

SOMMAIRE

229 Actualité

PATHOLOGIE

231 SAIYARI (M.), HOSHIAR MANDAVI, MAYAHI (M.), SHARMA (R.N.). Observation de lésions spontanées dans la glande thyroïde de moutons et de chèvres en Iran (**communication**) (*en anglais*)

VIROLOGIE

233 GAMEEL (A.A.), ABU ELZEIN (E.M.E.), HOUSAWI (F.M.T.), AGIB (A.), IBRAHIM (A.O.). Observations clinico-pathologiques de l'ecthyma contagieux chez des agneaux infectés naturellement en Arabie Saoudite (**communication**) (*en anglais*)

236 NGANGNOU (A.), ZOYEM (N.). Évaluation de la protection vaccinale contre la peste bovine au Cameroun. II. La province du Nord (**communication**)

BACTÉRIOLOGIE

239 ÁVILA (F.A.), PAULILLO (A.C.), SCHOCKEN-ITURRINO (R.P.), LUCAS (F.A.), ORGAZ (A.), QUINTANA (J.L.). Étude comparative de l'efficacité d'un probiotique et de vaccins anti-K99 et anti-A14 pour la prophylaxie de la diarrhée chez les veaux au Brésil (*en anglais*)

PARASITOLOGIE

244 BLANDINO (T.), BARRERA (M.), ALONSO (M.), FAURE (M.), RODRIGUEZ DIEGO (J.G.). Diagnostic de *Babesia bigemina* avec le test à l'immunoperoxydase (**communication**)

PROTOZOOLOGIE

247 DESQUESNES (M.), LA ROCQUE (S. de). Comparaison de la sensibilité du test de Woo et d'un test de détection des antigènes de *Trypanosoma vivax* chez deux moutons expérimentalement infectés avec une souche guyanaise du parasite

254 OMOTAINSE (S.O.), ANOSA (V.O.). Réponses leucocytaires et thrombocytaires à l'infection expérimentale à *Trypanosoma brucei* chez les chiens (*en anglais*)

ENTOMOLOGIE

259 AHMED (A.B.), ONYIAH (J.A.), SULEIMAN (S.N.). Troubles de la reproduction dans un élevage en laboratoire de *Glossina palpalis palpalis* Robineau-Desvoidy (*Diptera* : *Glossinidae*) (*en anglais*)

264 GIDUDU (A.M.), CUISANCE (D.), REIFENBERG (J.M.), FRÉZIL (J.L.). Contribution à l'étude de l'émission de *Trypanosoma congolense* par *Glossina morsitans morsitans* (*Diptera*, *Glossinidae*) au laboratoire

NUTRITION ET ALIMENTATION

271 BENGOUIMI (M.), FAYE (B.), EL KASMI (K.), TRESSOL (J.C.). Facteurs de variation des indicateurs plasmatiques du statut nutritionnel en oligo-éléments chez le dromadaire au Maroc. I. Valeurs usuelles et variations physiologiques (**communication**)

276 BENGOUIMI (M.), FAYE (B.), TRESSOL (J.C.), BENGOUIMI (D.). Facteurs de variation des indicateurs plasmatiques du statut nutritionnel en oligo-éléments chez le dromadaire au Maroc. II. Effet d'une complémentation minérale (**communication**)

281 Informations

CONTENTS

229 Current topics

PATHOLOGY

231 SAIYARI (M.), HOSHIAR MANDAVI, MAYAHI (M.), SHARMA (R.N.). Spontaneous lesions in the thyroid of sheep and goats in Iran (**communication**)

VIROLOGY

233 GAMEEL (A.A.), ABU ELZEIN (E.M.E.), HOUSAWI (F.M.T.), AGIB (A.), IBRAHIM (A.O.). Clinico-pathological observations on naturally occurring contagious ecthyma in lambs in Saudi Arabia (**communication**)

236 NGANGNOU (A.), ZOYEM (N.). Evaluation of the vaccinal protection against rinderpest in Cameroon. II. The North Province (**communication**)

BACTERIOLOGY

239 ÁVILA (F.A.), PAULILLO (A.C.), SCHOCKEN-ITURRINO (R.P.), LUCAS (F.A.), ORGAZ (A.), QUINTANA (J.L.). A comparative study of the efficiency of a probiotic and the anti-K99 and anti-A14 vaccines in the control of diarrhea in calves in Brazil

PARASITOLOGY

244 BLANDINO (T.), BARRERA (M.), ALONSO (M.), FAURE (M.), RODRIGUEZ DIEGO (J.G.). Diagnosis of *Babesia bigemina* with the immunoperoxidase assay (**communication**)

PROTOZOOLOGY

247 DESQUESNES (M.), LA ROCQUE (S. de). Comparison of the sensitivity of Woo's test and a test for detecting antigens of *Trypanosoma vivax* in two sheep experimentally infected with a Guyanese strain of the parasite

254 OMOTAINSE (S.O.), ANOSA (V.O.). Leucocyte and thrombocyte responses in dogs experimentally infected with *Trypanosoma brucei*

ENTOMOLOGY

259 AHMED (A.B.), ONYIAH (J.A.), SULEIMAN (S.N.). Reproductive disorders in a laboratory colony of *Glossina palpalis palpalis* Robineau-Desvoidy (Diptera : Glossinidae)

264 GIDUDU (A.M.), CUISANCE (D.), REIFENBERG (J.M.), FRÉZIL (J.L.). Contribution to the study of the ejection of *Trypanosoma congolense* by *Glossina morsitans morsitans* (Diptera, Glossinidae) in the laboratory

FEEDING

271 BENGOUIMI (M.), FAYE (B.), EL KASMI (K.), TRESSOL (J.C.). Variability factors in trace elements nutritional status by plasmatic indicators in camel (*Camelus dromedarius*) in Morocco. I. Normal value and physiological variability (**communication**)

276 BENGOUIMI (M.), FAYE (B.), TRESSOL (J.C.), BENGOUIMI (D.). Variability factors in trace elements nutritional status by plasmatic indicators in camel (*Camelus dromedarius*) in Morocco. II. Effect of mineral supplement (**communication**)

281 News

SUMARIO

229 Actualidad

PATOLOGÍA

231 SAIYARI (M.), HOSHIAR MANDAVI, MAYAHI (M.), SHARMA (R.N.). Lesiones espontáneas de la tiroides en ovejas y cabras en Irán (**nota**)

VIROLOGÍA

233 GAMEEL (A.A.), ABU ELZEIN (E.M.E.), HOUSAWI (F.M.T.), AGIB (A.), IBRAHIM (A.O.). Observaciones clínico-patológicas del ectima contagioso natural en los corderos de Arabia Saudita (**nota**)

236 NGANGNOU (A.), ZOYEM (N.). Evaluación de la protección vaccinal contre la peste bovina en Camerún. II. Provincia del Norte (**nota**)

BACTERIOLOGÍA

239 ÁVILA (F.A.), PAULILLO (A.C.), SCHOCKEN-ITURRINO (R.P.), LUCAS (F.A.), ORGAZ (A.), QUINTANA (J.L.). Estudio comparativo de la eficiencia de un probiótico y de vacunas anti-K99 y anti-A14 para el control de la diarrea en terneros en Brasil

PARASITOLOGÍA

244 BLANDINO (T.), BARRERA (M.), ALONSO (M.), FAURE (M.), RODRIGUEZ DIEGO (J.G.). Diagnóstico de la *Babesia bigemina* mediante el test de inmunoperoxidasa (**nota**)

PROTOZOOLOGÍA

247 DESQUESNES (M.), LA ROCQUE (S. de). Estudio comparativo de la sensibilidad del test de Woo y de un test de detección de antígenos de *Trypanosoma vivax* en dos corderos infectados en forma experimental con una cepa guayanesa del parásito

254 OMOTAINSE (S.O.), ANOSA (V.O.). Respuesta leucocitaria y trombocitaria en perros infectados experimentalmente con *Trypanosoma brucei*

ENTOMOLOGÍA

259 AHMED (A.B.), ONYIAH (J.A.), SULEIMAN (S.N.). Desórdenes reproductivos en una colonia de *Glossina palpalis palpalis* Robineau-Desvoidy (*Diptera* : *Glossinidae*) en laboratorio

264 GIDUDU (A.M.), CUISANCE (D.), REIFENBERG (J.M.), FRÉZIL (J.L.). Contribución al estudio de la eliminación de *Trypanosoma congolense* por parte de la *Glossina morsitans morsitans* (*Diptera*, *Glossinidae*), bajo condiciones de laboratorio

NUTRICIÓN Y ALIMENTACIÓN

271 BENGOUIMI (M.), FAYE (B.), EL KASMI (K.), TRESSOL (J.C.). Factores de variación de los índices plasmáticos del estadio nutricional en oligoelementos en el dromedario en Marruecos. I. Valores comunes y variaciones fisiológicas (**nota**)

276 BENGOUIMI (M.), FAYE (B.), TRESSOL (J.C.), BENGOUIMI (D.). Factores de variación de los índices plasmáticos del estadio nutricional en oligoelementos en el dromedario de Marruecos. II. Efecto de un complemento mineral (**nota**)

281 Informaciones

ACTUALITÉ

Préparation de la quatrième réunion biennale de la Society for Tropical Veterinary Medicine (STVM)

La quatrième réunion biennale de la Society for Tropical Veterinary Medicine (STVM) se tiendra au CIRAD-EMVT, à Montpellier (France), du 5 au 9 mai 1997.

La STVM

La STVM est une organisation scientifique internationale dont l'objectif est de contribuer aux progrès de la médecine vétérinaire tropicale, de l'hygiène et des disciplines associées. Créée en 1978 sous le nom d'American Society of Tropical Veterinary Medicine, elle a changé de nom en 1994 afin de s'ouvrir à d'autres continents. Aujourd'hui, la STVM compte 318 membres (dont 74 p. 100 sont Nord-Américains) répartis sur 33 pays.

L'organisation tous les deux ans d'une grande réunion scientifique sur la médecine vétérinaire tropicale constitue l'activité principale de la STVM. La Revue d'Élevage et de Médecine vétérinaire des Pays tropicaux avait publié les Actes de la deuxième réunion, qui avait eu lieu du 2 au 6 février 1993¹. Une STVM Newsletter est également éditée deux fois par an : des informations sur la Société y sont publiées, ainsi que des articles et des annonces de cours et de congrès.

En 1995, le groupe des «Veterinary Hemoparasite Research Workers», composé d'une trentaine de chercheurs américains travaillant sur l'anaplasmoze et les babésioses bovines, ont intégré la STVM. Au cours de cette même année, a été créée au sein de la STVM une section pour les étudiants. Dans le même temps, le Prix Norval-Young a été instauré - Andy Norval et Alan Young sont deux éminents chercheurs décédés en 1995 qui ont travaillé sur les tiques et les maladies transmises par les tiques -, afin de permettre à un étudiant-chercheur de participer à la réunion biennale.

La STVM comporte un Président : Jim House, de Plum-Island (Etats-Unis), et un Président élu. En tant que nouveau Président élu, j'ai la charge d'organiser la prochaine réunion biennale et de la présider ; à l'issue, je deviendrai à mon tour Président de la STVM pour deux années, jusqu'à la réunion suivante.

Les thèmes de la quatrième réunion biennale

*Ils ne sont pas encore complètement définis à ce jour. Les deux réunions précédentes avaient mis l'accent sur les tiques et les maladies transmises par les tiques, et plus particulièrement la tique *Amblyomma variegatum* (vectrice de la cowdriose), qui constitue un problème important dans la Caraïbe. Compte tenu de*

1. Revue Élev. Méd. vét. Pays trop., 1993, 46 (1-2).

la participation active du groupe des chercheurs américains travaillant sur les hémoparasitoses et de l'importance mondiale du sujet (trypanosomoses et vecteurs en Afrique, theilérioses africaine et américaine, babésiose et anaplasmose bovines tropicales), un des symposia sera consacré à ce thème.

Le thème du symposium principal sera défini très prochainement : avec les hémoparasitoses, l'épidémiologie moléculaire appliquée aux maladies tropicales, ainsi que, à nouveau, les tiques et les maladies transmises par les tiques, ont été proposées.

Parmi les thèmes évoqués pour les autres sessions, citons : la tuberculose animale, les mycoplasmoses animales, les vaccins anti-parasitaires, la géographie de la santé (analyse géographique et risques épidémiologiques).

Enfin, une session générale permettra à tous les intervenants dont le sujet ne rentre dans aucun des symposia, de présenter leurs travaux.

Montpellier

Lors de la troisième réunion de la STVM qui s'est tenue au Costa Rica en mai 1995, j'ai proposé la candidature du CIRAD-EMVT sur son nouveau site d'activités, Montpellier, comme lieu de la quatrième réunion.

Les deux précédentes, en 1991 et 1993, s'étaient déroulées respectivement à Porto Rico et en Guadeloupe, donc toujours dans la Caraïbe, et le conseil d'administration de la STVM a manifesté la volonté de s'ouvrir davantage à des chercheurs d'autres continents.

Parmi d'autres candidatures, celle de Montpellier a été retenue, en raison du soutien logistique apporté par la Direction du CIRAD-EMVT qui assurera l'organisation locale de la réunion, de la situation privilégiée de la région et de l'accès facile à cette ville qui permettra d'attirer à la fois des Européens, des Méditerranéens et des Africains, et de la réputation internationale du complexe Agropolis et du CIRAD.

En conclusion

Les trois premières réunions de la STVM avaient accueilli une centaine de participants venant d'une trentaine de pays différents. Le pari de cette quatrième réunion est d'attirer un plus grand nombre de participants en provenance d'un plus grand nombre de pays, notamment d'Afrique, du Proche-Orient et d'Europe, afin d'intensifier les échanges, voire de développer les collaborations, entre scientifiques d'origines différentes mais partageant le même intérêt pour la médecine vétérinaire tropicale.

Dr Emmanuel Camus

Président élu de la STVM

Communications

Spontaneous lesions in the thyroid of sheep and goats in Iran*

M. Saiyari¹

Hoshiar Mandavi¹

M. Mayahi¹

R.N. Sharma^{1**}

SAIYARI (M.), HOSHIAR MANDAVI, MAYAHI (M.), SHARMA (R.N.). Spontaneous lesions in the thyroid of sheep and goats in Iran. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1995, 48 (3) : 231-232.

A slaughterhouse survey conducted in Ahwaz (Iran) revealed higher incidence of pathological lesions in the thyroid glands of goats (6.54 %) than in sheep (2.8 %). Goitre was found in 4.99 % and 1.96 % of slaughtered goats and sheep, respectively. However, ultimobranchial body cysts were present three times more in sheep than in goats.

Key words : Goat - Sheep - Thyroid gland - Pathology - Iran Islamic Republic.

Introduction - Material and Methods

In endemic areas, hypothyroidism is known to co-exist in man and animals (5). Records in Pathology Section of the University Teaching Hospital Gholestan, Ahwaz, Iran (1) showed a high incidence of goitre as well as other diseases which affect the thyroid gland in man. There is no report on the pathological features of the thyroid in small ruminants in Iran. This prompted the authors to investigate and report such lesions in sheep and goats from Khoozestan Province, Southwest, Iran.

During November 1991 through October 1992, the thyroid glands of 1,100 goats and 2,500 sheep were examined at the municipal slaughterhouse Ahwaz, Iran. The thyroid glands of 70 sheep and 72 goats which showed macroscopic abnormalities were fixed in 10 % formal-saline. The sections cut at 5 µ were stained by hematoxyline and eosin. Special stains, namely the Gomoris Silver method and Toluidine Blue, were used wherever appropriate.

* Partie de la thèse remise par Hoshiar Mandavi à la Shahid Chamran University pour le diplôme de « D.V.M. ».

1. School of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahwaz, Iran.

** Adresse actuelle : School of Veterinary Medicine, University of Zambia, PO BOX 32379, Lusaka, Zambie.

Reçu le 20.10.1993, accepté le 7.11.1995.

Results

Colloid goitre

The number of goats with colloid goitre lesions was higher (1.09 %) than the number of sheep (0.4 %). In general, both thyroid lobes were diffusely enlarged and were more translucent and lighter in colour than the glands with hyperplastic goitre. Histologically, there was less vascularity. Many microfollicles were formed distended with colloid. The follicular cells lining the microfollicles were flattened and atrophic.

Hyperplastic goitre

A higher number of goats (3.9 %) had hyperplastic goitre lesions than sheep (1.56 %). Both thyroid lobes were enlarged, especially in young animals. The affected glands were firm and dark red in colour because of inter-follicular capillary congestion. Histologically, the follicles were irregular in shape and size. The amount of light-coloured eosinophilic colloid varied greatly in the follicles. Numerous follicles were completely devoid of colloid material. The follicular lining cells were either in a single columnar layer or single cuboidal layer. Some follicles were filled with hyperplastic lining cells.

The gross and histological goitre lesions observed in the present study were in agreement with workers who have reported similar reactive hyperplastic changes in the thyroid in spontaneous and experimental hypothyroidism in sheep (3, 8) and in goats (4, 7, 9, 11).

Ultimobranchial body cyst

In general, the cysts varied from 2 to 3 mm in diameter and occurred mostly adjacent to their hilar region. The contents of the cysts were yellowish grey, inspissated and grumous. Microscopically, the number of cysts in sheep varied from 3 to 10 and in goats up to 4 in a single lobe. They were lined by one or more layers of squamous cells. The lumen contained eosinophilic keratin substance. Fourty four out of 70 pathological sheep thyroid glands and 7 out of 72 goat thyroid glands showed ultimobranchial cysts. These observations were in agreement with Singh *et al.* (10) regarding of sheep. In goats, a low percentage of thyroid with cysts was found compared to their observation. Further, in this study, a high number of sheep with ultimobranchial body cysts had concomitant hyperplastic goitre lesions (34.28 %), not reported in literature earlier.

Parenchymal cysts

It is well known that the involutionary stage of hyperplastic thyroid glands leads to the formation of colloid goitre. Many follicles become very large and coalesce to form

Communication

cysts. In the present study parenchymal cysts were frequently associated with colloid goitre. Histologically, the cysts were lined by flattened cuboidal cells and/or squamous cells and the lumen contained eosinophilic colloid substance (figure 1). The importance of parenchymal cysts and ultimobranchial body cysts lies in differential diagnosis of these two types of cysts.

Atrophy of thyroid gland

Goats had more cases of thyroid gland atrophy (13.8 %) than sheep (7.15 %). In general, the glands were smaller in size and lighter in colour than normal glands. Histologically, the follicles were small with little or no colloid. Follicular lining cells were tall and columnar. These changes could be a stage in the hyperplastic reaction of the thyroid to hypothyroidism. However, the authors preferred to describe it separately because of the smaller size of the glands in these cases.

Discussion and Conclusion

The number of goats with thyroid pathology was higher (6.54 %) than the number of sheep (2.8 %). A similar trend in the incidence of goitre was observed in the two species. A deficient intake of iodine is known to be the dominant cause of the disease. In addition, a number of foods, including cabbage, cassava, cauliflower, brussels sprouts, turnips and others belonging to the *Brassica* and *Crucifera* families have been documented as goitrogenic in animals and humans (3, 6). Since both species of animals originated in and around the Ahwaz district and were possibly from similar pastures or feeding regimes, it is likely that the difference in the percentage of thyroid lesions could be because of species difference. Goats appear particularly susceptible than sheep, horses and

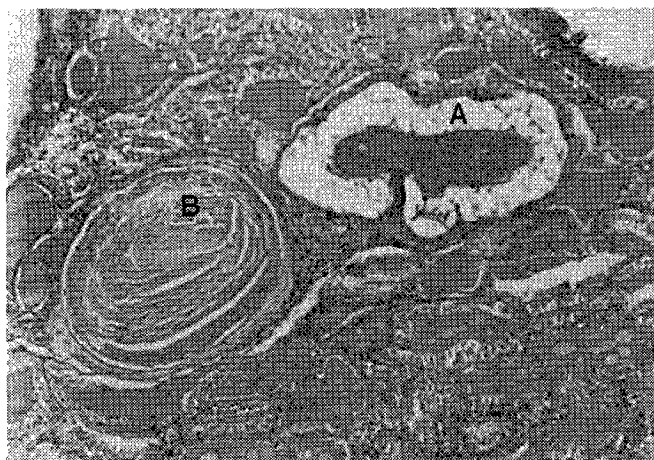


Figure 1 : Parenchymal cyst (A) lined by squamous cells and lumen contain colloid ; ultimobranchial body cyst (B) filled with keratin. Follicles show hyperplastic changes, H. & E. $\times 85$.

pigs. Cattle however seem to be more resistant to the development of congenital goitre and the associated effect of hypothyroidism (2). More work is needed to elucidate these problems.

