibga (n = 38)	81,6 (69,3–93,9)	2,7 (0,9–8,5)	
Diabo (n = 53)	81,1 (70,6–91,7)	3,2 (1,2–9,1) ^a	
Saaba (n = 34)	85,3 (73,4–97,2)	3,0 (0,9–10,6)	
Koubri (n = 29)	79,3 (64,6–94,1)	2,5 (0,8–8,7)	
Guiguemtenga (n = 37)	73,0 (58,7–87,3)	1,9 (0,6–5,7)	
Tranche d'âge (ans)			
0 à 5 (n = 194)	64,9 (58,2–71,7)	NC	0,01
6 à 10 (n = 206)	76,2 (70,4–82,0)	1,7 (1,4–2,5) ^a	
11 à 15 (n = 54)	83,3 (73,4–93,3)	2,6 (1,3–6,2) ^a	
16 à 20 (n = 6)	100 (NC)	NC	
Poids des ânes			
< 100 kg (n = 99)	58,6 (48,9–68,3)	NC	0,02
≥ 100 kg (n = 361)	76,5 (72,1–80,8)	2,5 (1,5 à 4,3) ^a	
Sexe			
Male (n = 341)	73,3 (68,6–78,0)	NC	0,6
Femelle (n = 119)	70,6 (62,4–78,8)	NC	
Nb. d'ânes / élevage			
1 (n = 279)	73,5 (68,3–78,7)	NC	0,95
2 (n = 134)	70,1 (62,4–77,9)	NC	
3 (n = 31)	74,2 (58,8–89,6)	NC	
4 (n = 11)	72,7 (NC)	NC	
5 (n = 5)	80,0 (NC)	NC	

IC : intervalle de confiance au seuil de significativité de 95 % ; NC : non calculé
^a Modalités à effet significatif (p < 0,05)

sanguins ont été réalisés au niveau de la veine jugulaire à l'aide de tubes secs sous vide. Les sérums ont été obtenus après centrifugation à 1500 tours/min pendant 10 min et conservés à -20 °C.

Analyses sérologiques

Le test utilisé était basé sur la recherche des anticorps spécifiques de la protéine VP7 du virus de la peste équine. Un kit de dosage immunoenzymatique (ELISA) de compétition (Ingenasa, Ingezim, Madrid, Espagne) a été utilisé selon les instructions du fabricant. Selon celles-ci, seuls les sérums montrant un pourcentage de blocage (PB) supérieur à 50 % sont considérés comme positifs. Les prévalences ont été déterminées selon la formule :

$$PB = \frac{DO(\text{contr-}) - DO(\text{éché})}{DO(\text{contr-}) - DO(\text{contr+})} \times 100$$

où DO est la densité optique, éch l'échantillon, contr- le contrôle négatif et contr+ le contrôle positif.

Analyses statistiques

Les données ont été analysées avec le logiciel R 3.1.2 et ont permis d'étudier la variabilité du statut sérologique avec un niveau de confiance de 95 %. La régression logistique binaire a permis, quant à elle, d'apprécier l'effet des facteurs intrinsèques (couleur de la robe, âge, poids vif et sexe) et extrinsèques (taille de l'élevage et localité) sur le statut sérologique des ânes. Ainsi, pour chaque variable indépendante catégorielle, une modalité a été considérée comme la référence. Les rapports de cotes (ou *odds ratio*) ont été extraits dans le but de quantifier l'effet de chaque modalité ayant révélé un effet significatif ($p < 0,05$) sur la séroprévalence.

■ RESULTATS

Détermination de la séroprévalence du virus

La séroprévalence globale a été de 72,6 % (intervalle de confiance [IC] à 95 % : 68,5%–76,7 %). Selon les régions, le taux de séroprévalence a varié significativement de 50 % à 85,3 % ($p = 0,04$) (tableau I). La distribution de la séroprévalence a permis de décrire quatre profils épidémiologiques de la PEA au Burkina Faso (figure 2). Les séroprévalences les plus élevées ont été observées dans les régions du Centre et de l'Est.