The gross and microscopic features of colloid and hyperplastic goitre observed in sheep and goats could be compared to two well-known stages in the evolution of the diffuse nontoxic simple goitre in man, the hyperplastic stage and colloid involution. The cysts observed in animals have not been reported in man.

Acknowledgement

Thanks are due to Mrs. Marzie Yusuf Massboogh and Mr. Hamid Zalaki for their technical assistance and to Miss Clara Kapembwa for secretarial help.

References

1. Annual report Pathology laboratory (1986-91). Ahwaz, Iran, University Teaching Hospital Gholeshtan.
2. COTRAN R.S., KUMAR V., ROBBINS S.L., 1994. Robbins Pathologic basis of disease, 5th Ed. London, UK, W.B. Saunders Company, p. 1131.
3. DAVID J.S.E., 1976. The effect of prolonged kale feeding on the thyroid glands of sheep. *J. Comp. Path.*, **86** : 235-241.
4. GOHAIN H.K., ROYCHOUDHURY K., DUTTA P.K., DUTTA B.M., 1977. A clinical note on congenital goitre in kids in the north-Lakhimpur district of Assam. *Indian vet. J.*, **54** : 854-855.
5. KELLY F.C., SNEDDAN W.W., 1960. Endemic goitre. Rome, Italy, FAO, p. 27. (World Health Organisation Monograph Series 44).
6. MASON R., WILKINSON J.S., 1973. The thyroid gland - a Review. *Aust. Vet. J.*, **46** : 44-49.
7. MGONGO F.O.K., GOMBE S., OGAA J.S., 1981. Thyroid status in cobalt and vitamin B₁₂ deficiency in goats. *Vet. Rec.*, **109** : 51-53.
8. NASSERI A.A., PRASAD M.C., IYER P.K.R., 1986. Foetal pathology in experimental hypothyroidism in sheep. *India vet. J.*, **63** : 987-991.
9. PANDEY N.N., PATTABI RAMAN S.R., 1977. Prenatal adenomatous goitre in a goat. *Indian vet. J.*, **54** : 874-875.
10. SINGH K.P., PATHAK K.C., KUMAR H., PARIHAR N.S., 1990. Ultimobranchial cysts in sheep and goats. *Indian J. Anim. Sci.*, **60** (9) : 1083-1084.
11. SRIKUMARAN T., 1976. Pathology of experimental hypothyroidism in goats. M.V.Sc. Thesis (Pathology), Kerala Agric. University Mannuthy, Trichur, India.

SAIYARI (M.), HOSHIAR MANDAVI, MAYAHI (M.), SHARMA (R.N.). Observation de lésions spontanées dans la glande thyroïde de moutons et de chèvres en Iran. *Revue Elev. Méd. vét., Pays trop.*, **48** (3) : 231-232.

Une enquête conduite dans un abattoir à Ahwaz (Iran) a permis de mettre en évidence une incidence des lésions pathologiques dans la glande thyroïde, plus élevée chez les chèvres (6,54 p. 100) que chez les moutons (2,8 p. 100). On a décelé la présence d'un goitre chez 4,99 p. 100 des chèvres abattues et chez 1,96 p. 100 des moutons abattus. Cependant, la fréquence des kystes des corps ultimobranchiaux est trois fois plus élevée chez les moutons que chez les chèvres.

Mots-clés : Caprin - Ovin - Thyroïde - Pathologie - Iran (République islamique d').

Clinico-pathological observations on naturally occurring contagious ecthyma in lambs in Saudi Arabia

A.A. Gameel¹

E.M.E. Abu Elzein²

F.M.T. Housawi²

A. Agib³

A.O. Ibrahim⁴

GAMEEL (A.A.), ABU ELZEIN (E.M.E.), HOUSAWI (F.M.T.), AGIB (A.), IBRAHIM (A.O.). Clinico-pathological observations on naturally occurring contagious ecthyma in lambs in Saudi Arabia. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1995, 48 (3) : 233-235.

Typical lesions of contagious ecthyma were diagnosed in lambs four months old and infection has been confirmed by viral isolation and identification. The lambs had lower total serum protein values, haemoglobin concentration, erythrocyte counts and packed cell volume, but higher blood leukocyte counts and increased serum transaminase activity when compared to apparently healthy animals. The disease is believed to be transmitted from newly introduced goats which showed evidence of infection.

Key words : Sheep - Lamb - Contagious ecthyma virus - Serology - Saudi Arabia.

Introduction

Contagious ecthyma (CE) is a zoonotic viral disease of sheep and goats with world-wide distribution (7). The clinical disease is known to exist in Saudi Arabia but the virus has only been recently identified for the first time from natural outbreaks in sheep and goats (2). The lesions are mainly observed in the lips, nares and oral mucosa, though other sites may be involved (1, 7). The oral lesions may be associated with feeding difficulties, loss of condition and changes in blood values. In the following observation some clinico-pathological features of naturally occurring CE in lambs are presented.

1. Department of Pathology, College of Veterinary Medicine and Animal Resources, King Faisal University, PO Box 1757, Al-Ahsa 31982, Arabie Saoudite.

2. Microbiology and Parasitology, College of Veterinary Medicine and Animal Resources, King Faisal University, PO Box 1757, Al-Ahsa 31982, Arabie Saoudite.

3. Clinical Studies, College of Veterinary Medicine and Animal Resources, King Faisal University, PO Box 1757, Al-Ahsa 31982, Arabie Saoudite.

4. Department of Poultry and Animal Production, College of Agricultural Sciences and Food, King Faisal University, PO Box 1757, Al-Ahsa 31982, Arabie Saoudite.

Reçu le 8.4.1994, accepté le 6.7.1995

* Ames Quik-Lab Chemistry Analyser, Ames Co., England.

Material and Methods

In February 1992 a four-month-old lamb from King Faisal University Farm, Al-Ahsa, Saudi Arabia, was presented for post-mortem examination. Typical lesions of CE were observed in the lips and oral mucosa. The farm was visited and the flock of lambs was carefully examined (84 lambs, 4 months old). The lambs were kept in two separate pens holding equal numbers of animals and were fed on hay supplemented with barley grains; water was provided *ad libitum*. They were vaccinated against clostridial diseases and haemorrhagic septicemia at about two months of age and dipped for ectoparasites 15 days later. The dams were vaccinated against sheep pox and dipped at midterm of gestation. Biopsy and scab materials were collected from animals showing lesions.

Jugular blood was drawn from ten lambs exhibiting visible mouth lesions suggestive of CE and from another ten apparently healthy ones with no lesions for haematological and serum biochemical analysis; the lambs belonged to the Dorper breed. Haemograms were done using conventional standard methods (4) and serum analysis was carried out with the aid of an analyser*.

The biopsy samples were fixed in 10 % formalin, processed in paraffin and sections 4-6 μ thick were prepared and stained with haematoxylin and eosin (H&E).

Scabs were ground to produce a 50 % suspension in sterile Minimum Essential Medium (MEM), pH 7.4. A portion of this suspension was kept at -70°C for the agar gel immunodiffusion test (AGID) and the rest was clarified and treated with antibiotics (8) for virus isolation on primary goat kid kidney (PGKK) cell culture and vero cells. The isolated virus was titrated in PGKK (6). The serum neutralization test (SNT) (11) and the AGID test (10) were used to identify the cell-culture-isolated virus and the virus in the original scab material, respectively, using standard specific rabbit anti orf hyperimmune serum (2).

Results

At clinical examination 23 lambs were found to have coalescing nodular scabby lesions in the lips and ulcerating nodules in the gums and inner lip. They appeared dull with drooping heads and were reluctant to feed. The lambs with lesions were restricted to one pen neighbouring a pen holding goats introduced from the Western Region in January 1992. Some of the goats showed whitish shiny scars in their lips.

The medians and ranges of the haematological values for lambs with and without CE lesions were respectively as follows: haemoglobin (Hb): 9.2 (7.5-10.7), 11.0 (9.4-13) g/dl; erythrocyte counts (RBC): 3.7 (3.0-5.3), 5.0 (3.9-6.5) $\times 10^{12}/\text{l}$; packed cell volume (PCV): 0.31 (0.25-0.35), 0.34 (0.27-0.39) l/l; total blood leukocytes (WBC): 9.3 (3.1-16.7), 7.1 (2.9-10.6) $\times 10^9/\text{l}$; neutrophils: 5.2 (1.7-10.2), 4.2 (1.4-5.8) $\times 10^9/\text{l}$; lymphocytes: 3.4 (1.2-

Communication

5.7), $2.6 (0.9-4.8) \times 10^9/l$; monocytes : $0.48 (0.16-1.01)$, $0.3 (0.08-0.56) \times 10^9/l$; eosinophils : $0.05 (0-0.28)$, $0.01 (0-0.15) \times 10^9/l$. The corresponding values for serum constituents were : total proteins (TP) : $53 (48-62)$, $64 (51-85) g/l$; serum iron (Fe) : $14.7 (9.8-20)$, $16.5 (9.7-25) \mu mol/l$; aspartate aminotransferase (ASAT) : $61 (32-80)$, $33 (18-63) IU/l$; alanine aminotransferase (ALAT) : $50 (30-64)$, $27 (12-54) IU/l$. Non-parametric one-way analysis using SAS software revealed significant differences in the values of RBC, PCV, Hb, TP, ASAT and ALAT.

Histopathological examination of the biopsy specimens revealed the presence of acanthosis and spongiosis in the epidermis associated, in places, with ulceration and formation of multilayers of necrotic debris containing neutrophils and downward growth of basal cells. The dermis was heavily infiltrated with polymorphs and occasionally the boundary with the epidermis was obscured with inflammatory cells (fig. 1, 2).

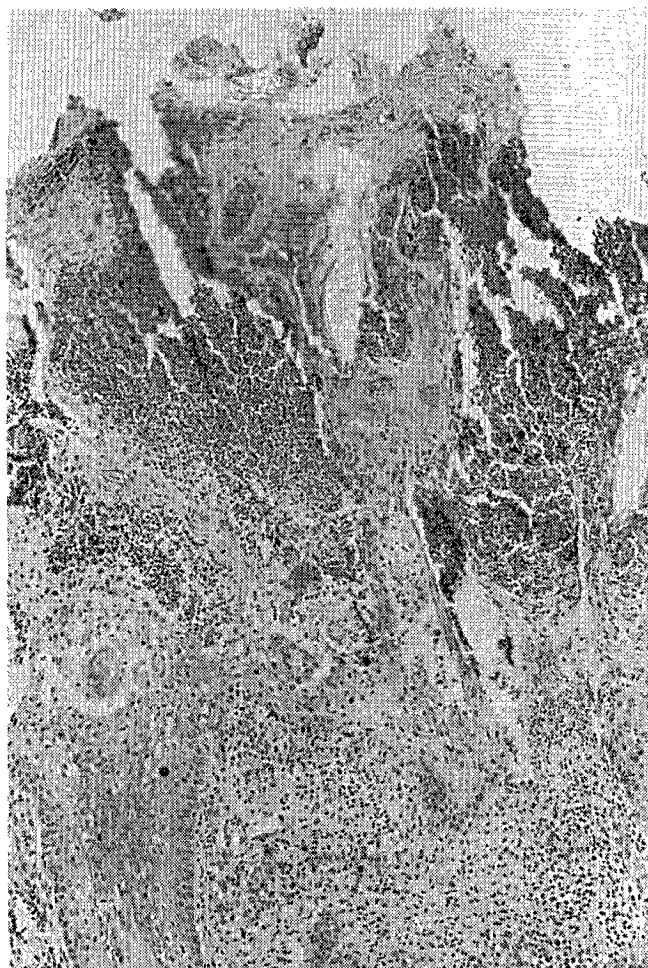


Figure 1 : Necrosis of epidermis with intense infiltration of neutrophils. H&E $\times 70$.

Inoculation of the scab virus homogenate onto both cell culture systems employed produced a cytopathic effect. The virus titre at passage three in PGKK cell culture was $10^{5.8}$ TCID₅₀/ml. A complete precipitation line of identity was formed by the scab virus homogenate and the cell culture concentrated virus isolate against the orf anti-serum in the AGID test. The isolated virus was completely neutralized by the orf hyperimmune serum.

Discussion

The gross and histopathological picture of the oral lesions are typical of CE infection, which has been confirmed by virus identification using standard specific anti orf hyperimmune serum (3, 7). The decreased values of TP, Fe, RBC, Hb and PCV in lambs showing CE lesions suggest the occurrence of anaemia. This could result from the inappetence and feeding difficulties associated with the

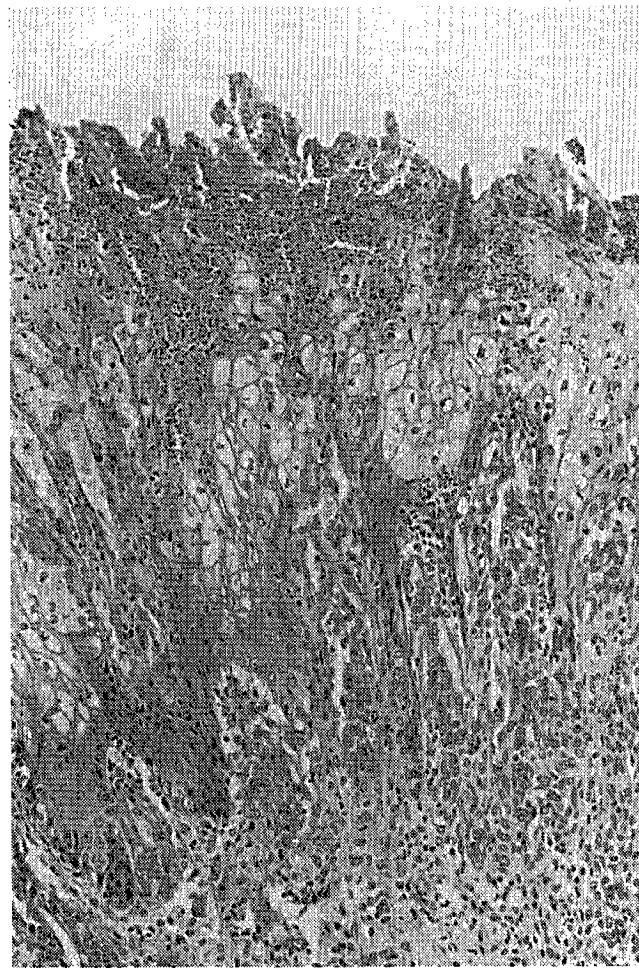


Figure 2 : Epidermis showing acanthosis, spongiosis and downward growth of basal cells. H&E $\times 135$.

oral lesions which constitute a major cause of production losses in infected lambs (2, 5, 7). The peripheral leukocytosis observed was due to an increase in all cell fractions, particularly neutrophils and lymphocytes. The increase in lymphocytes and monocytes could be expected in viral infections, while that in neutrophils may be a response to secondary bacterial complications. The increased activities of the serum transaminases may be attributed to tissue damage caused primarily by CE and probably to other secondary lesions in internal organs (1, 7).

Information on the haematological and serum biochemical changes in CE infection appears to be scanty. The present findings are preliminary observations. Conclusive information can be obtained in future studies by comparing different groups of sick animals with healthy ones or through controlled experimental infections.

Conclusion

This is the first incident of CE in King Faisal University Farm. The source of infection is believed to be the newly introduced goats, which showed evidence of infection, as only the lambs neighbouring the goats were affected. The caprine CE virus can elicit lesions in ovines and vice versa (3, 9). In this respect, the viruses isolated from sheep and goats with the natural disease in Saudi Arabia have been found to be serologically identical (2).

References

1. DARBYSHIRE J.H., 1961. A fatal ulcerative mucosal condition of sheep associated with the virus of contagious pustular dermatitis. *Br. vet. J.*, **117** : 97-105.
 2. HOUSAWI F.M.T., ABU ELZEIN E.M.E., AMIN M., AFALEQ A.I., 1991. Contagious pustular dermatitis (orf) infection in sheep and goats in Saudi Arabia. *Vet. Rec.*, **128** : 550-551.
 3. HOUSAWI F.M.T., ABU ELZEIN E.M.E., GAMEEL A.A., AFALEQ A.I., 1993. A close comparative study on the response of sheep and goats to experimental orf infection. *J. vet. Med. B.*, **40** : 272-282.
 4. JAIN N.C., 1986. *In Schalm's Veterinary Haematology*. 4th Ed., Philadelphia, USA, Lea and Febiger.
 5. MAZUR C., MACHADO R.D., 1989. Detection of contagious pustular dermatitis virus of goats in a severe outbreak. *Vet. Rec.*, **125** : 419-420.
 6. PLOWRIGHT W., WHITCOMB M.A., FERRIS R.D., 1959. Studies with a strain of contagious pustular dermatitis virus in tissue culture. *Arch. ges. Virusforsch.*, **9** : 214-231.
 7. ROBINSON A.J., BALASSU T.C., 1981. Contagious pustular dermatitis (orf). *Vet. Bull.*, **51** : 771-782.
 8. ROMERO-MERCADO C.H., McPHERSON E.A., LAING A.H., LAWSON J.B., SCOTT G.R., 1973. Virus particles and antigens in experimental orf scabs. *Arch. ges. Virusforsch.*, **40** : 152-158.
 9. ROSHDANH I., ZAMRI-SAAD M., AL-AJEELI KARIM S.A., 1992. The pathogenicity of caprine contagious ecthyma virus in sheep. *J. vet. Malaysia*, **4** : 45-49.
 10. SAWHNEY A.N., DUBEY S.C., MALIK B.S., 1973. Diagnosis of contagious pustular dermatitis in sheep and goats by agar-gel precipitation test. *Indian vet. J.*, **50** : 605-607.
 11. TRUEBLOOD M.S., CHOW T.L., GRINER L.A., 1963. An immunologic study of ulcerative dermatitis and contagious ecthyma. *Am. J. vet. Res.*, **24** : 42-46.
- GAMEEL (A.A.), ABU ELZEIN (E.M.E.), HOUSAWI (F.M.T.), AGIB (A.), IBRAHIM (A.O.)**. Observations clinico-pathologiques de l'ecthyma contagieux chez des agneaux infectés naturellement en Arabie Saoudite. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1995, **48** (3) : 233-235.
- Des lésions caractéristiques de l'ecthyma contagieux ont été constatées chez des agneaux âgés de quatre mois. L'infection a été confirmée par isolement et identification du virus. Chez les agneaux, on observe des taux de protéines sériques totales, des concentrations en hémoglobine, un dénombrement d'érythrocytes et un hémocrite plus faibles ; par contre, on note des taux de leucocytes sanguins et de transaminases sériques plus élevés lorsqu'on les compare avec les animaux apparemment en bonne santé. On pense que la maladie est transmise à partir de chèvres infectées nouvellement introduites.
- Mots-clés** : Ovin - Agneau - Virus ecthyma contagieux - Sérologie - Arabie Saoudite.

Évaluation de la protection vaccinale contre la peste bovine au Cameroun

II. La province du Nord

A. Ngangnou¹

N. Zoyem¹

NGANGNOU (A.), ZOYEM (N.). Évaluation de la protection vaccinale contre la peste bovine au Cameroun. II. La province du Nord. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1995, 48 (3) : 236-238.

Le Cameroun participe à la Campagne panafricaine de lutte contre la peste bovine (PARC) depuis 1989 (dans son volet séro-surveillance des anticorps bovipestiques). Durant la campagne de 1992, un protocole d'échantillonnage adapté aux conditions d'élevage dans la province du Nord a été élaboré en conformité avec les recommandations de la PARC. Les quatre départements de la province ont été couverts. Quatorze sites ont été choisis par la technique de l'échantillonnage aléatoire et visités. Huit mille six cent quatre-vingt échantillons de sérums issus de 217 troupeaux ont été prélevés et testés par la technique ELISA compétition développée et adaptée à la peste bovine par le projet conjoint FAO/AIEA. Les résultats obtenus montrent une prévalence générale de 66 p. 100, ce qui est en dessous du seuil requis pour une bonne protection vaccinale du cheptel. Les différences de prévalence entre les tranches d'âge et entre les troupeaux transhumants et nomades sont statistiquement significatives. Ces résultats, bien qu'identiques à ceux observés l'année précédente dans la province de l'Adamaoua (62 p. 100 en 1991), ne reflètent pas la situation sur toute l'étendue du territoire national. Une concertation entre les différents responsables des provinces à forte densité de bovins est recommandée, afin d'adopter les mesures et les stratégies communes de vaccination avec pour objectif principal l'amélioration du niveau de la couverture vaccinale.

Mots-clés : Bovin - Peste bovine - Enquête - Vaccin - Test ELISA - Cameroun.

Introduction

Dans le cadre de la Campagne panafricaine de lutte contre la peste bovine (PARC), le Laboratoire national vétérinaire de Garoua-Boklé a entrepris pour la deuxième année consécutive, une enquête sérologique, en vue d'estimer le taux de protection vaccinale des bovins au Cameroun.

La province du Nord dans laquelle l'enquête a eu lieu en 1992, couvre une superficie de 65 000 km², soit 17,3 p. 100 du territoire national avec 651 200 têtes de bovins, soit 15 p. 100 de l'effectif total (5).

Le cheptel bovin de cette région est composé de taurins (dans le département du Faro), de zébus Bororos (dans les départements de la Bénoué et du Mayo-Rey), de zébus Bokolos (dans le département du Mayo-Rey) et de Goudalis ou zébus Peuhls de petite taille (dans le Mayo-

Rey, en particulier dans les zones voisines de l'Adamaoua) (5).

Matériel et Méthode

Échantillonnage

Dans les 8 sous-secteurs de la province, 14 sites correspondant aux centres zootechniques et vétérinaires ont été choisis par la technique d'échantillonnage aléatoire, à raison de 6 sites par sous-secteur. Dans les sous-secteurs ayant moins de six sites, un coefficient de pondération a été adopté : $N = 0,75 * n$ (N est le nombre de sites à choisir, n le nombre de sites dénombrés) (7).

Dans chaque site, les troupeaux dans lesquels les prélèvements doivent être effectués ont été choisis par randomisation et libellés en deux rubriques : les principaux et les substituts (destinés au remplacement des troupeaux partis en transhumance lors du passage des équipes de prélèvement).

Prélèvements

Quarante prélèvements ont été effectués dans chaque troupeau, répartis de la manière suivante :

- 10 prélèvements sur des sujets âgés de moins d'un an ;
- 10 sur des sujets de un à deux ans ;
- 10 sur des sujets âgés de deux à trois ans ;
- 10 sur des sujets âgés de plus de trois ans.

L'âge est déterminé par l'interrogatoire du propriétaire et l'examen de la dentition. Les tubes sont identifiés par un code spécial défini par la PARC (2) : ce code indique le secteur, le sous-secteur, le site, le propriétaire du troupeau, l'âge et le sexe. Le type d'élevage (sédentaire ou transhumant) a été mentionné sur les fiches épidémiologiques.

Les sérums ont été récoltés 24 à 36 heures après prélèvement, transportés au laboratoire sous glace dans des coffres isothermes et gardés à - 20 °C en attendant d'être testés.

La méthode utilisée est l'ELISA compétition (Enzyme Linked Immuno-Sorbant Assay) développée et adaptée à la peste bovine par le projet conjoint FAO/AIEA. Les sérums sont testés à la dilution de 1/10 (1, 3, 4).

Résultats

La figure 1 montre l'emplacement géographique des 14 sites visités. Les tableaux I, II et III, présentent les résultats obtenus en fonction respectivement du secteur, des tranches d'âge et du mode d'élevage.

1. Laboratoire national vétérinaire (LANAVET), BP 503, Garoua, Cameroun.

Reçu le 18.6.1993, accepté le 7.11.1995.

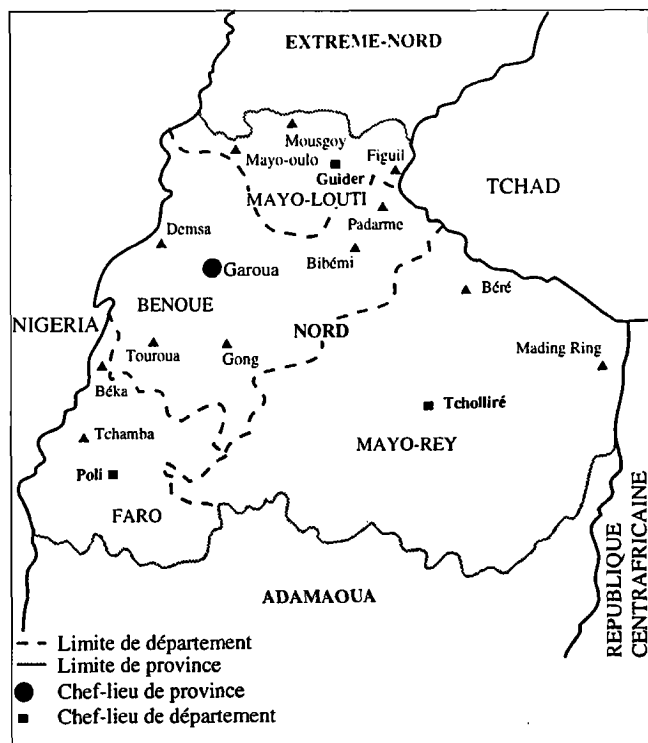


Figure 1 : Province du Nord : sites choisis.

La province

La prévalence globale est de $66 \text{ p. } 100 \pm 1$. Les résultats enregistrés la même année dans les pays voisins sont les suivants : Tchad, $45,3 \text{ p. } 100$; République centrafricaine, $57 \text{ p. } 100$; Nigeria, $52 \text{ p. } 100$ (6).

Les secteurs

Le tableau I montre qu'il existe une différence significative de taux de séro-positivité entre les départements de la Bénoué et du Faro ($\chi^2 = 30,59$; d.d.l = 1 ; $p < 0,05$). Par contre, elle n'est pas significative entre les départements du Mayo-Rey et du Mayo-Louti ($\chi^2 = 3,30$; d.d.l = 1 ; $p > 0,05$).

Les différentes tranches d'âge

Le tableau II montre que le taux de séro-positivité est inférieur à $50 \text{ p. } 100$ chez les sujets âgés de moins d'un an : il s'accroît considérablement entre un et trois ans.

Il existe une différence significative des taux de séro-positivité entre les trois tranches d'âge, 1-2 ans, 2-3 ans, supérieure à 3 ans ($\chi^2 = 85,23$; d.d.l = 2 ; $p < 0,05$) ; il en est de même entre les tranches d'âge de 2-3 ans et supérieures à 3 ans ($\chi^2 = 20,76$; d.d.l = 1 ; $p < 0,05$).

TABLEAU I
Répartition des résultats par secteur

Secteur	Nombre de sérums testés	Pourcentage de positifs (au risque de 5 p. 100)
Bénoué	3 800	$63 \pm 1,5$
Faro	920	$53 \pm 3,2$
Mayo-Louti	1 000	$75 \pm 2,6$
Mayo-Rey	2 880	$72 \pm 1,6$
Total	8 680	66 ± 1

TABLEAU II
Répartition des résultats par tranche d'âge

Classes d'âge	Nombre de sérums testés	Pourcentage de positifs (au risque de 5 p. 100)
0-1 an	2 170	46 ± 2
1-2 ans	2 170	$66 \pm 2,2$
2-3 ans	2 170	$72,5 \pm 2,2$
supérieur à 3 ans	2 170	$78,5 \pm 2,3$
Total	8 680	66 ± 1

TABLEAU III
Répartition des résultats par mode d'élevage

Secteur	Nombre de sérums testés		Pourcentage de positifs (au risque de 5 p. 100)	
	Elevage transhumant	Elevage sédentaire	Elevage transhumant	Elevage sédentaire
Bénoué	2 320	1 560	$44 \pm 1,5$	82 ± 1
Faro	920	0	$53 \pm 3,2$	0
Mayo-Louti	1 000	0	$75 \pm 1,6$	0
Mayo-Rey	600	2 280	70 ± 1	74 ± 1
Total	4 840	3 840	60 ± 1	78 ± 1

Le mode d'élevage

Le tableau III montre que les troupeaux sédentaires sont mieux protégés que les nomades ($\chi^2 = 388,14$; d.d.l = 1 ; $p < 0,05$).

Discussion

La prévalence globale est presque identique à celle enregistrée dans la province de l'Adamoua en 1991 ($62 \text{ p. } 100$) (8).

Communication

Ces résultats sont inquiétants. En effet, en raison des mouvements de transhumance entre les secteurs de la Bénoué et du Faro d'une part (surtout de Gong vers Béka et Tchamba) et d'autre part, entre le Mayo-Louti et le Mayo-Rey, le faible taux d'animaux immuns permettrait à un foyer potentiel de s'étendre rapidement et sur une grande étendue de la région.

Plusieurs raisons peuvent être avancées pour justifier ces résultats :

1. les jeunes de moins d'un an échappent souvent à la vaccination en raison de la transhumance, ce qui a conduit à proposer un élargissement des campagnes de vaccination aux jeunes de moins d'un an (avant et au retour des transhumances, si le coût financier le justifie) (9) ;
2. le manque de moyens financiers en vue du renforcement de la chaîne de froid et de l'achat du matériel de vaccination, à savoir l'acquisition des congélateurs, des glacières, des seringues, des aiguilles, réduit considérablement l'efficacité des campagnes de vaccination ;
3. en l'absence du diluant approprié (le sulfate de magnésium molaire), les vaccins sont le plus souvent reconstitués avec de l'eau de pluie refroidie et réchauffée ;
4. les parcours de vaccination sont souvent vétustes, ce qui ne permet pas une contention adéquate des troupeaux durant les séances de vaccination.

Conclusion

Durant la campagne de séro-surveillance de la peste bovine de 1992 dans la province du Nord, 8 680 sérums ont été prélevés et testés. Les résultats montrent que le seuil de protection immunitaire du cheptel n'est pas encore atteint (68 p. 100 de sérums testés présentent des anticorps bovipestiques). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans la province de l'Adamaoua (62 p. 100, campagne de 1991).

L'obtention de résultats satisfaisants passe par l'instauration d'une politique de concertation entre les responsables des campagnes de vaccination des provinces à forte densité de cheptel bovin, dans le but de redynamiser celles-ci.

Un accent doit être mis sur : la recherche des voies et moyens pour construire les parcs de vaccination (là où il n'y en a pas) et rénover ceux existants ; l'acquisition du matériel de vaccination ; l'observation rigoureuse des règles de conservation et d'administration du vaccin (reconstitution, voie d'inoculation) ; dans l'ignorance de l'immunité des mères et donc de celle récupérée par le veau, il est préférable de vacciner tous les veaux, sans toutefois les marquer à l'oreille : ainsi peut-on espérer rompre le cycle du virus (9).

Remerciements

Ce travail a été financé par le Fonds européen de développement (FED) que nous remercions grandement. Notre gratitude va aussi à la division AIEA/FAO pour la fourniture des trousseaux de recherches d'anticorps bovipestiques. Nous remercions également le Dr Lise Guerre pour son aide lors de la rédaction de manuscrit.

Bibliographie

Sera publiée dans le troisième et dernier article.

NGANGNOU (A.), ZOYEM (N.). Evaluation of the vaccinal protection against rinderpest in Cameroon. II. The North Province. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1995, **48** (3) : 236-238.

Cameroon joined the sero-survey component of the PARC (Pan African Rinderpest Campaign) program in 1989. During the 1992 Campaign, a detailed sampling frame, adapted to the breeding conditions of the North Province was drawn up according to PARC recommendations. The four administrative divisions of the province were covered by sampling cattle in 14 sites chosen by randomisation. Eight thousand six hundred and eighty sera samples from 217 cattle herds were tested using FAO/IAEA rinderpest competitive ELISA technique. The results indicated an overall prevalence of rinderpest virus antibodies (RPVA) of 66 %. This is below the target objective. The differences of prevalence between age groups and breeding systems (sedentary or transhumant) are statistically significant. The same results have been reported in the Adamaoua Province (62 % in 1991 campaign). These results do not reflect the situation in all the country. It is suggested to hold general meeting between different livestock managers from the provinces with high cattle populations to adopt common vaccination measures with the target objective of increasing the level of immunity.

Key words : Cattle - Rinderpest - Survey - Vaccine - ELISA - Cameroon.

A comparative study of the efficiency of a probiotic and the anti-K99 and anti-A14 vaccines in the control of diarrhea in calves in Brazil

F.A. Ávila¹, A.C. Paulillo², R.P. Schocken-Iturrino¹, F.A. Lucas³, A. Orgaz³, J.L. Quintana¹

ÁVILA (F.A.), PAULILLO (A.C.), SCHOCKEN-ITURRINO (R.P.), LUCAS (F.A.), ORGAZ (A.), QUINTANA (J.L.). A comparative study of the efficiency of a probiotic and the anti-K99 and anti-A14 vaccines in the control of diarrhea in calves in Brazil. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1995, 48 (3) : 239-243.

A total of 99 pregnant cows were divided into eight groups submitted to the following treatments : group I (n= 29) consisted of unvaccinated cows whose calves did not receive a probiotic and was used as control. Group II (n = 10) consisted of vaccinated cows whose calves did not receive a probiotic. Groups III, IV and V (n = 10 each) consisted of vaccinated cows whose calves received a probiotic for 5, 15 and 30 days, respectively. Groups VI, VII and VIII (n = 10 each) consisted of unvaccinated cows whose calves received a probiotic for 5, 15 and 30 days, respectively. Each animal in the vaccinated groups received two 5.0 ml vaccine doses containing pili K99 and A14 of *Escherichia coli* by the subcutaneous route. The probiotic containing *Lactobacillus acidophilus* at the dose of 2.0×10^8 live cells in 250 ml milk, was administered orally. All animals were observed clinically and bacteriologically and anti-K99 and anti-A14 antibody titers were determined in serum and colostrum. Mean calf weight was measured at birth and at 30 days of age. The results showed that a combination of the vaccine with the probiotic administered for 15 and 30 days was the most efficient treatment for the control of diarrhea.

Key words : Cattle - Calf - Diarrhoea - *Escherichia coli* - Probiotics - Vaccine - Disease control - Brazil.

INTRODUCTION

Disorders of the digestive tracts have been frequently reported to occur among calves during the first weeks of life. Among the different causes of diarrhea in calves, enterotoxigenic *Escherichia coli* is the most common. The development of diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli* depends on two factors : colonization of the small intestine and production of enterotoxin (9).

Pili K99 (11) and A14 (6) are filamentous appendages of protein constitution that are produced by some bacteria and play an important role in *Escherichia coli* colonization

of the small intestine of calves. The ingestion of colostrum from cows immunized against K99-carrying *Escherichia coli* has been reported to be efficient for the protection of calves against colibacillosis (3). However, the appearance of new adherence antigens (5) has motivated the development of new vaccines potentiated with these antigens.

An important characteristic of the good functioning of the intestinal tract is the equilibrium of its bacterial microflora. This equilibrium is very important but quite difficult to determine. It is mainly harmful to pathogenic microorganisms which are able to multiply rapidly and which often pre-exist in the intestinal flora. This equilibrium may be altered by aggressive phenomena that modify the intestinal secretions and peristalsis (10, 13). In these cases, pathogens such as *Escherichia coli* present in a state of latency may proliferate.

Preparations of live microorganisms such as *Lactobacillus*, called probiotics, are commonly added as a dietary supplement to maintain and stabilize a population of beneficial organisms in the gastrointestinal tract, thus improving cattle growth and the efficiency of food absorption in these animals (12). Thus, the role of a probiotic as a microbial bioregulator is to maintain the equilibrium of the intestinal flora, with the major function of preventing intestinal colonization by pathogenic bacteria such as enterotoxigenic *Escherichia coli* (4).

The objective of the study was to compare the efficiency of a probiotic, vaccination and a combination of the two in the control of enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced diarrhea in calves.

MATERIALS and METHODS

Probiotic

The probiotic used was a *Lactobacillus acidophilus* (LBV-1) strain isolated from the gastrointestinal tract of an adult cow by the method of Wolf *et al.* (14) with the following characteristics : a pathogenicity, lactic acid production and resistance to pH between 4.0 and 3.0.

Probiotic dose

The inoculum contained 2.0×10^8 live *Lactobacillus acidophilus* cells Tournut *et al.* (13) in lyophilized form in 10 g of an inert substance (kaolin) as vehicle.

1. Department of Microbiology, Faculty of Agrarian and Veterinary Sciences, UNESP, Rodovia Carlos Tonanni Km5, Jaboticabal SP, Brésil.

2. Department of Veterinary Pathology, FCAVJ-UNESP, Rodovia Carlos Tonanni Km5, Jacoboticabal SP, Brésil.

3. Etudiants brésiliens en Médecine vétérinaire, FCAVJ-UNESP, Rodovia Carlos Tonanni Km5, Jaboticabal SP, Brésil, boursiers du CNPq et du FAPESP.

Reçu le 28.3.1995, accepté le 30.8.1995.

Probiotic inoculation

The probiotic was administered to each calf by the oral route mixed with 250 ml of milk starting on the first day of life.

Vaccine

Composition

The experimental vaccine was prepared with two *Escherichia coli* strains, K99⁺ Sta⁺ and A14⁺ Sta⁻. Cultures were inactivated with 40% commercial formalin and adsorbed to aluminum hydroxide. The vaccine dose was 5.0 ml and contained 5.0×10^9 bacteria of each *Escherichia coli* strain.

Protocol of vaccination

Each pregnant cow from the vaccinated groups received two vaccine doses of 5.0 ml by the subcutaneous route. The first dose was administered during the 5th or 6th week before parturition and the second three weeks after the first. The animals that were not vaccinated were similarly injected with a 5.0 ml dose of placebo (sterile saline) at the same times as the vaccinated animals.

Animals

The authors used 99 pregnant cows of Pitangueiras breed (milk breed) belonging to the « Três Barras » Farm, municipality of Pitangueiras, SP, Brazil. The animals were divided into eight groups submitted to the following treatments : group I (n = 29) consisted of unvaccinated cows whose calves did not receive a probiotic and was used as control. Group II (n = 10) consisted of vaccinated cows whose calves did not receive a probiotic. Groups III, IV and V (n = 10 each) consisted of vaccinated cows whose calves received a probiotic for 5, 15 and 30 days, respectively. Groups VI, VII and VIII (n = 10 each) consisted of unvaccinated cows whose calves received a probiotic for 5, 15 and 30 days, respectively.

Clinical observation

All passively immunized, probiotic-treated and control calves were examined clinically throughout the experiment for the occurrence of diarrhea and for weight gain. Fecal swabs were obtained from the animals with diarrhea and submitted to bacteriologic examination, and affected animals were treated immediately.

Bacteriology

Isolation and biochemical identification

Fecal samples were inoculated into MacConkey agar and incubated at 37-72° for 24 hours. Typical *Escherichia coli* colonies were identified by the following tests : lactose fermentation, indole production, methyl red and Voges & Proskauer reactions, citrate utilization, urease formation, and H₂S production. Readings were taken after 24 hours of incubation at 37 °C.

Detection of K99 and A14

Anti-K99 and anti-A14 sera were prepared by immunizing rabbits against purified pilus A14 and against strain K12 : K99 cultured at 37 °C, as described by Edwards and Ewing (8). The anti-K12 : K99 serum was absorbed with a homologous strain cultured at 18 °C. The *Escherichia coli* strains employed for the detection of K99 and A14 were cultured on Minca agar at 37 °C for 18 hours and examined by the agglutination test on a slide by the technique of Ávila *et al.* (5).

Detection of Sta enterotoxin

The *Escherichia coli* strains were cultured in brain-heart infusion broth (BHI) on a waterbath under shaking at 150-200 rpm, at 37° for 18 hours and then centrifuged. Evans Blue (2 %) was added to the supernatant of each strain and 0.1 ml of the mixture was inoculated by the intragastric route into 3 mice aged 3 to 4 days. Another mouse of the same age was similarly inoculated with 0.1 ml BHI broth and Evans Blue and maintained as a control according to the technique of Dean *et al.* (7).

Serology

Blood samples were collected from each cow before vaccination or placebo administration and on the day of parturition, when a colostrum sample was also obtained for the determination of the presence of anti-K99 and anti-A14 antibodies. Antibody titers were determined by the agglutination technique using antigens purified by the method of Acres (1). The titer is reported as the reciprocal of the highest serum dilution that showed agglutination.

The *Escherichia coli* strains were identified serologically using OK antisera produced in rabbits by repeated injections of live cultures against the following *Escherichia coli* strains : Myers 483 (O9 : K35 : K99), Myers 490 (O101 : K30 : K99), Myers 505 (O101 : K28 : K99), Myers 524 (O8 : K85 : K99), Myers 559 (O9 : K25 : K99), and Myers Wi-1 (O20 : K ? : K99). Strains were identified by the agglutination test on a slide according to the method of Ávila *et al.*(5).