Facteurs de risques

La séroprévalence a varié de manière significative ($p < 0,05$) avec l'âge, le site de prélèvement (village) et le poids vif (tableau I). Les ânes âgés de 6 à 10 ans et ceux âgés de 11 à 15 ans, ceux provenant du village de Diabo, ainsi que ceux ayant un poids vif d'au moins 100 kg ont eu une séroprévalence plus élevée que, respectivement, les ânes moins âgés, ceux du village de Bama et ceux de moins de 100 kg. À l'inverse, la couleur de la robe, le sexe et la taille de l'élevage n'ont pas eu d'effet significatif sur la séroprévalence (tableau I). Les rapports de cotes et les intervalles de confiance associés à l'âge, au village et au poids vif ont révélé un effet significatif ($p < 0,05$). La variable localité

a indiqué que les ânes issus de Diabo (région de l'Est) avaient 3,2 fois plus de risque d'être positifs à la PEA (IC 95 % : 1,2–9,1) que ceux issus de Bama, village situé dans la région des Hauts-Bassins au sud du pays. L'analyse des *odds ratio* a également montré un effet significatif de l'âge : les ânes âgés de 6 à 10 ans et de 11 à 15 ans avaient respectivement 1,7 et 2,6 fois plus de risque d'avoir été infectés par le virus de la PEA que les ânes moins âgés (≤ 5 ans). Enfin, la variable poids vif a révélé que les sérums des ânes pesant au moins 100 kg avaient 2,5 fois plus de risque d'être séropositifs à la PEA (IC 95 % : 1,5–4,3) que ceux des animaux de moins de 100 kg (tableau I). Ainsi, la zone agroécologique, l'âge des ânes et le poids vif sont des facteurs de risque pour la PEA dans la zone d'étude.

■ DISCUSSION

Les résultats de la présente étude ont révélé une séroprévalence globale du virus de la PEA de 72,6 % chez les ânes issus de cinq régions du Burkina Faso. De la Grandière (2015) rapporte que la PEA est enzootique dans les pays africains à climat tropical et subtropical sec. Les résultats de la présente étude témoignent que la maladie est effectivement une menace pour la population équine au Burkina Faso. La séroprévalence observée dans notre étude était supérieure à celle de 33,3 % obtenue au Sénégal (Ndiaye, 2010). Elle était en revanche moins élevée que celle de 80 % observée par Adeyefa et Hamblin en 1995 chez les équidés du Nigeria. Plus récemment, une autre étude réalisée au Nigeria montre une séroprévalence encore plus élevée (86,6 %) chez les chevaux (Ehizibolo et al., 2014).

Le cheval est l'équidé le plus sensible au virus de la PEA. La mortalité peut atteindre 95 % chez cette espèce chez qui le virus présenterait une virulence plus marquée que chez l'âne (OIE, 2004 ; Radostits et al., 2007). D'une manière générale, l'âne est d'ailleurs reconnu plus résistant à la PEA que le cheval (Ndiaye, 2010). En Ethiopie, une étude montre ainsi une séroprévalence plus élevée chez les ânes (51,1 %) que chez les chevaux (28,3 %) (Bitew et al., 2011). Nos résultats confortent ceux obtenus par Gordon et al. (2017). En général, la séroprévalence importante régulièrement observée chez l'âne confirme le rôle que jouerait cette espèce dans la circulation du virus de la PEA en intervenant comme un réservoir (Hamblin et al., 1998).

Les ânes provenant de Diabo avaient au moins trois fois plus de risque d'être séropositifs vis-à-vis du virus. Ce village bénéficie d'un climat tropical de type soudano-sahélien, d'un couvert végétal de type savane et se situe dans une zone où de nombreux ânes sont élevés (Tapsoba, 2014). Plus globalement, c'est dans cette zone soudano-sahélienne que les plus fortes séroprévalences (plus de 80 % à Diabo, Saaba et Tibga) ont été observées. Cette influence de la zone agroécologique dans la distribution de la PEA a déjà été montrée en Afrique subsaharienne, par exemple en Ethiopie où la séroprévalence du virus de la PEA varie en fonction des zones agroécologiques : elle est plus importante dans les zones de haute altitude (Bitew et al., 2011). L'OIE (2004) recommande une approche tenant compte des particularités géographiques et climatiques pour ce qui concerne la stratégie de surveillance de la maladie.

Le risque de séropositivité était plus élevé chez les ânes plus âgés que chez les jeunes, ce qui est logique car en zone d'enzootie, plus les animaux sont âgés, plus le risque d'avoir été contaminé par le virus de la PEA est grand. L'utilisation des ânes adultes pour les travaux agricoles les exposerait davantage à la piqûre des culicoïdes vecteurs de la maladie alors que les ânes plus jeunes sont souvent laissés près des concessions. En outre, l'exploitation des ânes adultes dans le transport, qui implique souvent des déplacements sur de longues distances, pourrait aussi augmenter le risque de contact entre ces animaux et les arthropodes vecteurs. D'autres auteurs estiment cependant que l'âge n'est pas un facteur de risque d'infection (Bitew et al., 2011).

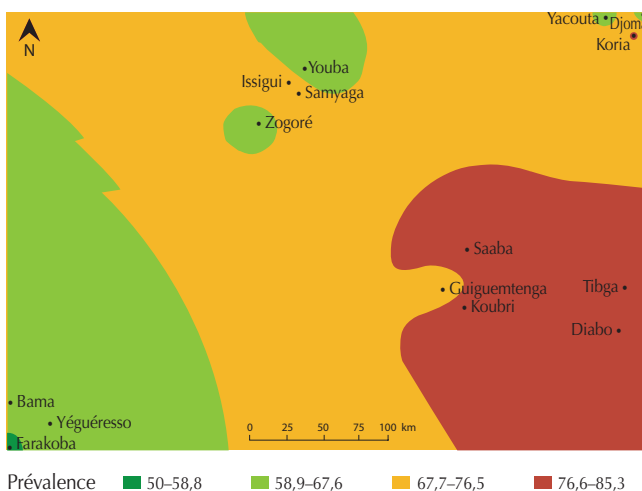


Figure 2 : profils épidémiologiques de la peste équine africaine chez les ânes en 2013 au Burkina Faso. Source : Enquête de terrain. Réalisation : Madi Savadogo, 2018. Projection : UTM zone 30 Nord.

Les animaux de poids vif supérieur à 100 kilogrammes avaient au moins deux fois plus de risque d'être infectés par le virus que les ânes moins lourds. Ce constat corrobore l'influence de l'âge sur le risque de séropositivité. En effet, le poids vif des ânes augmente significativement avec l'âge, les ânes les plus lourds étant les plus âgés (Roamba, 2014 ; Kabore, 2014). Les autres variables étudiées, en l'occurrence le sexe, la couleur de la robe et la taille de l'élevage, n'ont pas eu d'effets significatifs sur la séropositivité des animaux. Ces résultats sont comparables à ceux de Bitew et al. (2011).

■ CONCLUSION

Cette étude a révélé des séroprévalences vis-à-vis de la peste équine assez élevées chez les ânes au Burkina Faso. Les facteurs de risque les plus importants étaient l'âge et la zone agroécologique, les régions de l'Est et du Centre étant les plus exposées à la maladie. Par conséquent, nous recommandons que des études plus approfondies soient réalisées afin de déterminer les sérotypes circulants dans le pays. Cela permettrait aux services vétérinaires de mettre en place une vaccination annuelle contre la PEA, mais aussi d'adopter une stratégie de lutte qui prenne en compte la situation agroécologique ainsi que la mise à disposition d'habitats appropriés afin de réduire le risque de piqûre des équidés par les culicoïdes.