Statistical analysis

The experiment was carried out using a fully randomized design with controls for each treatment group. The effects of the various treatments were evaluated by analysis of variance for the quantitative characteristics (weight gain), and by the chi-square test for the qualitative characteristic (diarrhea) (2).

RESULTS

Table I shows the number of animals (cows and calves) in each group and the respective numbers of isolations of *Escherichia coli* carrying or not the Sta enterotoxin.

Table II lists the agglutinating antibody titers against antigens K99 and A14 present in the serum and colostrum of the cows in each group. Of the 99 pregnant cows, 28 presented agglutinating titers for pili K99 and A14 in serum before the application of the first dose of vaccine or placebo. These titers ranged from 2 to 4.

The number and percentage of calves with diarrhea in each group are listed in Table III.

TABLE I
Number of calves born and strains of *Escherichia coli* K99⁺ Sta⁺ or A14⁺ Sta⁻ isolated from the feces of calves with diarrhea in each group

Groups	Number of cows	Number of calves born	No. of <i>E. coli</i> strains	
			K99 ⁺ Sta ⁺	A14 ⁺ Sta ⁻
I	29	29	15	05
II	10	10	03	—
III	10	10	02	01
IV	10	10	02	—
V	10	10	01	01
VI	10	10	03	01
VII	10	10	02	01
VIII	10	10	03	—

Table IV shows the mean weight data for the calves in each group at birth and at 30 days of age, as well as the mean weight gains.

TABLE II
Titers of agglutinating antibodies against K99 and A14 present in the serum and colostrum of the cows from each group

Groups	Number of cows	Serum titers against K99		Serum titers against A14		Titers in colostrum	
		before immunization	parturition	before immunization	parturition	K99	A14
		I	29	0-2	0-4	0-4	0-4
II	10	0-2	40-160	0	40-320	80-160	80-640
III	10	0-2	20-160	0-2	80-640	40-160	80-640
IV	10	0	40-160	0	40-320	40-160	80-1 280
V	10	0-2	40-160	0	80-320	80-160	80-640
VI	10	0	0	0	0	0	0
VII	10	0-2	0-4	0-2	0-2	0-4	0-2
VIII	10	0-2	0-2	0	0	0-4	0-2

* No titers.

TABLE III
Number and percentage of calves with diarrhea caused by *Escherichia coli* in each group

Groups	Number of calves born	Cases of calves with diarrhea	
		Number	%
I	29	20	68.9
II	10	03	30.0
III	10	03	30.0
IV	10	02	20.0
V	10	02	20.0
VI	10	04	40.0
VII	10	03	30.0
VIII	10	03	30.0

TABLE IV
Mean weights of the calves in each group at birth and at 30 days of age and respective weight gains

Groups	Number of calves	Mean weight (kg) per age (days)		Mean weight gain (kg)
		01 day	30 days	
I	29	32.3	38.8	6.5 a ¹
II	10	27.7	38.1	10.4 b
III	10	29.6	42.4	12.8 c
IV	10	28.7	43.7	15.0 d
V	10	29.3	43.8	14.5 d
VI	10	32.3	42.0	9.7 b
VII	10	29.1	41.6	12.5 c
VIII	10	30.7	41.2	10.5 c

1. Equal letters in the column not indicate significant difference ($p > 0,01$).

The percentage, number and serotypes of *Escherichia coli* isolated from the feces of calves with diarrhea in each group are listed in Table V.

TABLE V
Percentage, number and serotypes of *E. coli* isolated from the feces of calves with diarrhea in each group

Groups	Number of calves born	Percentage of isolation	Number of serotypes	Serotypes isolated
I	29	68.9	08 03 02 02 05	O8 : K85 : K99 O8 : K25 : K99 O8 : K35 : K99 O101 : K30 : K99 O ? : K ? : A14
II	10	30.0	02 01	O8 : K85 : K99 O101 : K30 : K99
III	10	30.0	01 01 01	O9 : K35 : K99 O8 : K25 : K99 O ? : K ? : A14
IV	10	20.0	01 01	O8 : K85 : K99 O101 : K30 : K99
V	10	20.0	01 01	O101 : K30 : K99 O ? : K ? : A14
VI	10	40.0	02 01 01	O8 : K85 : K99 O101 : K30 : K99 O ? : K ? : A14
VII	10	30.0	02 01	O8 : K85 : K99 O ? : K ? : A14
VIII	10	30.0	01 02	O8 : K25 : K99 O101 : K30 : K99

DISCUSSION

On the basis of the results of the agglutination test on a slide against the two adherence antigens (Table I), it can be seen that of the *Escherichia coli* strains isolated from calves with diarrhea, 31 (31.3 %) produced pilus K99, and 9 (9.1 %) produced pilus A14. The Dean test showed that all K99⁺ strains were Sta⁺, whereas the A14⁺ strains were Sta⁻.

Table II presents the values of the agglutinating antibody titers against antigens K99 and A14 present in the serum and colostrum of all cows. Agglutinating titers ranging from 2 to 4 were detected in the serum of 24 cows before

immunization or placebo for both pili. The antibody titers present in the blood sera of control cows and of unvaccinated cows whose calves received a probiotic presented incipient elevation in colostrum. No animal presented an agglutinating titer for the two antigens before immunization in group IV. Group II animals did not present antibodies against pilus A14 before vaccination. No animal in group VI presented an agglutinating titer in serum or colostrum against the two adherence antigens before the application of the first dose of placebo or at the time of parturition. Significant increases were detected in the serum titers of the cows after vaccination. These increases were also observed in antibody titers in the colostrum of vaccinated cows and especially against antigen A14. These facts agree with data reported by Ávila *et al.* (3) with respect to postvaccinal antibody transfer from serum to colostrum and from colostrum to the calves.

The largest percentage of calves with diarrhea was 68.9% and occurred in group I whose cows were not vaccinated and whose calves did not receive a probiotic. Statistical analysis by the chi-square test showed significant differences ($p < 0.05$) between this group (control) and the treated groups (Table III).

Analysis of variance showed significant differences ($p < 0.01$) between treatments with respect to weight gain (Table IV). The least significant difference was 2.7 kg and the treatments that proved to be most efficient were those for groups IV and V, whose cows were vaccinated and whose calves received a probiotic for 15 and 30 days, respectively. Group III whose cows were vaccinated and whose calves received a probiotic for 5 days and groups VII and VIII whose calves received a probiotic for 15 and 30 days, respectively, showed equivalent efficiency, although they were not as good as groups IV and V whose cows were vaccinated and whose calves received a probiotic for 15 and 30 days, respectively. Group II whose cows were vaccinated and whose calves received no probiotic, and group VI whose cows were not vaccinated and whose calves received a probiotic for 5 days were not as efficient as the previous groups.

Three serotypes bearing the K99 pilus were isolated and belonged to serogroups O8, O9 and O101 (Table V). The serotypes bearing pilus A14 were not classified. In animals that received a probiotic and that presented diarrhea, the presence of *Escherichia coli* in the feces was predominant and isolation of *Lactobacillus* was difficult. However, in the animals without diarrhea, the presence of *Lactobacillus* seemed to predominate in feces, facilitating the isolation of this bacterium. This observation has also been reported by Savage (10) and Tournut *et al.* (13). These facts seem to confirm the function of the probiotic reported by Tournut *et al.* (13), i.e., preventing intestinal colonization by enterotoxigenic *Escherichia coli* (4). However, more specific studies are needed, also including other animal species.

References

1. ACRES S.D., ISAACSON R.E., BABIUX L.A., 1979. Immunization of calves against enterotoxigenic colibacillosis by vaccinating dams with purified k99 antigen and whole cell bacterins. *Infect. Immun.*, **25** : 121-126.
2. ANDERSON S., 1980. Statistical methods for comparative studies. Toronto, Canada, Wiley & Sons, 287 p.
3. ÁVILA F.A., SCHOCKEN-ITURRINO R.P., ÁVILA S.H.P., QUINTANA J.L., 1986. Evaluation of the immunizing efficiency of a pili k99-bearing vaccine for the protection of cattle against colibacillosis. *ARS Veterinaria*, **2** (2) : 217-220.
4. ÁVILA F. A., FAIRBROTHER J. M., LALLIER R., KANETO C. N., SCHOCKEN-ITURRINO R.P., 1987. Characterization of *Escherichia coli* strain isolated from diarrheic *Bos indicus* (Zebu) in the State of São Paulo, Brazil. In : Abstracts XXIIIth World Veterinary Congress, Montréal, Canada, Aug. 16-21, 1987, p. 7-5.
5. ÁVILA F.A., SCHOCKEN-ITURRINO R.P., LALLIER R., ÁVILA S.H.P., QUINTANA J.L., 1988. *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in the northern region of state of São Paulo, Brazil. *ARS Veterinaria*, **4** (2) : 285-289.
6. ÁVILA F.A., SCHOCKEN-ITURRINO R.P., LALLIER R., FAIRBROTHER J.M. JACQUES M., 1988. A new fimbrial antigen on *Escherichia coli* strain isolated from zebu (*Bos indicus*) calves with diarrhoea in Brazil. *Vet. Rec.*, **123** : 80-81.
7. DEAN A.G., CHING Y.C., WILLIAMS R.G., HARDEN L.B., 1972. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice : application in a study of diarrhoea in children in Honolulu. *J. infect. Dis.*, **125** (4) : 407-411.
8. EDWARDS S., EWING W.H., 1972. Identification of enterobacterial. Minneapolis, USA, Burgess Publishing Co.
9. HADAD J.J., GYLES C.L., 1982. Scanning and transmission electron microscopic study of the small intestine of colostrum-fed calves infected with strains of *Escherichia coli*. *Am. J. vet. Res.*, **43** (1) : 41-49.
10. SAVAGE D.C., 1980. Adherence of normal flora to mucosal surfaces. In : Beachy E.H., ed., Bacterial adherence. London, U.K., Chapman & Hall, Ltd., p. 33-59.
11. SMITH H.W., LINGGOOD M.A., 1972. Further observation on *Escherichia coli* enterotoxins with particular regard to those produced by atypical piglet strains and calf and lamb strains : the transmissible nature of their enterotoxins and of a k antigen possessed by calf and lab strains. *J. Med. Microbiol.*, **5** : 243-250.
12. TANNOCK G.W., 1984. In : Klug M.J., Reddy C.A., eds, Current perspectives Microbial Ecology. Washington, D.C., USA, American Society for Microbiology, p. 374.
13. TOURNUT J., ANADON A., RAYNAUD J.P., 1988. Prevention of enteritis in calves with probiotics/microbial bioregulators. Rationale and targets. In : XV Congreso Mundial de Buiatria, Palma de Mallorca, España, p. 390-394.
14. WOLF P.L., RUSSEL B., SHIMODA A., 1975. Practical clinical microbiology and micology, Techniques and Interpretations. Toronto, Canada, John Wiley & Sons, p. 551.

ÁVILA (F.A.), PAULILLO (A.C.), SCHOCKEN-ITURRINO (R.P.), LUCAS (F.A.), ORGAZ (A.), QUINTANA (J.L.). Etude comparative de l'efficacité d'un probiotique et de vaccins anti-K99 et anti-A14 pour la prophylaxie de la diarrhée chez les veaux au Brésil. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1995, **48** (3) : 239-243.

Quatre-vingt-dix-neuf vaches gestantes ont été réparties en huit groupes et soumises au traitement suivant : le groupe I (29 sujets) comprenait des vaches non vaccinées dont les veaux n'avaient pas reçu de probiotique et servait de témoin. Le groupe II (10 sujets) se composait de vaches vaccinées dont les veaux n'avaient pas reçu de probiotique. Les groupes III, IV et V (10 sujets chacun) se composaient de vaches vaccinées dont les veaux avaient reçu un probiotique pendant 5, 15 et 30 jours respectivement. Les groupes VI, VII et VIII (10 sujets chacun) étaient constitués de vaches non vaccinées dont les veaux avaient reçu un probiotique pendant 5, 15 et 30 jours respectivement. Chaque animal appartenant aux groupes vaccinés a reçu deux doses vaccinales de 5,0 ml contenant des pili K99 et A14 d'*Escherichia coli*, administrées par voie sous-cutanée. Le probiotique qui renfermait du *Lactobacillus acidophilus* à la dose de $2,0 \times 10^8$ cellules vivantes dans 250 ml de lait, a été administré par voie orale. Tous les animaux ont été soumis à une observation clinique et bactériologique, et les titres d'anticorps anti-K99 et anti-A14 ont été déterminés dans le sérum et dans le colostrum. Le poids moyen des veaux a été contrôlé à la naissance, puis à l'âge de trente jours. Les résultats montrent que la combinaison du vaccin avec le probiotique administré pendant 15 et 30 jours a constitué le traitement le plus efficace pour contrôler la diarrhée.

Mots-clés : Bovin - Veau - Diarrhée - *Escherichia coli* - Probiotique - Vaccin - Contrôle des maladies - Brésil.

ÁVILA (F.A.), PAULILLO (A.C.), SCHOCKEN-ITURRINO (R.P.), LUCAS (F.A.), ORGAZ (A.), QUINTANA (J.L.). Estudio comparativo de la eficiencia de un probiótico y de vacunas anti-K99 y anti-A14 para el control de la diarrea en terneros en Brasil. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1995, **48** (3) : 239-243.

Un total de 99 vacas preñadas se dividió en ocho grupos, sometidos a los siguientes tratamientos : grupo I (n = 29) vacas no vacunadas cuyos terneros no recibieron probiótico y fueron utilizados como controles ; grupo II (n = 10) vacas vacunadas cuyos terneros no recibieron probiótico ; grupos III, IV y V (n = 10 en cada caso) vacas vacunadas cuyos terneros recibieron probiótico durante 5, 15 y 30 días respectivamente ; grupos VI, VII y VIII (n = 10 en cada caso) vacas no vacunadas cuyos terneros recibieron probiótico durante 5, 15 y 30 días respectivamente. Cada animal en los grupos vacunados recibió dos dosis subcutáneas de 5,0 ml de vacuna conteniendo cilios de K99 y de A14 de *Escherichia coli*. El probiótico conteniendo *Lactobacillus acidophilus* a dosis de $2,0 \times 10^8$ células vivas en 250 ml de leche se administró vía oral. Todos los animales se siguieron clínica y bacteriológicamente, determinándose los títulos de anticuerpos anti K99 y anti A14 en suero y calostro. El peso promedio de los terneros se obtuvo al nacimiento y a los 30 días de edad. Los resultados demuestran que una combinación de la vacuna con el probiótico administrada durante 15 y 30 días es el tratamiento más eficaz para el control de la diarrea.

Palabras clave : Bovino - Ternero - Diarrea - *Escherichia coli* - Probiótico - Vacuna - Control des enfermedades - Brasil.

Communication

Diagnostic de *Babesia bigemina* avec le test à l'immunoperoxydase

T. Blandino¹

M. Barrera¹

M. Alonso¹

M. Faure¹

J.G. Rodriguez Diego¹

BLANDINO (T.), BARRERA (M.), ALONSO (M.), FAURE (M.), RODRIGUEZ DIEGO (J.G.). Diagnostic de *Babesia bigemina* avec le test à l'immunoperoxydase. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1995, **48** (3) : 244-246.

Une méthode de diagnostic sérologique de *Babesia bigemina* par l'immunoperoxydase a été mise au point ; des lames d'antigène ont été réalisées à partir de sang parasité par *B. bigemina* et conservées à -20 °C. Cent soixante-cinq sérums ont été testés en comparant le test à l'immunoperoxydase à l'immunofluorescence indirecte. Une coïncidence de 95 p. 100 a été observée entre les deux tests, ainsi qu'une spécificité relative de 95,5 p. 100 et une sensibilité relative de 94,8 p. 100 pour le test à l'immunoperoxydase, avec une valeur prédictive positive de 96,8 p. 100. Les résultats démontrent l'efficacité de ce test pour détecter les anticorps contre *B. bigemina*.

Mots-clés : Bovin - *Babesia bigemina* - Diagnostic - Cuba.

Introduction

A Cuba, la babésiose bovine due à *Babesia bovis* et à *B. bigemina*, est une des principales causes de mortalité chez les bovins adultes. Le diagnostic est réalisé par l'observation des parasites sur des frottis de sang. Cependant, lors d'infections chroniques la parasitémie est si basse que l'examen de frottis est peu efficace. Par contre, les tests sérologiques permettent de détecter les anticorps.

Le test d'immunofluorescence indirecte (IFI) est un test sérologique très sensible pour le diagnostic de *B. bigemina* (7) mais il pose des problèmes de spécificité et de subjectivité dans l'interprétation des résultats (3). Des tests ELISA sur lame (2, 4) ont été mis au point pour *Babesia bovis*, montrant une bonne efficacité et une facilité d'exécution. Le présent travail présente la mise au point du test à l'immunoperoxydase (IP) pour détecter les anticorps contre *B. bigemina*.

1. Laboratorio de Parasitología, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Apdo 10, San José de las Lajas, La Havane, Cuba.

Reçu le 19.4.1993, accepté le 8.11.1995.

Matériel et Méthodes

Préparation de l'antigène

La méthode a été décrite par Alonso *et al.* (1). Du sang infecté avec une parasitémie d'environ 4,3 p. 100 est lavé 4 fois avec du PBS. Les globules rouges sont dilués pour donner une dilution finale de 30 p. 100 de globules rouges dans du PBS avec 3,5 p. 100 d'alumine bovine.

Les lames sont frottées rapidement avec du PBS + 3,5 p. 100 d'albumine bovine pour faciliter l'étalement des globules rouges infectés. Les globules rouges sont étalés grâce à une centrifugeuse avec porte-lames à 2 000 t/min pendant 20 secondes pour obtenir un étalement homogène. Les lames sont séchées 3 à 5 minutes à 56 °C, puis enveloppées et conservées à -20 °C.

Sérums

Cent soixante-cinq sérums ont été comparés par le test à l'IP et par l'IFI :

- 27 témoins : 8 positifs vis-à-vis de *B. bigemina*, obtenus d'animaux infectés expérimentalement ; 8 négatifs provenant de veaux splénectomisés qui n'ont pas développé de parasitémie ; 11 séropositifs vis-à-vis d'autres hémoparasites (*Theileria* sp., *Anaplasma* sp., *B. bovis*) ;
- 138 provenant de fermes où la babésiose a été diagnostiquée sur des frottis.

Congugués

Pour le test IP, une immunoglobuline anti-IgG bovine obtenue sur lapin et conjuguée à la peroxydase a été utilisée à une dilution de 1 : 500, et pour l'IFI, une immunoglobuline anti-IgG bovine conjuguée à l'isothiocyanate de fluorescéine diluée à 1 : 400 a été utilisée.

Substrats

Pour le test IP, les substrats étaient la 3-3 diaminobenzidine et le 4 chloro 1 naphthol.

Réalisation du test IP

Chaque lame d'antigène a été divisée en 12 compartiments avec un crayon marqueur et, dans chaque compartiment a été placé un papier filtre rond imprégné de sérum dilué. Les sérums témoins sont dilués au 1/100, 1/200, 1/400 et 1/800. Les sérums sont incubés à 37 °C pendant 30 min. Les lames sont lavées 3 fois avec du PBS et le conjugué ajouté en deux dilutions au 1/250 et 1/500. Une nouvelle incubation à 37 °C se déroule en 2 temps différents pour déterminer quel est le meilleur (30

et 45 min). Après un nouveau lavage avec le PBS, 2 substrats sont comparés (la diaminobenzidine et le 4 chloro 1 naphтол), avec une incubation de 30 min à 37 °C et à température ambiante. La réaction est stoppée par un lavage à l'eau distillée, les lames montées avec de la glycérine tamponnée puis examinées avec un microscope optique équipé d'un objectif 100 × à immersion.

Test IFI

C'est un test classique où les sérums sont dilués au 1/100 et le conjugué au 1/400.

Reproductibilité du test IP

Le test a été répété 5 fois avec les sérums témoins.

Sensibilité, spécificité et valeur prédictive

Ces valeurs ont été calculées en comparant les deux tests et en utilisant la formule établie pour la validation des tests diagnostiques (6).

Résultats

Pour standardiser le test IP, les meilleurs résultats furent obtenus avec une dilution du sérum au 1/200 et un temps d'incubation de 30 minutes, et une dilution du conjugué au 1/500 et un temps d'incubation de 45 minutes. Le substrat 4 chloro 1 naphтол a permis une meilleure différenciation des sérums positifs et négatifs après 30 minutes d'incubation à température ambiante.