Remerciements

Les auteurs remercient M. Chekouna Diatta et Mlle Camille Eugue, techniciens aux Laboratoires de parasitologie et de biochimie de l'École inter-Etats des sciences et médecine vétérinaires, pour leur collaboration. L'étude a été réalisée grâce à l'appui financier du Projet d'appui à l'enseignement supérieur (PAES) de l'UEMOA.

REFERENCES

- Adeyefa C.A.O., Hamblin C., 1995. Continuing prevalence of African horse sickness in Nigeria. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **48** (1): 31-33, doi: 10.19182/remvt.9483
- Akakpo A.J., Wombou Toukam C.M., Mankor A., Ly C., 2009. Impact économique de l'épizootie de la peste équine de 2007 au Sénégal. *Rev. Afr. Santé Prod. Anim.*, **7** (3-4) : 149-158
- Bitew M., Andargie A., Bekele M., Jenberie S., Ayelet G., Gelaye E., 2011. Serological survey of African horse sickness in selected districts of Jimma zone, Southwestern Ethiopia. *Trop. Anim. Health Prod.*, **43** (8): 1543-1547, doi: 10.1007/s11250-011-9839-8
- De la Grandière de Noronha Cotta M.A., 2015. Etude *in vitro* et *in vivo* de la virulence et du réassortiment génétique des sérotypes 4 et 9 du virus de la peste équine. Thèse Doct., Université de Liège, Belgique, 197 p.
- Ehizibolo D.O., Nwokike E.C., Wungak Y., Meseko C.A., 2014. Detection of African horse sickness virus antibodies by ELISA in sera collected from unvaccinated horses in Kaduna Metropolis, Nigeria. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **67** (2): 73-75, doi: 10.19182/remvt.10187
- El Hasnaoui H., El Harrak M., Zientara S., Laviada M., Hamblin C., 1998. Serological and virological responses in mules and donkeys following inoculation with African horse sickness virus serotype 4. *Arch. Virol. Suppl.*, **14**: 29-36
- Gordon S.J.G., Bolwell C., Rogers C.W., Musuka G., Kelly P., Guthrie A., Mellor P.S., et al., 2017. The sero-prevalence and sero-incidence of African horse sickness and equine encephalosis in selected horse and donkey populations in Zimbabwe. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **84** (1), doi.org/10.4102/ojvr.v84i1.1445
- Hamblin C., Salt J.S., Mellor P.S., Graham S.D., Smith P.R., Wohlsein P., 1998. Donkeys as reservoirs of African sickness virus. *Arch. Virol. Suppl.*, **14**: 37-47
- Havard M., Traoré A., Njoya A., Fall A., 2004. Draft animal power and its sociotechnical environment in Burkina Faso, Cameroon and Senegal. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays trop.*, **57** (3-4): 133-141, doi: 10.19182/remvt.9884
- Kabore S., 2014. Caractérisation morphobiométrique et biochimique des ânes (*Equus asinus*) du Burkina Faso. Thèse Méd. Vét., EISMV, Dakar, Sénégal, 109 p.
- MacLachlan N.J., Guthrie A.J., 2010. Re-emergence of bluetongue, African horse sickness, and other orbivirus diseases. *Vet. Res.*, **41**: 35, doi: 10.1051/vetres/2010007
- MRAH, 2015. Annuaire des statistiques de l'élevage 2014. Ministère des Ressources animales et halieutiques, Ouagadougou, Burkina Faso, 177 p.
- Ndiaye O., 2010. Epidémiologie de la peste équine au Sénégal : cas de l'épizootie de 2007. Thèse Méd. Vét., EISMV, Dakar, Sénégal, 158 p.
- OIE, 2004. African horse sickness. In: Manual of diagnostic tests and vaccine for terrestrial animals, 5th Edn. OIE, Paris, France, 1-21
- Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C., Hinchcliff K.W., 2007. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses, 10th Edn. Saunders, London, UK, 1180-1183
- Roamba C.R., 2014. Caractérisation morphobiométrique et biochimique des asins (*Equus asinus*) du Sénégal. Thèse Méd. Vét., EISMV, Dakar, Sénégal, 100 p.
- Sow A., 2012. Détermination de quelques paramètres biochimiques des ânes du Burkina Faso et leur variation chez les sujets infectés de trypanosomose. Mém. Master, UCAD, Dakar, Sénégal, 38 p.
- Tapsoba M., 2014. Bien-être des ânes et leurs rôles socio-économiques dans les ménages ruraux du Burkina Faso. Mém. Master, EISMV, Dakar, Sénégal, 44 p.
- Vall E., Ngoutsof A.D., Abakar O., Mounkama C.K., Choupamon J., Bedogo B., Koulmasse K., 2003. La traction animale : une innovation en phase d'institutionnalisation encore fragile. In : Actes colloque Savanes africaines : des espaces en mutation, des acteurs face à de nouveaux défis (Eds. Jamin J.Y., Boukar L.S., Floret C.), mai 2002, Garoua, Cameroun. Prasad, N'Djamena, Tchad / Cirad, Montpellier, France, 16 p.
- Zientara S., Weyer C.T., Lecollinet S., 2015. African horse sickness. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.*, **34** (2), 315-327, doi: 10.20506/rst.34.2.2359