La réaction positive était mise en évidence par une coloration bleu-violet des parasites et parfois de la membrane de l'érythrocyte qui contient un parasite, alors que rien n'est coloré dans la réaction négative.

Le test IP ne réagit ni avec *B. bovis*, ni avec *Theileria* sp., ni avec *Anaplasma* sp. (tab. I). Les 5 répétitions du test ont donné les mêmes résultats dans la détection des sérums témoins positifs et négatifs.

Pour les 165 sérums analysés avec les deux tests, 95 p. 100 des résultats coïncidèrent. Pour le test IP, une sensibilité relative de 94,8 p. 100 et une spécificité relative de 95,5 p. 100 furent calculées ainsi qu'une valeur prédictive positive de 96,8 p. 100 et une valeur prédictive négative de 97 p. 100 (tab. II).

Discussion

Le test IP apparaît spécifique de *B. bigemina* et donne des résultats comparables à ceux obtenus avec l'IFI sans nécessiter un microscope à immunofluorescence. Le

TABLEAU I
Résultats du test IP appliqué à des sérums témoins positifs et négatifs

Sérums témoins	Nombre de sérums	Positifs	Négatifs
Parasite			
<i>B. bigemina</i>	8	8	0
<i>B. bovis</i>	4	0	4
<i>Theileria</i> sp.	2	0	2
<i>Anaplasma</i> sp.	5	0	5
Négatifs	8	0	8

TABLEAU II
Comparaison des tests à l'immunoperoxydase et à immunofluorescence indirecte pour diagnostiquer *Babesia bigemina*

	IFI		Total
	+	-	
IP	+ 92 - 5	3 65	95 70
Total	97	68	165

Sensibilité relative = 92/97 = 94,8 p. 100.
Spécificité relative = 65/68 = 95,6 p. 100.
Valeur prédictive positive = 92/95 = 96,8 p. 100.
Valeur prédictive négative = 65/70 = 92,9 p. 100.

tableau I présente une bonne reproductibilité de l'IP qui a démontré son efficacité dans la détection des anticorps anti-*B. bigemina*, confirmant les résultats obtenus avec les tests destinés à *Plasmodium falciparum* (5) et à *B. bovis* (2).

Conclusion

Le test IP peut être recommandé pour le diagnostic sérologique de *B. bigemina*, car il présente de bonnes sensibilité et spécificité, ainsi que l'avantage d'être facile à réaliser avec un simple microscope optique.

Remerciements

Nous remercions le Dr Emmanuel Camus, CIRAD-EMVT, Guadeloupe, pour sa traduction et ses corrections.

Bibliographie

- ALONSO M., BLANDINO T., LARRAMENDI R., JIMENEZ T., MESA J., 1988. Immunofluorescencia indirecta en el diagnostico de la babesiosis bovina en Cuba. *Revta Salud Anim.*, 10 : 197-203.

Communication

2. BLANDINO T., BARRERA M., ALONSO M., 1991. Prueba de inmunoperoxidasa para el diagnostico de *B. bovis*. In : IV Congreso Internacional de Malaria y Babesiosis, Rio de Janeiro, Brasil, 1991.
3. GOFF W.L., PALMER G.H., MC ELWAIN T.F., DAVIS W.C., MC GUIRE T.C., 1989. Development of ELISA diagnostic test for *Babesia* infections, using highly immunogenic species specific and strain-common glycoproteins. In : Proc. 8th Natl Vet. Hemoparasites Disease Conference, St Louis, MO, USA, 1989, p. 353-376.
4. KUNG U.M.W., GOODGER B.V., 1990. A Slide Enzyme Linked Immunosorbent Assay (SELISA) for the diagnostic of *Babesia bovis* infections and for the screening of *Babesia*-specific monoclonal antibodies. *Int. J. Parasitol.*, **20** : 341-345.
5. LIM T.S., 1988. A sensitive malaria immunoperoxidase assay for the detection of *Plasmodium falciparum* antibody. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, **38** : 255-257.
6. LOPEZ N.A., SCARLETT J.M., PALLOCK R.V.H., JACOBSON R.H., 1990. Sensitivity, specificity and predictive values of clinease virastat saliva test for feline leukemia virus infection. *Cornell vet.*, **80** : 75-80.
7. ROSS J.P.J., LOHR K.F., 1967. Serological diagnosis of *Babesia bigemina* infection in cattle by the indirect fluorescent antibody test. *Res. vet. Sci.*, **2** : 551-562.

BLANDINO (T.), BARRERA (M.), ALONSO (M.), FAURE (M.), RODRIGUEZ DIEGO (J.G.): Diagnosis of *Babesia bigemina* with the immunoperoxidase assay. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, **48** (3) : 244-246.

An immunoperoxidase assay for the serological diagnosis of *Babesia bigemina* was developed. The antigen slides were prepared from *B. bigemina*-infected blood and stored at -20°C . One hundred and sixty five sera were tested, comparing the immunoperoxidase assay to the indirect fluorescent antibody test. A coincidence of 95 % was observed between both tests. For the immunoperoxidase assay, a relative sensitivity of 94.8 %, a relative specificity of 95.5 %, and a positive predictive value of 96.8 % were calculated. The results demonstrated the efficacy of this technique for detecting antibodies to *B. bigemina*.

Key words : Cattle - *Babesia bigemina* - Diagnosis - Cuba.

Comparaison de la sensibilité du test de Woo et d'un test de détection des antigènes de *Trypanosoma vivax* chez deux moutons expérimentalement infectés avec une souche guyanaise du parasite

M. Desquesnes¹, S. de La Rocque^{1*}

DESQUESNES (M.), LA ROCQUE (S. de). Comparaison de la sensibilité du test de Woo et d'un test de détection des antigènes de *Trypanosoma vivax* chez deux moutons expérimentalement infectés avec une souche guyanaise du parasite. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1995, **48** (3) : 247-253.

Un ELISA de détection des antigènes circulants de *Trypanosoma vivax*, par immunocapture à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique, a été mis au point par Nantulya et Lindqvist en 1989 : sur les souches africaines testées sa sensibilité s'est avérée très élevée. Avec des réactifs fournis par l'IRLI, la sensibilité de cette méthode a été comparée à celle du test de Woo lors d'infections expérimentales de deux moutons avec une souche guyanaise de *T. vivax*. Des tests, réalisés en aveugle au CIRDES et à l'ILRI, ont permis de confirmer les résultats obtenus en Guyane française. Les animaux ont été régulièrement prélevés pendant les 130 et 285 premiers jours d'infection. Quelle que soit la période d'infection, que la parasitémie fût détectable ou non, la sensibilité du test ELISA a été très basse : en moyenne 2,1 p. 100 de résultats positifs, de loin inférieure à celle de la technique de Woo : 54 p. 100 de résultats positifs. L'association des deux techniques n'apporte aucune sensibilité supplémentaire. Les densités optiques moyennes enregistrées au cours de ces longues périodes d'infections, $0,010 \pm 0,004$ et $0,012 \pm 0,002$, sont si proches du seuil de sensibilité des lecteurs ELISA qu'elles ne peuvent être proposées comme seuil de positivité du test, pour en améliorer la sensibilité. Une étude complémentaire de la sensibilité de ce test est en cours à l'ILRI. Déjà observé au Burkina Faso et en Gambie, ce défaut de sensibilité risque d'affecter fortement les résultats des enquêtes épidémiologiques entreprises avec ces réactifs en Afrique. Il est nécessaire de développer de nouveaux anticorps monoclonaux afin de mettre au point un test de détection des antigènes de *T. vivax* dont la sensibilité soit plus satisfaisante.

Mots-clés : Ovin - *Trypanosoma vivax* - Infection expérimentale - Test ELISA - Antigène - Anticorps - Sérologie - Guyane française.

INTRODUCTION

Pour la détection des infections du bétail par *Trypanosoma vivax*, le diagnostic parasitologique est peu sensible car les parasitémies sont souvent trop basses. L'observation de l'interface sang/plasma en tube capillaire, ou test de Woo (14), est souvent utilisée comme référence pour évaluer la sensibilité de nouvelles techniques de diagnostic des infections actives par les trypanosomes.

1. CIRAD-EMVT-Guyane, Institut Pasteur, BP 6010, 97306 Cayenne, Guyane, France.

* Adresse actuelle : CIRDES, 01 BP 454, Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso.

Reçu le 2.11.1993, accepté le 5.12.1995.

Un ELISA pour la détection des antigènes circulants de *Trypanosoma vivax* par immunocapture a été mis au point à partir d'une souche africaine du parasite, par Nantulya (9, 10), Nantulya et Lindqvist (11), Nantulya et al. (12) à l'ILRI* (anciennement ILRAD**). Ce test est actuellement en cours d'évaluation par la division conjointe FAO/IAEA à Vienne. Les réactifs utilisés dans cette expérimentation ont été fournis gracieusement par l'ILRI au CIRDES*** (anciennement CRTA****) et au CIRAD-EMVT en Guyane française. Une souche de *Trypanosoma vivax* a été isolée en Guyane française, par Lancelot en 1988 (7).

Dans la présente étude, pour comparer la sensibilité du test de Woo et de cet ELISA, la souche guyanaise a été inoculée expérimentalement à 2 moutons, régulièrement prélevés pendant 4,5 et 9,5 mois. Les tests parasitologiques et sérologiques ont été réalisés au laboratoire du CIRAD-EMVT en Guyane française. Pour confirmer ces résultats, un échantillonnage de sérums a également été transporté à l'ILRI et au CIRDES afin d'effectuer une partie des tests en aveugle.

MATÉRIEL et MÉTHODES

Matériel

Animaux

Deux animaux âgés de 2 ans, un mâle (mouton 1) et une femelle gestante (mouton 2), issus de croisements Blackbelly × Créole, ont été placés dans des bergeries protégées par des moustiquaires afin d'éviter toute dissémination des parasites et toute contamination exogène. Les animaux sont nourris à base de foin (*Brachiaria decumbens*) et de complément alimentaire commercial.

Pour s'assurer que les animaux n'étaient pas infectés au préalable, les tests suivants ont été réalisés : test de Woo (14) et Murray et al. (8), examens de frottis san-

* International Livestock Research Institute, Nairobi, Kenya.

** International Laboratory for Research on Animal Diseases, Nairobi, Kenya.

*** Centre International de recherche-développement sur l'élevage en zone sub-humide, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

**** Centre de recherche sur les trypanosomes animales, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

On citera tout au long de l'article les noms des nouveaux centres (ILRI pour ILRAD, CIRDES pour CRTA).

guins colorés, détection des antigènes de *Trypanosoma vivax*, *T. brucei* et *T. congolense* par ELISA (11) et détection des anticorps dirigés contre *Trypanosoma* spp. par la méthode ELISA de Ferenc *et al.* (4).

Souche de *T. vivax* Guyane

La souche de *T. vivax* utilisée a été isolée à partir d'un zébu, cultivée sur veau Frison (un passage) et sur mouton Créole (un passage), avant d'être stockée en azote liquide (7). Un stabilat de 1,5 ml, préparé en 1989, a été inoculé au mouton 1. Il était pauvre en parasites, environ 10^3 par ml. Lors d'un pic parasitémiq ue chez cet animal, du sang frais parasité a été utilisé pour infecter le mouton 2.

ELISA par immunocapture

Le test de détection des antigènes de *T. vivax* repose sur un anticorps monoclonal obtenu à partir de formes procycliques d'un parasite africain (12). L'antigène reconnu présentant plusieurs épitopes identiques, l'anticorps monoclonal est utilisé à la fois pour la sensibilisation de la plaque et pour la révélation des antigènes (conjugaison du monoclonal à une peroxydase).

Dans cette expérience, deux types de plaques ELISA sont utilisées. Les tests sont réalisés en Guyane française avec les plaques de microtitration MAXISORP NUNCND, tandis que des plaques IMMULON B DYNATECHND sont utilisées au CIRDES et à ILRI. La comparaison ayant été faite antérieurement, il n'est pas attendu de différence importante entre ces deux types de plaques (G. Duvallat, communication personnelle).

Méthode

Infections expérimentales

Le stabilat est ramené à température ambiante par un bref séjour à 37 °C, il est vérifié que les parasites sont vivants avant inoculation. L'inoculation des parasites a été faite à la veine jugulaire des moutons à J0 :

- environ 1 500 parasites pour le mouton 1 ;
- environ $1,5 \times 10^6$ pour le mouton 2.

Traitements

Les animaux ont été traités à l'acéturate de diminazène (BerenilND) à la dose de 3,5 mg/kg par voie intra-musculaire (IM) lorsque la parasitémie dépassait 10^7 /ml, afin de pouvoir évaluer la persistance des antigènes dans la circulation sanguine après la mort des parasites, comme indiqué par Nantulya et Lindqvist (11). Avec cette souche

de parasites, on savait qu'à la dose de 3,5 mg/kg d'acéturate de diminazène la chute brutale de la parasitémie serait réversible, et qu'en conséquence, l'infection persisterait (2).

Les traitements successifs à l'acéturate de diminazène favorisant le contrôle de la parasitémie, on a tenté d'induire une période a parasitémiq ue en traitant à nouveau le mouton 1 au 130^e jour d'infection, bien que la parasitémie n'atteignit pas 10^7 .

Collecte des échantillons

Dans la mesure du possible, les animaux sont prélevés quotidiennement. Le sang est collecté sur vacutainers héparinés pour les examens parasitologiques, sur tubes secs pour la sérologie. Les examens parasitologiques sont effectués dans les minutes qui suivent la collecte. Le sérum est récolté 6 heures après le prélèvement (centrifugation 430 g pendant 10 minutes), puis conservé à - 20 °C, jusqu'à la réalisation des tests ELISA.

Analyses parasitologiques

Le test de Woo, le comptage sur cellule et l'examen de frottis ont été réalisés.

L'interface de tubes à hématocrite est examiné après centrifugation de 14 000 g pendant cinq minutes, comme décrit par Woo (14). La sensibilité du test est de l'ordre de 10^3 trypanosomes/ml (1, 8, 14).

Le comptage est réalisé en cellule de Thoma, après dilution du sang, au 1/10 ou au 1/100 (selon la parasitémie), dans une solution tamponnée de phosphate, salée et glucosée (PSG, pH 7,4) ; il permet une estimation de la parasitémie.

Les frottis colorés sont examinés pour vérifier l'absence d'autres parasites et confirmer la présence de *T. vivax* sur les critères de taille et de morphologie indiqués par Hoare (5).

Sérodiagnostic par ELISA

La méthode utilisée est décrite par Nantulya et Lindqvist (11). Le résultat est considéré comme positif si la densité optique de l'échantillon est supérieure à 0,05. Pour faciliter la lecture des résultats, les densités optiques indiquées par le lecteur ELISA sont multipliées par 1 000, et l'on note DO cette valeur. Des sérums témoins, 2 positifs et 2 négatifs, fournis par l'ILRI, sont disposés sur chaque plaque de microtitration, afin de vérifier que leurs valeurs ne s'éloignent pas de celles usuellement obtenues. Dans le cas contraire, l'ensemble des résultats fournis par cette plaque serait rejeté. Les comparaisons de moyennes sont réalisées entre les moyennes des DO des animaux infectés et celles des témoins, par le test du « t » décrit par Schwartz (13).

Test en aveugle

Afin d'être testés à l'ILRI et au CIRDES, 42 échantillons présentant, en Guyane, un large panel de densités optiques et de parasitémies ont été sélectionnés parmi les 330 prélèvements réalisés au cours de l'expérience. Les résultats des trois laboratoires seront comparés. Des aliquotes de ces sérums ont été transportées sous froid (carboglace) jusqu'aux laboratoires en Afrique. L'analyse statistique permettra d'établir si les résultats des trois laboratoires sont significativement différents, ou non ; elle est réalisée selon les méthodes décrites par Schwartz (13) :

- analyse qualitative de séries appariées (test du CHI 2) ;
- analyse quantitative de séries appariées (comparaison de moyennes des DO).

RÉSULTATS

Avant l'inoculation, toutes les techniques de détection de *Trypanosoma* sp. étaient négatives, révélant que ces animaux n'ont pas eu de contact préalable avec des trypanosomes pathogènes.

Résultats parasitologiques

Pour des raisons pratiques, le mouton 1 n'a pu être prélevé de J165 à J190 et de J200 à J225. En dehors de ces périodes, les prélèvements n'ont jamais été espacés de plus de trois jours.

Mouton 1 (mâle)

Sur 285 jours de suivi l'animal a été prélevé 205 fois ; le test de Woo a été positif 90 fois (44 p. 100). Le test de Woo est devenu positif à J4. La figure 1 montre l'évolution de la parasitémie qui atteint $1,4 \times 10^7$ trypanosomes/ml à J12. A ce stade, un traitement à l'acéturate de diminazène à la dose de 3,5 mg/kg a été réalisé. La parasitémie s'est annulée le lendemain du traitement, mais les trypanosomes ont à nouveau été détectés une dizaine de jours plus tard. La parasitémie a ensuite été élevée, justifiant un traitement à J36 (parasitémie $> 10^7$). De la même manière, les trypanosomes ont disparu puis ont à nouveau été détectés dans le sang circulant 9 jours après le traitement (J45). Par la suite, la parasitémie est restée inférieure au plafond fixé pour le traitement (10^7) ; l'animal a toutefois été traité à J130 pour favoriser l'apparition d'une période aparasitémique. Les examens parasitologiques sont alors restés négatifs pendant plus de 4 mois.

A l'occasion d'un stress alimentaire (rupture d'approvisionnement en granulés pendant deux jours), les parasites ont été détectés dans le sang de manière très fugace

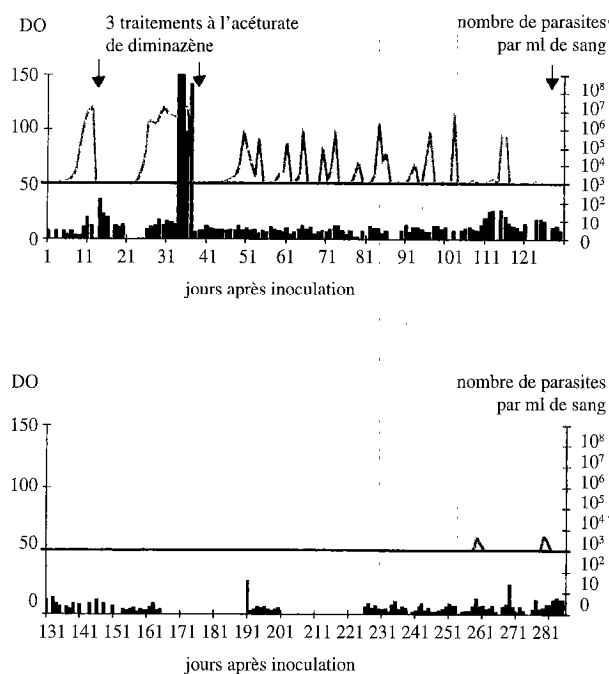


Figure 1 : Parasitémie, traitements et DO fournies par les tests ELISA du mouton 1 (haut : période 1, J1-J130 ; bas : période 2, J131-J285).

Histogrammes : valeurs des DO obtenues au test de détection des antigènes trapping-ELISA ; courbes grisées : parasitémie (échelle logarithmique) ; barre horizontale : seuil de positivité des deux tests pratiques (DO 50 pour le test ELISA, et parasitémie 10^3 trypanosomes/ml pour le test de Woo) ; les flèches verticales indiquent les jours de traitement à l'acéturate de diminazène.

ce et peu intense (parasitémies $< 10^4$ /ml), à J259-260, puis, en l'absence de stress alimentaire, à J281-282.

L'évolution de la parasitémie a donc permis de distinguer successivement une période de forte parasitémie (J1-J130) et une période de parasitémie quasiment non détectable par le test de Woo (J131-J285) :

- J1-J130 : sur 130 jours de suivi, l'animal a été prélevé 113 fois, le test de Woo a été positif 85 fois (75 p. 100). Les parasitémies, généralement élevées, ont été annulées pendant des périodes de 9 à 10 jours par l'administration d'acéturate de diminazène, ou, naturellement, pendant des périodes de durées inférieures à six jours (fig. 1 : haut) ;

- J131-J285 : sur 155 jours de suivi, l'animal a été prélevé 92 fois, le test de Woo a été positif 5 fois (5,4 p. 100). Les parasitémies étaient généralement non décelables ou seulement de manière épisodique ; l'animal est toutefois resté porteur du parasite pendant toute la durée du suivi (fig. 1 : bas).