Summary

Savadogo M., Sow A., Dahourou L.D., Cailleau A., Kalandi M., Sawadogo G.J. Epidemiological risk of African horse sickness in donkeys in Burkina Faso

African horse sickness (AHS) virus causes severe epidemics when transmitted to horses by *Culicoides* vectors. A cross-sectional study was carried out in five areas of Burkina Faso to determine the seroprevalence of AHS virus in donkeys and to identify potential risk factors. A total of 460 sera were collected in 15 villages. A blocking enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was carried out to detect AHS virus antibodies. The overall apparent seroprevalence was 72.6% indicating that the donkeys were infected with AHS virus. A multivariate logistic regression analysis was performed to determine the factors affecting the seroprevalence level. A significant effect between geographical areas was observed, confirming the role of the agroecological zone in the occurrence of AHS. Similarly, age and animal weight had significant effects on seroprevalence, whereas sex, coat color and herd size had not. This study highlighted the active circulation of AHS virus in donkeys in Burkina Faso.

Keywords: asses, African horse sickness, risk factors, seroprevalence, Burkina Faso

Resumen

Savadogo M., Sow A., Dahourou L.D., Cailleau A., Kalandi M., Sawadogo G.J. Riesgo epidemiológico de peste equina africana en burros en Burkina Faso

El virus de la peste equina africana (PEA) causa graves epidemias cuando se transmite a los caballos mediante vectores *Culicoides*. Se realizó un estudio transversal en cinco áreas de Burkina Faso para determinar la seroprevalencia del virus PEA en burros e identificar posibles factores de riesgo. Se recolectaron 460 sueros en 15 poblados. Se llevó a cabo un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para detectar los anticuerpos del virus PEA. La seroprevalencia general aparente fue del 72,6%, lo que indica que los burros estaban infectados con el virus PEA. Se realizó un análisis de regresión logística multivariante para determinar los factores que afectan el nivel de seroprevalencia. Se observó un efecto significativo entre las áreas geográficas, confirmando el papel de la zona agroecológica en la aparición de PEA. De manera similar, la edad y el peso del animal tuvieron efectos significativos en la seroprevalencia, mientras que el sexo del animal, el color del pelaje y el tamaño de la manada no lo tuvieron. Este estudio destacó la circulación activa del virus PEA en burros en Burkina Faso.

Palabras clave: asno, peste equina africana, factores de riesgo, seroprevalencia, Burkina Faso