La sensibilité de la technique parasitologique est élevée au début de l'infection. Par la suite, alors que l'animal s'immunise, les parasitémies sont de plus en plus basses jusqu'à devenir non détectables. La récurrence des para-

sites dans le sang témoigne cependant de l'infection continue de l'animal pendant toute la période d'observation.

Mouton 2

Sur 130 jours de suivi, l'animal a été prélevé 125 fois, le test de Woo a été positif 89 fois (71 p. 100). Le test de Woo était positif dès le lendemain de l'inoculation ; puis la parasitémie a été généralement élevée pendant toute la durée du suivi, atteignant deux fois le seuil fixé pour le traitement (fig. 2). Après les traitements à l'acéturate de diminazène (3,5 mg/kg IM), les parasites n'étaient plus détectables pendant 9 et 13 jours.

En moyenne les parasitémies de cet animal ont été plus élevées que celles du mouton 1 pendant les 130 premiers jours de l'infection, dépassant souvent 10^6 parasites/ml de sang ; ce phénomène peut être mis en relation avec l'état physiologique de l'animal pendant l'infection (gestation, mise bas à J28, puis lactation pendant un mois).

Résultats sérologiques

Les résultats des tests ELISA sont indiqués aux figures 1 et 2 où les histogrammes représentent les DO obtenues aux tests ($DO = 1\ 000 \times$ densité optique donnée par le lecteur ELISA). Les échelles des DO et de la parasitémie ont été choisies de telle sorte que le seuil de sensibilité de chaque test apparaît à la même hauteur sur la figure (barre horizontale correspondant à 1 000 trypanosomes/ml pour le test de Woo et à la DO 50 pour les tests ELISA).

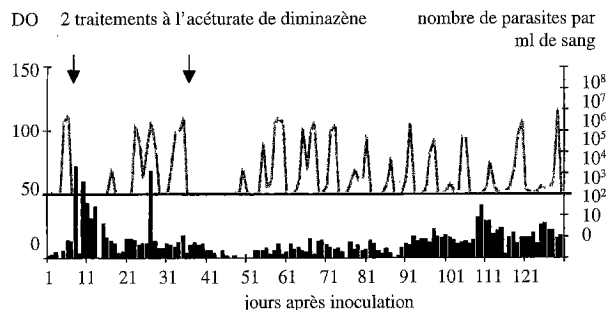


Figure 2 : Parasitémie, traitements et DO fournies par les tests ELISA du mouton 2.

Histogrammes : valeurs des DO obtenues au test de détection des antigènes trapping-ELISA ; courbes grisées : parasitémie (échelle logarithmique) ; barre horizontale : seuil de positivité des deux tests pratiqués (DO 50 pour le test ELISA, et parasitémie 10^3 trypanosomes/ml pour le test de Woo) ; les flèches verticales indiquent les jours de traitement à l'acéturate de diminazène.

Mouton 1, période 1 (J1-J130)

Sur 113 prélèvements, l'ELISA a été positif 4 fois (3,5 p. 100). La DO moyenne sur cette période est de 15 ± 6 (intervalle de confiance de la moyenne au risque de 5 p. 100). Le test a été positif de J34 à J37. La DO maximale a été de 297.

Mouton 1, période 2 (J131-J285)

Les 92 prélèvements ont fourni des résultats négatifs. La DO moyenne sur cette période est de 5 ± 1 . La DO maximale a été de 25.

Pour ces périodes cumulées, le mouton 1 a été prélevé 205 fois, l'ELISA a été positif 4 fois, la DO moyenne est de $10,5 \pm 4$. Le pourcentage de résultats positifs enregistrés sur la totalité du suivi de cet animal est de 1,9 p. 100.

Mouton 2 (J1-J130)

Sur 125 prélèvements l'ELISA a été positif 3 fois (2,4 p. 100). La DO moyenne de toute la période d'infection est de 12 ± 2 . Le test a été positif à J8, J12 et J27. La DO maximale a été de 71. Les 2 témoins négatifs et les 2 témoins positifs ont été testés 8 fois chacun et ont donné en moyenne des valeurs respectives de 8 ± 4 et 321 ± 22 . Sur l'ensemble de la période de suivi, il n'y a pas de différence significative au seuil de 5 p. 100 entre la DO moyenne obtenue avec les sérums des animaux infectés et celles des témoins négatifs (mouton 1 : $t = 0,33$ pour ddl 219, et, mouton 2 : $t = 1,18$ pour ddl 139).

Comparaison de la sensibilité du test de Woo et de l'ELISA *T. vivax*

Sur 330 échantillons provenant d'animaux activement infectés, le test de Woo a fourni 54 p. 100 de résultats positifs tandis que l'ELISA n'en a diagnostiqué que 2,1 p. 100 (tableau I). Aucun outil mathématique n'est nécessaire pour montrer la supériorité du test de Woo pour la détection de l'infection.

Test en aveugle

Sur les 42 sérums sélectionnés pour le test en aveugle, 23 provenant du mouton 1, et 19 provenant du mouton 2 ont été testés au CIRDES et à l'ILRI. Les DO obtenues dans ces laboratoires et celui de Guyane sont indiquées au tableau II (pour une bonne visualisation des résultats les DO supérieures au seuil de positivité fixé par l'ILRI, valeur 50, figurent en caractère gras). Les jours de prélèvements et les parasitémies des animaux sont également indiqués (le prélèvement à J0 étant réalisé avant l'inoculation, le numéro correspond au nombre de jours après inoculation).

Pour ces séries appariées, en réalisant une analyse qualitative des résultats (test positif si $DO > 49$), on n'observe pas de différence significative, au risque de 5 p. 100, entre les résultats du laboratoire du CIRAD-EMVT-Guyane et de l'ILRI (CHI 2 corrigé = 0 avec ddl = 1), ni entre ceux du CIRAD-EMVT-Guyane et du CIRDES (CHI 2 corrigé = 1,5 avec ddl = 1).

TABLEAU I
Prélèvements effectués et leurs résultats au test de Woo et à l'ELISA *T. vivax*

Animal et période de suivi	Durée du suivi	Nombre de prélèvements quotidiens	Positifs au test de Woo		Positifs au test ELISA de <i>T. vivax</i>	
			Nombre	p. 100	Nombre	p. 100
Mouton 1, période 1 : J1-J130	130 jours	113	85	75 p. 100	4	3,5 p. 100
Mouton 1, période 2 : J131-J285	155 jours	92	5	5,4 p. 100	0	0 p. 100
Mouton 2 : J1-J130	130 jours	125	89	71 p. 100	3	2,4 p. 100
Total	415 jours	330	179	54 p. 100	7	2,1 p. 100

TABLEAU II
Jours de prélèvements, parasitémies et DO obtenues dans les trois laboratoires sur 42 échantillons testés en aveugle

MOUTON 1					MOUTON 2				
Jour	Parasitémie	Densité optique			Jour	Parasitémie	Densité optique		
		Guyane	ILRI	CIRDES			Guyane	ILRI	CIRDES
0	0	6	20	12	0	0	1	17	20
7	4,3.10 ³	2	26	5	4	2,4.10 ⁶	5	24	0
9	2,4.10 ⁶	9	26	6	5	4,8.10 ⁶	13	29	0
10	8,4.10 ⁶	19	28	0	7	0	103	37	145
11	14,4.10 ⁶	11	19	0	8	0	3	22	0
13	0	35	24	12	9	0	65	33	104
19	0	13	14	0	10	0	42	52	147
25	1,9.10 ⁶	7	19	11	11	0	58	30	64
28	5,2.10 ⁶	17	30	19	12	0	39	26	80
33	8,4.10 ⁶	150	146	90	14	0	26	24	52
34	12.10 ⁶	297	207	132	18	0	3	30	14
36	0	95	16	0	22	1,7.10 ⁶	13	22	1
46	7.10 ²	7	17	18	25	2,4.10 ⁵	10	17	6
63	1,5.10 ³	7	18	15	26	2,4.10 ⁶	67	27	32
96	7,2.10 ⁵	5	24	4	27	9.10 ⁴	12	22	8
98	0	11	20	0	43	0	0	16	0
100	4,5.10 ²	9	19	22	90	7.10 ³	10	22	0
126	10 ²	11	18	11	96	7.10 ⁴	11	34	0
154	0	3	23	7	107	10 ²	13	22	19
208	0	4	21	10					
215	0	9	13	0					
226	0	1	24	0					
246	0	0	14	16					
Test de Woo : 22 positifs sur 42									
						Laboratoire	Guyane	ILRI	CIRDES
	Ag					ELISA	7	3	8
	<i>T. vivax</i>					test positif	35	39	34
						test négatif			

En réalisant une analyse quantitative, sur les 40 examens effectués sur des échantillons prélevés pendant la période d'infection, les DO moyennes sont pour le CIRDES : 26 ± 13 ; pour le CIRAD-EMVT-Guyane : 30 ± 17 , et pour l'ILRI : 31 ± 11 .

Les comparaisons de moyennes 2 à 2 des séries appariées de grand échantillons ($n > 30$) ne permettent pas de mettre en évidence de différence significative entre les DO moyennes obtenues dans les trois laboratoires, au risque de 5 p. 100 (écarts réduits : ε ILRI/Guyane = 0,23 ; ε ILRI/CIRDES = 0,7, et ε CIRDES/Guyane = - 0,6).

DISCUSSION

Les résultats comparés des laboratoires ne montrent pas de différence importante entre les diagnostics effectués à l'ILRI, au CIRDES et au CIRAD-EMVT-Guyane. La nature des plaques, IMMULON B DYNATECHND ou NUNC MAXISORPND, ne modifie pas les résultats de manière significative. Ceci confirme les observations faites antérieurement par G. Duvallet (communication personnelle).

Selon Nantulya *et al.* (9, 10, 11, 12) le test de détection des antigènes de *T. vivax* est plus sensible que le test de Woo. Les antigènes recherchés étant internes, le test pourrait rester négatif pendant les premières périodes de l'infection (10 à 20 jours), jusqu'à ce qu'une quantité importante d'antigènes soit libérée par la lyse des parasites. Par la suite le test resterait positif, même pendant les périodes aparasitiques, et jusqu'à une quinzaine de jours après un traitement curatif.

Dans cette expérience il a effectivement été observé que cet ELISA peut rester négatif pendant les premiers jours d'infection, la détection des antigènes ne devenant positive qu'à J34 et J8. Par contre, la sensibilité du test s'est avérée très inférieure à celle du test de Woo.

Le résultat du test après traitement trypanocide lors d'une forte parasitémie n'a été positif que dans un cas sur quatre (mouton 2 après le premier traitement). Il faut noter que la DO a légèrement progressé lors du premier traitement du mouton 1, sans atteindre le seuil de positivité. Enfin dans les autres cas les traitements lors de fortes parasitémies n'ont eu aucun effet sur la valeur des DO post-traitement, bien qu'une forte libération d'antigènes ait eu lieu. La DO évoluant parfois en relation avec la parasitémie, parfois sans relation apparente, les pics d'antigénémie décrits par Nantulya *et al.* n'ont pas été observés. Enfin, il n'a pas été enregistré de résultats positifs pendant une longue période aparasitémique.

Devant la faible sensibilité du test de détection des antigènes, Kanwe *et al.* (6) ont proposé d'abaisser le seuil de positivité indiqué par l'ILRI (DO 50). Dans cette expérience, les DO moyennes des animaux infectés étant de $10,5 \pm 4$ et 12 ± 2 , pour enregistrer un taux de positivité satisfaisant, il faudrait abaisser le seuil de positivité jusqu'à des valeurs si basses (< 10 par exemple) qu'elles se

situeraient en dessous du seuil de sensibilité des lecteurs ELISA. Enfin le nombre de faux positifs serait considérable.

L'IAEA a établi un nouveau protocole dans lequel les résultats sont fournis sous forme de pourcentage de positivité par rapport à un sérum standard.

Au vu des présents résultats, ces techniques sont sans appel, puisque les DO au cours de l'infection ont été souvent voisines de zéro, et ne sont pas différentes des DO pré-infection ou de celles des témoins négatifs.

Force est de constater que l'ELISA par immunocapture qui a été utilisé dans cette expérience n'est pas en mesure de fournir un diagnostic fiable de l'infection par la souche de *T. vivax* isolée en Guyane française.

L'existence, en Afrique, de souches présentant les mêmes caractéristiques que la souche de Guyane française est hautement probable puisque les parasites présents en Amérique du Sud sont d'origine africaine. Certains résultats récemment publiés l'indiquent, ainsi, Kanwe *et al.* (6), au Burkina Faso, et Faye (3), en Gambie, obtiennent respectivement 9,9 p. 100 et 11 p. 100 de résultats positifs avec l'ELISA par immunocapture d'antigènes de *T. vivax* sur des animaux trouvés infectés par *T. vivax* aux tests parasitologiques.

CONCLUSION

Les diagnostics réalisés dans trois laboratoires différents ont fourni des résultats sensiblement identiques.

Pour ces deux moutons expérimentalement infectés avec une souche guyanaise de *T. vivax*, la sensibilité du test de détection des antigènes par ELISA pendant les 130 et 285 premiers jours d'infection a été très basse (en moyenne 2,1 p. 100 de résultats positifs), de loin inférieure à celle de la technique de Woo (en moyenne 54 p. 100 de résultats positifs). L'association des deux techniques de diagnostic n'apporte aucune sensibilité supplémentaire.

Les DO enregistrées au cours de ces longues périodes d'infections expérimentales sont trop basses pour permettre de distinguer les animaux infectés des animaux non infectés. L'antigène reconnu par le monoclonal utilisé pour ce test est présent, mais faiblement disponible, probablement produit en quantité insuffisante et/ou de manière irrégulière par la souche parasitaire utilisée. Une formation importante d'immunocomplexes pourrait également expliquer ce phénomène. On ignore pour le moment les raisons de cette faible disponibilité, tant pour la souche de Guyane française que pour celles d'Afrique de l'Ouest.

La sensibilité insuffisante de ce test, observée également en Afrique, montre que des souches présentant des caractéristiques voisines, sont présentes sur ce continent, et risquent de fausser considérablement les résultats des enquêtes épidémiologiques entreprises à l'aide de ce kit.

Le test de Woo ne présentant une sensibilité satisfaisante que pendant la première phase des infections, ce test de détection des antigènes par ELISA étant inutilisable, et la détection des anticorps ne permettant pas de savoir si la présence du parasite est contemporaine du prélèvement, on ne possède actuellement aucun outil de diagnostic satisfaisant pendant les phases aparasitémiques. Il serait intéressant d'éprouver la sensibilité des techniques de PCR au cours de cette phase. Quoiqu'il en soit, pour des enquêtes épidémiologiques de grande envergure, les techniques de PCR n'étant pas adaptées, il est nécessaire de développer de nouveaux monoclonaux plus sensibles pour la détection des infections par *T. vivax*.

Remerciements

Nous remercions vivement M. G. Duvallat du CIRDES (ex-CRTA) à Bobo-Dioulasso, et M. S. Minja de l'ILRI (ex-ILRAD), à Nairobi, pour la réalisation des tests ELISA en aveugle, ainsi que M. G. Uilenberg qui a accepté de relire notre manuscrit.

Bibliographie

1. BETANCOURT A.E., RAMIREZ L.E., WELLS E.A., BAZALAR H., 1979. La técnica de centrifugación en tubo capilar en el diagnóstico de tripanosomiasis experimental. *Revta ICA, Bogota (Colombia)*, **14** : 97-104.
2. DESQUESNES M., LA ROCQUE S. de, PEREGRINE A.S. French Guyanan stock of *Trypanosoma vivax* resistant to diminazene aceturate but sensitive to isometamidium chloride. *Acta trop.* (sous presse).
3. FAYE J., 1993. The use of an antigen-detection ELISA for the diagnosis

DESQUESNES (M.), LA ROCQUE (S. de). Comparison of the sensitivity of Woo's test and a test for detecting antigens of *Trypanosoma vivax* in two sheep experimentally infected with a Guyanese strain of the parasite. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1995, **48** (3) : 247-253.

A trapping ELISA for the detection of circulating antigens of *Trypanosoma vivax* with a specific monoclonal antibody was developed by Nantulya and Lindqvist in 1989. With the African strains tested, its sensitivity proved very high. Using reagents supplied by ILRI, the sensitivity of this test was compared with that of the Woo test in two sheep experimentally infected with a Guyanese strain of *T. vivax*. Blind tests carried out at CIRDES and ILRI confirmed the results obtained in French Guiana. The animals were bled regularly during the first 130 and 285 days of infection. Whatever the period of infection and whether there was patent parasitaemia or not, the mean sensitivity of the ELISA test was very low : 2.1 % of positive results, far below the Woo test's 54 % of positive results. Associating the two techniques did not improve the sensitivity. The mean optical densities recorded during these long periods of infection (0.010 ± 0.004 and 0.012 ± 0.002) are so close to the sensitivity threshold of the ELISA readers that they cannot be proposed as a cut-off threshold to improve the sensitivity of the test. A complementary study of the sensitivity of this test is in progress at ILRI.

As already observed in Burkina Faso and The Gambia, this poor sensitivity may greatly affect the results of the epidemiological surveys being carried out with these reagents in Africa. New monoclonal antibodies must be developed to produce a test for *T. vivax* antigens with more satisfactory sensitivity.

Kew words : Sheep - *Trypanosoma vivax* - Experimental infection - ELISA - Antigen - Antibody - Serology - French Guiana.

sis of trypanosome infections in N'Dama cattle in Gambia. In : Improving the diagnosis and control of trypanosomiasis and other vector-borne diseases of African livestock using immunoassay methods, IAEA-TECDOC-707. Vienna, Austria, IAEA, p. 51-57.

4. FERENC S.A., STOPINSKI V., COURTNEY C.H., 1990. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* and its use in a seroepidemiological survey of the eastern Caribbean Basin. *Int. J. Parasitol.*, **20** : 51-56.

5. HOARE C.A., 1972. The trypanosomes of mammals. Edinburgh, U.K., Backwell Scientific Publications ; Bristol, U.K., Western Printing Services Ltd, p. 125-141.

6. KANWE A.B., BENGALY Z., SAULNIER D., DUVALLET G., 1992. Evaluation du test de détection des antigènes circulants de trypanosomes à l'aide d'anticorps monoclonaux. Infections expérimentales et naturelles. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, **45** : 265-271.

7. LANCELOT R., 1988. La trypanosome bovine à *Trypanosoma vivax* en Guyane française, contribution à l'étude clinique et épidémiologique. Thèse de Doctorat vétérinaire, ENVA, Maisons-Alfort, France.

8. MURRAY M., MURRAY P.K., McINTYRE W.I.M., 1977. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, **71** : 325-326.

9. NANTULYA V.M., 1990. Trypanosomiasis in domestic animals : the problem of diagnosis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **9** : 357-367.

10. NANTULYA V.M., 1991. Molecular diagnosis of parasites. *Experientia*, **47** : 142-145.

11. NANTULYA V.M., LINDQVIST K.J., 1989. Antigen-detection enzyme immunoassays for the diagnosis of *Trypanosoma vivax*, *T. congolense* and *T. brucei* infections in cattle. *Trop. Med. Parasit.*, **40** : 267-272.

12. NANTULYA V.M., MUSOKE A.J., RURANGIRWA F.R., SAIGAR N., MINJA S.H., 1987. Monoclonal antibodies that distinguish *Trypanosoma congolense*, *T. vivax* and *T. brucei*. *Parasite Immunol.*, **9** : 421-431.

13. SCHWARTZ D., 1963. Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. Paris, France, Flammarion Médecine-Sciences, p. 303.

14. WOO P.T.K., 1970. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta trop.*, **27** : 384-386.

DESQUESNES (M.), LA ROCQUE (S. de). Estudio comparativo de la sensibilidad del test de Woo y de un test de detección de antígenos de *Trypanosoma vivax* en dos corderos infectados en forma experimental con una cepa guayanesa del parásito. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1995, **48** (3) : 247-253.

En 1989, Nantulya y Lindqvist establecieron un test de ELISA para la detección de antígenos circulantes de *Trypanosoma vivax*, por inmunocaptura, gracias a un anticuerpo monoclonal específico. La sensibilidad de las cepas africanas fue muy elevada. Gracias a reactivos facilitados por el ILRI, la sensibilidad fue comparada a la del test de Woo, gracias a infecciones experimentales en dos corderos con una cepa guayanesa de *T. vivax*. Mediante tests ciegos, realizados en el CIRDES y el ILRI, se logró confirmar los resultados obtenidos en la Guayana Francesa. Se obtuvieron regularmente muestras de los animales durante los 130 y 285 primeros días de la infección. En todo momento de la infección, con detección de parasitemia o no, la sensibilidad del ELISA fue muy baja : en promedio 2,1 p. 100 de resultados positivos, muy inferior a la de la técnica de Woo : 54 p. 100 de resultados positivos. La asociación de las dos técnicas no aporta ninguna sensibilidad suplementaria. Las densidades ópticas promedio, registradas durante estos dos largos períodos de infección, $0,01 \pm 0,004$ y $0,012 \pm 0,002$, son tan cercanas al umbral de sensibilidad de los lectores ELISA, que no pueden proponerse como límite para mejorar la sensibilidad de positividad del test. Un estudio complementario de la sensibilidad de este test está en curso en el ILRI. Este defecto de sensibilidad, ya observado en Burkina Faso y Gambia, podría alterar fuertemente los resultados de las encuestas epidemiológicas llevadas a cabo con los reactivos en Africa. Con el fin de lograr un test de detección de antígenos de *T. vivax* con una sensibilidad satisfactoria, deben de desarrollarse nuevos anticuerpos monoclonales.

Palabras clave : Ovino - *Trypanosoma vivax* - Infección experimental - ELISA - Antígeno - Anticuerpo - Serología - Guayana Francesa.

Leucocyte and thrombocyte responses in dogs experimentally infected with *Trypanosoma brucei*

S.O. Omotainse^{1*}, V.O. Anosa¹

OMOTAINSE (S.O.), ANOSA (V.O.). Leucocyte and thrombocyte responses in dogs experimentally infected with *Trypanosoma brucei*. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1995, 48 (3) : 254-258.

Three dogs were subcutaneously infected with *Trypanosoma brucei* strain ILRAD 1797. Artificial haemolytic anaemia was induced in 2 other dogs by phlebotomy, heat treatment and re-infusion of the blood, while 2 dogs were kept as control animals. The infected animals developed pan-leucopenia and thrombocytopenia, while the dogs with artificial haemolytic anaemia developed leucocytosis and thrombocytosis. These findings suggest that there was a bone marrow depressing factor in the plasma of *T. brucei*-infected dogs especially as it affected leucocyte production.

Key words : Dog - *Trypanosoma brucei* - Experimental infection - Anaemia - Blood - Nigeria.

INTRODUCTION

Although natural canine trypanosomosis has already been reported (11, 18), and experimental canine trypanosomosis described (13, 14, 17, 19), the leucocyte and thrombocyte changes have not yet been described.

Pan-leucopenia is generally reported in acute trypanosomosis (1, 4), but leucocytosis is a feature of *Trypanosoma brucei*-infected deer mice (5). The decrease in the total number of white blood cells (WBC) is reflected in all the WBC components, but monocytosis has consistently been reported in *T. brucei* infection of rodents (5) and in *T. vivax* infection of ruminants (3, 8). However, no significant change in monocyte counts was reported in *T. congolense* infection of cattle (15).

Thrombocytopenia is a common characteristic of both human and animal trypanosomosis (2, 9, 22). Detailed leucocyte and thrombocyte responses have not been reported in the literature on canine trypanosomosis. This paper reports the leucocyte and thrombocyte responses in *T. brucei* infected dogs.

MATERIALS and METHODS

Experimental design

The design of this work was described in (19). Seven local dogs (mongrels) of 7 to 18 months old were used in this experiment. They were kept in standard kennels at the Department of Veterinary Medicine, University of Ibadan, Ibadan, Nigeria.

The dogs were kept for about 4 months to acclimatize before the experiment, when they were dewormed, deticked, and screened and treated against babesiosis. Three dogs were subcutaneously infected with the *T. brucei* strain ILRAD 1797. Artificial haemolytic anaemia was induced in 2 other dogs by phlebotomy, heat treatment and re-infusion of the blood, while 2 dogs were kept as controls.

Animal infection and plasma inoculation into mouse

The infection and induction of artificial haemolytic anaemia (AHA) were carried out as described by Omotainse and Anosa (19), as was the plasma inoculation into mice.

Haematological techniques

The WBC counts were determined in a Neubauer haemocytometer using a blood dilution of 1 : 20 in 2 % aqueous solution of acetic acid to which gentian violet was added. For platelet counts, the blood was diluted 1 : 20 with 1 % ammonium oxalate and counted in a haemocytometer. WBC differential counts were made on thin blood smears stained with Wright's stain (20).

The plasma samples harvested from each dog were inoculated into 4 mice and the mice were heart-bled 6 days later for haematology. This was done to evaluate the leucopoietic potential of the sera in the mice.

RESULTS

T. brucei infection produced a hyperacute disease in dogs. There was a sudden development of anaemia. This anaemia, already described by Omotainse and Anosa (19) led to an unequal and unsustainable increased production of new red blood cells (reticulocytes).

1. Department of Veterinary Pathology, University of Ibadan, Ibadan, Nigeria.

* Adresse actuelle : Veterinary and Livestock Studies Division, Nigerian Institute for Trypanosomiasis Research, P.M.B. 03, Vom, Plateau State, Nigeria.

Reçu le 21.7.1993, accepté le 7.11.1995.

Leucocyte counts in *T. brucei* infected dogs

On average, there was a sharp decrease in the total leucocyte counts, especially in the first 4 weeks of infection when there was a significant decrease ($p < 0.001$) (table I, fig. 1). Thus the total WBC dropped from a pre-infection value of $12.72 \pm 3.23 \times 10^3/\mu\text{l}$ to $5.175 \pm 3.01 \times 10^3/\mu\text{l}$ by the fourth week of infection. The animal that survived for 8 weeks after infection had a terminal total WBC count of $5.50 \times 10^3/\mu\text{l}$.

Leucocyte counts of dogs with artificially induced haemolytic anaemia (AHA)

In dogs with AHA, the total leucocyte counts rose sharply from $11.61 \pm 2.43 \times 10^3/\mu\text{l}$ before onset of bleeding to $19.5 \pm 7.78 \times 10^3/\mu\text{l}$ by the third week. Terminally, a dog with AHA had a total WBC count of $23,600/\mu\text{l}$ of blood compared to $5,500/\mu\text{l}$ recorded for an infected dog (tables I and II, fig. 1). While the leucopenia recorded in *T. brucei* infected dogs was characterized by neutropenia, lymphopenia, eosinopenia and mild monocytopenia, the dogs with AHA had leucocytosis with neutrophilia, eosinophilia, slight early lymphocytosis and early monocytosis.

Leucocyte counts in mice with plasma inoculation

The WBC counts of mice that received anaemic dog plasma showed maximum values in those mice that received plasma of *T. brucei*-infected dogs after 10 days of infection. Mice that received plasma from terminal parasitic

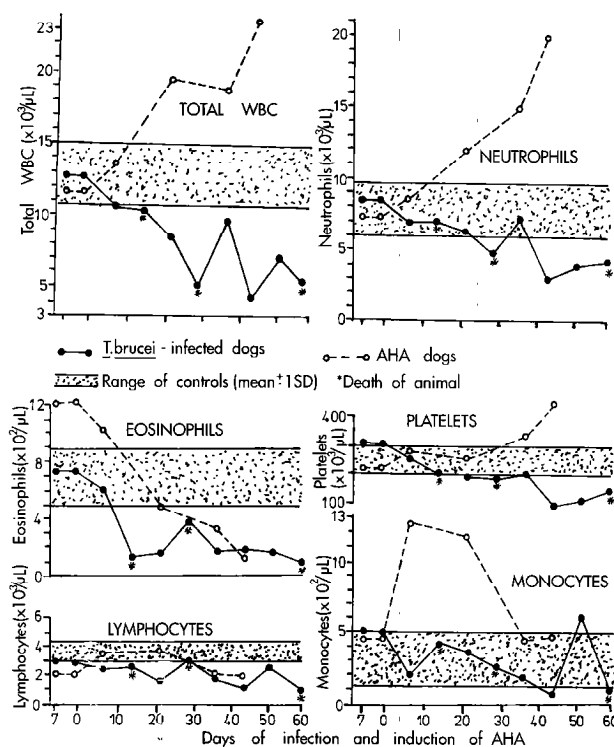


Figure 1: Total and absolute leucocyte and platelet counts of *T. brucei*-infected dogs and dogs subjected to artificial haemolytic anaemia (AHA).

taemic dogs or AHA plasma yielded similar WBC counts, slightly higher than those of the recipients of control plasma (table III).

TABLE I
Leucocyte counts and their changes in *T. brucei* infected dogs

Leucocytes	Control Dogs*	Weeks post infection								
		0**	1	2	3	4	5***	6***	7***	8***
Total WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	12.82 ± 2.11	12.72 ± 3.23	10.69 ± 0.81^e	10.30 ± 3.13^e	8.57 ± 1.55^d	5.17 ± 3.01^a	9.30	4.50	7.33	5.50
Neutrophils ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	7.81 ± 1.35	8.58 ± 2.3	6.95 ± 1.59^e	7.12 ± 3.38^e	6.45 ± 1.83^e	4.77 ± 1.76^b	7.07	3.15	3.98	4.22
Lymphocytes ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	3.71 ± 0.92	2.86 ± 0.65	2.57 ± 0.59^e	2.62 ± 0.70^e	1.60 ± 0.21^e	3.12 ± 1.70^e	1.86	1.08	2.64	1.11
Monocytes ($\times 10^2/\mu\text{l}$)	3.17 ± 2.01	4.95 ± 1.36	2.09 ± 1.16^e	4.08 ± 0.65^e	3.51 ± 1.30^e	2.63 ± 2.06^e	1.86	0.90	6.11	1.11
Eosinophils ($\times 10^2/\mu\text{l}$)	6.89 ± 2.02	7.45 ± 5.63	6.06 ± 6.54^e	1.25 ± 1.47^e	1.60 ± 1.44^e	3.73 ± 5.21^e	1.86	1.80	1.80	1.11
Basophils ($\times 10^2/\mu\text{l}$)	0.42 ± 0.95	0.35 ± 0.43	0.00	0.24 ± 0.48^e	0.00	0.17 ± 0.29^e	0.00	0.00	0.00	0.00
Platelets ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	246.5 ± 47.4	306.0 ± 44.1	259.75 ± 63.63^e	239.0 ± 70.9^e	178.3 ± 33.4^e	137.67 ± 48.0^d	204	98	102	142

* Mean of 10 counts from 2 control dogs taken during the experiment. ** Pre-infection values. *** Values for dogs number 04 alone. a to e indicated levels of significance relative to corresponding values of controls for each parameter (a = $p < 0.001$; b = $p < 0.005$; c = $p < 0.05$; e = not significant).

Except for mice inoculated with 10th day infection plasma and showing platelet counts of 135,000/ μ l, all mice inoculated with infected plasma had slightly lower platelet counts than the 118,000/ μ l found in mice inoculated with AHA plasma.

Whereas there was a gradual decrease in the platelet counts of dogs with *T. brucei* infection, there was a gradual increase in those with AHA (tables I and II, fig. 1). Platelet counts in dogs with AHA were also slightly higher than those of control dogs.

DISCUSSION

There was pan-leucopenia in *T. brucei*-infected dogs. This is consistent with earlier results in *T. vivax* and *T. congolense* infections of ruminants (4, 16, 21) and in *T. brucei* infection of mice (1), although monocytosis has been reported in *T. brucei*-infected mice (1) and *T. vivax*-infected sheep and goats (4).

Thrombocytopenia which occurred in *T. brucei*-infected dogs has also been reported in *T. gambiense* infection of

TABLE II
Mean leucocyte values of dogs subjected to artificial haemolysis

Leucocytes	Control dogs*	Weeks after onset of haemolysis				
		0**	1	2	5+	6+
Total WBC ($\times 10^9/\mu$ l)	12.82 \pm 2.11	11.61 \pm 2.43	13.65 \pm 1.49	19.5 \pm 7.78	18.88 \pm 7.6	23.6
Neutrophils ($\times 10^3/\mu$ l)	7.81 \pm 1.35	7.41 \pm 2.3	8.74 \pm 2.8	12.13 \pm 0.52	14.89 \pm 8.6	20.06
Eosinophils ($\times 10^2/\mu$ l)	6.89 \pm 2.02	12.33 \pm 5.86	10.30 \pm 9.2	4.93 \pm 0.96	3.41 \pm 2.8	1.42
Lymphocytes ($\times 10^3/\mu$ l)	3.71 \pm 0.92	2.13 \pm 0.88	3.46 \pm 3.6	3.83 \pm 3.43	2.15 \pm 1.7	1.89
Monocytes ($\times 10^2/\mu$ l)	3.17 \pm 2.01	4.61 \pm 4.40	12.71 \pm 9.1	11.70 \pm 4.40	4.44 \pm 5.6	4.72
Basophils ($\times 10^2/\mu$ l)	0.42 \pm 0.95	0.34 \pm 0.68	0.0	6.70 \pm 2.40	0.0	0.0
Platelets ($\times 10^3/\mu$ l)	246.5 \pm 47.37	221.5 \pm 52.35	277.0 \pm 52.0	253.0 \pm 35.36	333.5 \pm 2.4	472.0

* Mean of 10 counts from 2 control dogs taken during the experiment. ** Values before induction of haemolysis. + Death of one dog.

TABLE III
Mean white blood cell counts of heart blood of mice six days after inoculation with plasma from control dogs, dogs with *T. brucei* infection and dogs with artificial haemolytic anaemia

Leucocytes	Dogs No. 8 with 5 days of parasitaemia	Dogs with 10 days of parasitaemia	Dogs with 17 days of parasitaemia	Dog No. 4 with 24 days of parasitaemia	Terminal parasitaemia of dogs Nos. 3 & 4	AHA	Control dogs
Total WBC ($\times 10^9/\mu$ l)	3.875	6.671	4.463	4.750	5.876	5.788	5.469
Neutrophils ($\times 10^3/\mu$ l)	2.149	3.647	2.326	2.055	3.247	2.525	2.798
Lymphocytes ($\times 10^3/\mu$ l)	1.525	2.563	1.980	2.395	2.448	2.434	2.386
Eosinophils ($\times 10^2/\mu$ l)	0.37	1.27	0.68	0.71	0.94	1.59	0.79
Monocytes ($\times 10^2/\mu$ l)	0.76	1.44	1.75	2.04	0.87	6.49	1.99
Basophils ($\times 10^2/\mu$ l)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.08
Platelets ($\times 10^3/\mu$ l)	77.25	135.0	104.0	105.0	117.63	118.0	112.38

man and rats (10), *T. brucei* infection of rats and rabbits (12), and in *T. vivax* infection of cattle (15), and goats (6). Important mechanisms that precipitate thrombocytopenia in trypanosomiasis include thrombocyte aggregation, production of anti-platelet auto-antibodies, and phagocytosis of thrombocytes in the spleen and haemolymph nodes of infected animals (2), and these may be major factors involved in the *T. brucei*-infected dogs. The changes recorded in thrombocyte counts as a result of mouse inoculation with plasma from *T. brucei*-infected dogs, were essentially similar to those inoculated with plasma from AHA and control dogs. They all resulted in marginal increases in thrombocyte counts. This shows that in general, the production of thrombocytes from the bone marrow was not depressed by factors in the plasma.

The response of dogs to AHA is characterized by leucocytosis with neutrophilia, lymphocytosis and monocytosis, as well as by thrombocytosis, thus differing from that of dogs with *T. brucei* infection. The failure of the dogs infected with *T. brucei* to develop similar responses despite the haemolytic nature of the accompanying anaemia suggests that fundamental changes might be taking place in the bone marrow of trypanosome-infected animals, depressing its responsiveness to the haematological events occurring in trypanosomiasis. It is pertinent that the marrow composed of metamyelocyte, band and segmented cells were markedly depressed in *T. vivax* infection of sheep (4) and in *T. congolense* infection of cattle (21). Recent studies in calves infected with *T. vivax* has shown that the marrow granulocyte reserve was depressed and that this was due to massive phagocytosis of these cells by macrophages in the bone marrow (7).

In view of the drop in myeloid : erythroid ratio usually occurring in the marrow of trypanosome-infected animals (2), it is also possible that the cytokines that control various haemopoietic lines are modified to enhance the production of some and depress others such as granulocytes, though there was an initial but unsustained induced leucocytosis in mice which received plasma from dogs recently infected with *T. brucei*.

CONCLUSION

There was leucopenia in *T. brucei* infection of dogs, characterized by neutropenia, lymphopenia, eosinopenia, monocytosis and thrombocytopenia. In contrast, dogs with AHA developed leucocytosis with neutrophilia, lymphocytosis, monocytosis and eosinopenia. The plasma of *T. brucei* infected dogs induced increased leucocytosis in mice in the early part of infection, but this potential was lost with time. Similarly, lower platelet counts were recorded generally in mice injected with infected plasma than those injected with plasma from AHA dogs.

Acknowledgement

The authors are grateful to the directorate of the Nigerian Institute for Trypanosomiasis Research (NITR),

Vom/Kaduna, Nigeria for sponsoring this project. We also appreciate the laboratory assistance of Mr. Eke Ndimele and the secretarial assistance given by D. Agono and M. Dasong.

References

1. ANOSA V.O., 1980. Studies on the parasitaemia, plasma volumes, leucocyte and bone marrow cell counts and the moribund state in *T. brucei* infection of splenectomized and intact mice. *Zentbl. vet. Med.*, **27** : 168-180.
2. ANOSA V.O., 1988. Haematological and biochemical changes in human and animal trypanosomiasis. Part II. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, **41** : 151-164.
3. ANOSA V.O., ISOUN T.T., 1974. Experimental *T. vivax* infection in sheep and goats : the relationship between the parasitaemia, the growth rate, and the anaemia. *J. Niger. vet. Med. Assoc.*, **3** : 102-108.
4. ANOSA V.O., ISOUN T.T., 1980. Haematological studies of *T. vivax* infection of goats and intact and splenectomized sheep. *J. comp. Path.*, **90** : 155-168.
5. ANOSA V.O., KANEKO J.J., 1983. Pathogenesis of *T. brucei* infection in deer mice (*Peromyscus maniculatus*) : Haematologic, erythrocyte biochemical, and iron metabolic aspects. *Am. J. vet. Res.*, **44** : 639-644.
6. ANOSA V.O., KANEKO T.T., 1989. Ultrastructural pathology of haemopoietic organs in *Trypanosoma vivax* infection of goats. *Vet. Path.*, **26** : 78-83.
7. ANOSA V.O., LOGAN-HENFREY L.L., SHAW M.K., 1992. Acute haemorrhagic *T. vivax* infection in calves : A light and electron microscopic study of changes in blood bone marrow. *Vet. Path.*, **29** (1) : 33-45.
8. ESIEVO K.A.N., SAROR I., 1983. Leucocyte response in experimental *T. vivax* infection cattle. *J. comp. Path.*, **93** : 165-170.
9. FORSBERG C.M., VALLI V.E., GENTRY P.W., DUAWORTH R.M., 1979. The pathogenesis of *T. congolense* infection in calves. IV. The kinetics of blood coagulation. *Vet. Path.*, **16** : 229-242.
10. GREENWOOD B.M., WHITTLE H.C., 1976. Coagulation studies in Gambian trypanosomiasis. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, **25** : 390-394.
11. IKEDE B.O., LOSOS G.J., 1972. Spontaneous canine trypanosomiasis caused by *T. brucei* : Meningoencephalomyelitis with extravascular localization of trypanosomes in the brain. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, **20** : 221-228.
12. JENKINS G.C., FORSBERG C.M., BROWN J.L., PARR C.W., 1974. Some haematological observation on experimental *T. brucei* infections in rabbits. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, **68** : 154.
13. KAGGWA E., MUNGUA W.K., MUGERA G.M., 1984. Pathogenicity of *T. brucei* in dogs. *Bull. Anim. Hlth Prod. Afr.*, **32** : 360-368.
14. KAGGWA E., MUNGUA W.K., MUGERA G.M., 1988. Relapse in dog experimentally infected with *T. brucei* and treated with Diminazene aceturate of isometamidium Chloride. *Vet. Parasitol.*, **27** : 199-208.
15. MAXIE M.G., LOSOS G.J., TABEL H., 1979. Experimental bovine trypanosomiasis (*T. vivax* and *T. congolense*) : I. Symptomatology and clinical pathology. *Tropenmed. Parasitol.*, **30** : 274-282.
16. MAYLOR D.C., 1971. The haematology and histopathology of *T. congolense* infections in cattle. Part II. Haematology (including symptoms). *Trop. Anim. Hlth Prod.*, **3** : 159-168.

S.O. Omotainse V.O. Anosa

17. MORRISON W.I., MURRAY M., SAYER P.D., PRESTON J.M., 1981. The pathogenesis of experimentally induced *T. brucei* infection in the dog. I. Tissue and organ damage. *Am. J. Path.*, **102** : 168-181.
18. MULLIGAN H.W., 1970. The African trypanosomiasis. London, U.K., Allen and Unwin, p. 763-782.
19. OMOTAINSE S.O., ANOSA V.O., 1992. Erythrocyte response to *Trypanosoma brucei* in experimentally infected dogs. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, **45** : 279-283.
20. SCHALM O.W., JAIN N.C., CARROL E.J., 1975. Veterinary haematology. 3rd ed. Philadelphia, U.S.A., Lea and Febiger.
21. VALLI V.E.O., FORSBERG C.M., LUMSDEN J.H., 1979. The pathogenesis of *T. congolense* infection of calves. III. Neutropenia and myeloid response. *Vet. Path.*, **16** : 96-107.
22. WELLDE B.T., KOVATCH R., CHUMO D., WYKOFF D., 1978. *T. congolense*. Thrombocytopenia in experimental infected cattle. *Exp. Parasitol.*, **45** : 26-33.

OMOTAINSE (S.O.), ANOSA (V.O.). Réponses leucocytaires et thrombocytaires à l'infection expérimentale à *Trypanosoma brucei* chez les chiens. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1995, **48** (3) : 254-258.

Trois chiens ont été infectés par une souche ILRAD 1797 de *Trypanosoma brucei* par voie sous-cutanée. Une anémie hémolytique a été provoquée artificiellement chez deux autres chiens par phlébotomie, traitement thermique et réinjection de sang, alors que deux autres chiens ont servi de témoin. Les animaux infectés ont manifesté une panleucopénie et une thrombocytopénie, alors que les chiens atteints d'une anémie hémolytique provoquée artificiellement ont présenté une leucocytose et une thrombocytose. Ces résultats laissent supposer l'existence d'un facteur d'aplasie médullaire dans le plasma des chiens infectés à *T. brucei*, d'autant plus que la production leucocytaire a été affectée.

Mots-clés : Chien - *Trypanosoma brucei* - Infection expérimentale - Anémie - Sang - Nigeria.

OMOTAINSE (S.O.), ANOSA (V.O.). Respuesta leucocitaria y trombocitaria en perros infectados experimentalmente con *Trypanosoma brucei*. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1995, **48** (3) : 254-258.

Se infectaron via subcutánea 3 perros con *Trypanosoma brucei* cepa ILRAD 1797. En otros 2 perros se indujo artificialmente una anemia hemolítica, por flebotomía, tratamiento de calor y re infusión sanguínea, mientras que 2 perros se mantuvieron como animales control. Los animales infectados desarrollaron pan leucopenia y trombocitopenia, mientras que los perros con anemia hemolítica artificial desarrollaron leucocitosis y trombocitosis. Estos hallazgos sugieren la presencia de un factor de depresión de la médula ósea en el plasma de los perros infectados con *T. brucei*, especialmente debido a la afección de la producción leucocitaria.

Palabras clave : Perro - *Trypanosoma brucei* - Infección experimental - Anemia - Sangre - Nigeria.

Reproductive disorders in a laboratory colony of *Glossina palpalis palpalis* Robineau-Desvoidy (Diptera : Glossinidae)

A.B. Ahmed¹, J.A. Onyiah^{1,2}, S.N. Suleiman²

AHMED (A.B.), ONYIAH (J.A.), SULEIMAN (S.N.). Reproductive disorders in a laboratory colony of *Glossina palpalis palpalis* Robineau-Desvoidy (Diptera : Glossinidae). *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1995, 48 (3) : 259-263.

Reproductive disorders were used as a framework in assessing the loss in fecundity of a colony of *G. p. palpalis*. One thousand five hundred females at various stages of the pregnancy cycle were selected at random from the main colony and divided into 10 groups of 150 individuals each according to age, which ranged between 5-90 days. All the groups were observed for the next 30 days and then dissected. The result showed that abortions were the commonest form of disorder and the major source of loss of fecundity, closely followed by the pupariation of third instar larvae *in utero*. The incidence of ovular blockage, insemination failure and degeneration of embryo/egg follicles was low. No instance of atrophy of the ovary was seen. Aborted eggs and larvae were recorded from all the age groups studied, indicating that abortions occur at any stage of the female pregnancy cycle. With a total reproductive disorder of 3.0 %, losses in fecundity through reproductive abnormalities in the tsetse colony studied are minimal.

Key words : *Glossina* - Reproductive disorder - Abortion - Nigeria.

INTRODUCTION

Unlike most insects of major veterinary and medical importance, tsetse flies (*Glossina* spp.) have a unique mode of reproduction characterised by adenotrophic viviparity. Fertilised eggs and the resulting larvae are retained within the uterus, fed by the nourishment from the milk gland (6, 28) and deposited one at a time at regular intervals. Under our maintenance conditions, the first larva is produced between day 18 and 20 post emergence and subsequent births are at regular intervals of between 9-11 days (1).

Despite this low reproductive potential, offspring numbering as many as 20 have been recorded from a single female tsetse that lived for almost 200 days in an optimum laboratory environment (3). Under natural condi-

tions, however, a lower number of offspring are produced owing to several constraints associated with independent existence.

Information on the reproductive status of female tsetse was used to measure the stability of the tsetse population under natural conditions (31). Such information can also be used in assessing the reproductive performance of laboratory colonies. Saunders and Phelps (27) reported that abortion, egg retention and follicular degeneration are the commonest disorders and main sources of reproductive losses in tsetse laboratory colonies and the result of later studies on *G. p. gambiensis* (29) is not very different. In this paper, the reproductive disorders of female tsetse flies from a self-producing colony of *Glossina p. palpalis* was evaluated to identify the main reproductive disorders and the sources of reduced fecundity amongst females in the colony.

MATERIAL and METHODS

One thousand five hundred producing female *G. p. palpalis* Robineau-Desvoidy at various stages of the pregnancy cycle were selected at random from the colony kept at the main tsetse vector laboratory of the Nigerian Institute for Trypanosomiasis Research (NITR) previously described by Onyiah *et al.* (21) and divided into 10 groups according to age. Male flies were used more than once for routing mating. Each group consisted of 150 individuals. Flies were placed 10-20 per plastic cage (18 × 8 × 4 cm), maintained in the same room as the main colony and observed for 30 days. A second group of 91 flies consisting of only gravid females was chosen from the main colony and used specifically to study the relationship between *in utero* pupariated mortality and mortality by other causes.

Larviposition trays were checked daily during routine collection of puparia and any abortion seen was recovered, classified and recorded. Flies dying before the end of the observation period were dissected and the condition of the spermathecae, ovary and uterus were examined using the method of Saunders (25). Surviving flies were dissected on day 30 post grouping and their reproductive status was determined. For all flies, the occurrence of the following disorders was investigated : ovular blockage (egg retention), abortion, follicular/embryonic degeneration, pupariation of third-instar larvae *in utero* and atrophy of the ovaries.

1. Entomology & Parasitology Division, Nigerian Institute for Trypanosomiasis Research, P.M.B. 2077, Kaduna, Kaduna State, Nigeria.

2. Department of Biological Sciences, Nigerian Defence Academy, PMB 2109, Kaduna, Kaduna State, Nigeria.

RESULTS

Table I sums up the reproductive status of the representative female population in the tsetse colony studied. Only six females in group 1 examined were not inseminated, giving an overall insemination rate of 99.6 % ; four had mating scars, indicating that they had copulated, while the remaining two were complete virgins.

It is common for flies to abort a pregnancy after which they successfully carry subsequent ones to full time. Since abortions do not leave any traces, later dissection of such females after passing through successful cycles would not reveal evidence of the previous abortions. For this reason, only the abortions physically recovered were used in estimating the loss of fecundity in this study.

A total of 28 abortions were recovered and classified (table II). From the total number of flies dissected at the end of the observation period, eight females showed an empty uterus and immature eggs next in the sequence of development, which is an indication that they had aborted their pregnancies. These were however not included in the total estimate on the assumption that the aborted pregnancies had been recovered previously as shown in table II. 95.9 % of the 73 (4.7 %) females with an empty uterus had fully developed eggs next in the ovulation sequence, indicating recent parturitions.

Ovular blockage (egg retention) showing developed eggs in most of the 4 ovarioles was observed in 2 of the 6 non-inseminated females ; the two females were virgins. One female with a degenerating egg follicle in one of the ovarioles was observed in group IV ; a further three from groups III, V and VIII were observed with empty egg shells in the uterus, indicating embryo degeneration.

TABLE II
Abortions recovered in a representative female colony of *G. p. palpalis*

Sample size	Egg	Larval instars			Total
		I	II	III	
1,500	12	4	7	5	28

Seven flies died with pupariated third instar larvae within the uterus (with 1/3 of these number half way through birth). Considerably higher mortality was recorded with increasing age among the flies ; more than 75 % of the 596 flies that died before the end of the observation period were older than 80 days.

DISCUSSION

Despite the fact that the sample population studied showed evidence of copulation and spermathecal filling, the results revealed an overall reproductive disorder of 3.0 % comprised of 1.9 % abortions, 0.5 % uterine pupariation, 0.4 % non-insemination, 0.2 % embryo degeneration and 0.1 % each of ovular blockage (egg retention) and follicular degeneration respectively.

Since virgin females with evidence of copulation (mating scars) were found only in group I, it is most probable that some of the males used for the routine mating were mixed up and those used for that group were either too young or had not fully recovered from the effects of previous matings. Foster (12) reported that male tsetse are not fully potent before day 5 post emergence when their

TABLE I
Reproductive status in a representative female *Glossina p. palpalis* laboratory colony

Fly group	Age post emergence DAY + 30	Mating scars (%)		Spermathecae (%)		Uterine disorder (%)			Ovarian disorder (%)	
		+ ve	- ve	+ ve	- ve	Empty	EMD	UPP	OBL	FD
I	35	98.7	1.3	96.0	4.0	0.7 (1.3)	—	0.7	1.3	—
II	48	100	—	100	—	14.0 (0)	—	1.3	—	—
III	57	100	—	100	—	6 (0.7)	0.7	—	—	—
IV	66	100	—	100	—	0.7 (1.3)	—	—	—	1.3
V	75	100	—	100	—	2 (0)	0.7	0.7	—	—
VI	84	100	—	100	—	1.3 (0.7)	—	—	—	—
VII	93	100	—	100	—	0 (0)	0.7	—	—	—
VIII	102	100	—	100	—	4 (0.7)	—	0.7	—	—
IX	111	100	—	100	—	12.7 (0.7)	—	0.7	—	—
X	120	100	—	100	—	7.3 (0)	—	0.7	—	—
Total		99.9	0.1	99.6	0.4	4.9 (0.5)	0.2	0.5	0.1	0.1

+ ve = positive ; - ve = négative ; EMD = embryo degeneration ; UPP = uterine pupation ; OBL = ovular blockage ; FD = follicular degeneration. Figures in brackets indicate empty uterus as a result of abortions observed through dissection.

accessory glands have fully developed following consecutive blood uptake and Saunders and Dodd (28) demonstrated that repeated use of males for mating without an adequate rest period renders them aspermic. From these results, it is apparent that in practical terms, the appearance of mating scars alone should not be used as an index of insemination.

Abortion is the commonest form of reproductive disorder in the present study. Similar results have been recorded by other workers both in the laboratory (18, 27, 29) and in natural populations (17, 32). Besides implicating inadequacy of food and interruption in feeding as the major causes (18), climatic stress (20, 35) and physical handling of pregnant females have also been suggested as causative factors. The presence of antibiotics and other additives in the diet of the animal hosts used in fly feeding is also known to cause abortion in tsetse flies (14, 26, 33). In this laboratory, handling is done manually and is therefore likely to impose greater stress on the flies than the influence of climatic factors which remained stable through the use of effective control equipment; the possibility of additives in the host diet acting as toxicants to the flies (14, 26, 33) has also been eliminated following the adoption of a locally-formulated-additive free diet for the animals (2).

The result further suggests that abortion amongst females occurred in all the stages of the gestation period, which is in agreement with the suggestion of Saunders and Phelps (27). The occurrence of these abnormalities in all the age groupings however failed to lend support to the suggestion of Glasgow (13) of an age-related reduction in fecundity of females from increased abortion among older flies. Similar results to those observed in the present study were observed in natural tsetse populations (17, 20).

While the possibility of seeing flies in conditions between parturition and ovulation in natural tsetse populations is considered remote in view of the short time interval between the two processes (20), the majority of the flies encountered with empty uteri in the present study had evidently larviposited shortly before they were killed for dissection. This is not surprising because the flies were killed between 0800-1000 hours on the day when they were dissected and more than 30 % of the parturitions in this laboratory occur between 0600 and 1200 hours (A.B. Ahmed, manuscript in preparation).

In this study, *in utero* pupariation of third instar larvae evidently occurred in most of the fly groups irrespective of age. Generally, the literature on the occurrence of this disorder in *Glossina* species is scanty (19, 23, 29, 30). The only known attempt to explain the likely cause of this disorder is that of Nash *et al.* (19), who observed a strong relationship between engorgement shortly before parturition by pregnant females and the frequency of occurrence of the anomaly, and suggested that the complex of pressures which develops following the blood intake forces

the polypneustic lobes out of the vulva, changing the normal larval lying position and making extrusion difficult. Later observation (4) in a similar experimental set-up did not confirm the above. Tobe and Davey (32) noted that the size of the blood meal ingested by pregnant females is regulated by the available space within the abdomen and it has been shown (6,15) that the last meal is mostly taken about 72 hours prior to parturition. During the present investigation, observation of 91 gravid females fed daily and simultaneously on the same hosts through three cycles also failed to reveal any difference between the proportion of females dying with pupariated larvae within their uterus and those dying of other causes.

In attempts to understand the control of parturition, several experiments conducted (5, 7, 11, 22) have demonstrated the involvement of the nervous and endocrine systems of the female. Studies by Denlinger (5) showed that parturition rhythm can be triggered by either mother or larva and presumed that the two contribute in determining the timing.

The importance of timing of parturition and integration of other reproductive events in *Glossina* species has already been emphasized (6). The factors responsible for pupariation within the maternal uterus cannot be readily explained. On the basis of our present knowledge of the mother-larva relationship, it seems that the anomaly is associated with a breakdown in coordination between mother and offspring on the timing of the commencement of parturition. This suggestion is strengthened by the observation that whether parturition is triggered or not, further pupariation events proceed unhindered since the various tissues of the third instar larva become committed to metamorphosis while still in the uterus following ecdysteroid induction (8). Dzadrek and Denlinger (10) showed that manipulation of the larva including wrapping in paraffin and wedging into narrow plastic cones (which corresponds to the confines of the maternal uterus) causes acceleration of pupariation and that the timing of the different events remained fixed. Furthermore, since pupariation *in utero* occurred either wholly within the uterus or half way through birth, could it be that the former results from total failure at initiating the parturition and the latter from a delay in completing the already triggered process? Yet again, Denlinger and Dzadrek (9) reported that the actual expulsion of the larva is achieved within a short period of 5-12 seconds. Further study is needed to understand this complicated but vital aspect of tsetse reproduction.

Instances of ovular blockage (egg retention) were recorded only among the non-inseminated females who apparently had not copulated, in view of the absence of mating scars on their bodies. This lends support to the observation of Saunders and Dodd (28) on *G. morsitans* that the act of mating is an essential prerequisite for normal ovulation of the first egg. Mellanby (18) similarly observed several eggs within the ovaries of unmated virgin female flies.

Results from the present study also revealed a very low incidence of both *in utero* degenerating embryos and degenerating follicles within the ovaries. Prolonged high environmental temperature may not be the sole causative factor as earlier suggested (18, 24). The role of other unknown factors cannot be ruled out since the conditions under which flies are maintained in this laboratory are optimal. The occurrence of almost all types of reproductive anomalies associated with colony flies and the absence of positive correlation between some of the disorders observed in this study and their documented causes described in the literature may have been due to the effects of the endogenous, physiological factors such as developmental aberration and hormonal imbalance proposed by Turner and Snow (34). The overall low level of reproductive disorders indicates a healthy reproductive system. In the light of the above results, it is concluded that the reduction in productivity through reproductive disorders of female tsetse flies under the prevailing laboratory conditions is minimal.

Acknowledgement

The technical assistance of the staff of the main tsetse vector laboratory is gratefully acknowledged. We thank Mr. G.A. Thompson and Dr. B.O. Ajagbonna for their comments, Mrs Stella A. Alimele and Ibrahim K. Ajiboso for earlier and final processing of the text, respectively, and our Director Dr. Ibrahim Halid for permission to publish.

References

- AHMED A.B., ONYIAH J.A., 1994. Observations on the effects of antibiotics in the blood meal of *Glossina* species. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, **47** (1) : 103-104.
- AHMED A.B., ONYIAH J.A., 1994. Residual effects of benzyl benzoate parasiticide tested on *Glossina palpalis palpalis* Robineau Desvoidy (Diptera : Glossinidae). *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, **47** (1) : 104-106.
- AZEVEDO J.F. de, PINHAO R. da, 1964. The maintenance of a laboratory colony of *Glossina morsitans* since 1959. *Bull. Wld Hlth Org.*, **31** : 835-841.
- BOYLE J.A., 1971. Effect of blood intake of *Glossina austeni* Newst. on pupal weights in successive reproductive cycle. *Bull. ent. Res.*, **61** : 1-5.
- DENLINGER D.L., 1983. Who controls the rhythm of tsetse pupariation : mother or larva. *Physiol. Ent.*, **8** : 25-28
- DENLINGER D.L., MA W.C., 1974. Dynamics of the pregnancy cycle in the tsetse *G. morsitans*. *J. Insect Physiol.*, **20** : 1025-1026.
- DENLINGER D.L., SAINI R.K., CHAUDHURY M.F.B., 1983. Parturition in the tsetse fly *Glossina morsitans* : pattern of activity, sound production and evidence for control by the mothers brain. *J. Insect Physiol.*, **29** (9) : 715-721.
- DENLINGER D.L., DZADREK J., 1991. Commitments to metamorphosis in tsetse : temporal, nutritional and hormonal aspects of the decision. *J. Insect Physiol.*, **37** : 333-338.
- DENLINGER D.L., DZADREK J., 1992. Rhythmic pulse of haemolymph pressure associated with parturition and ovulation in the tsetse fly *Glossina morsitans*. *Physiol. Ent.*, **17** : 127-130.
- DZADREK J., DENLINGER D.L., 1991. Wandering behaviour and pupariation in tsetse larvae. *Physiol. Ent.*, **16** : 523-529.
- FOSTER W.A., 1974. Surgical inhibition of ovulation and gestation in the tsetse *Glossina austeni* Newst. (Diptera : Glossinidae). *Bull. ent. Res.*, **63** : 483-493.
- FOSTER W.A., 1977. Male sexual maturation of the tsetse flies *G. morsitans* West. and *G. austeni* Newst. (Diptera : Glossinidae) in relation to blood feeding. *Bull. ent. Res.*, **66** : 389.
- GLASGOW J.P., 1963. The distribution and abundance of the tsetse. Oxford, U.K., Oxford Pergamon Press, 241 p.
- JORDAN A.M., TREWERN M.A., 1976. Sulphaquinoxaline in host diet as the cause of uterine abnormalities in the tsetse fly (*Glossina* sp.). *Ent. Exp. Applic.*, **19** : 115-129.
- LANGLEY P.A., PIMLEY R.W., 1975. Utilisation of U-¹⁴C amino acids or U-¹⁴C protein by adult *G. morsitans* during in vitro development of larva. *J. Insect Physiol.*, **20** : 2157-2170.
- MADUBUNYI L.C., 1974. A technique for detection of abortion rates in wild population of *Glossina* sp. In : Sterility Principle for Insect Control. Proc. of symp., Innsbruck, Austria, 22-26 July, 1974. Vienna, Austria, IAEA, 622 p. (IAEA STI/PUB/377).
- MADUBUNYI L.C., 1978. Relative frequency of reproductive abnormalities in a natural population of *G. m. morsitans* Westw. (Diptera : Glossinidae) in Zambia. *Bull. ent. Res.*, **68** : 437-442.
- MELLANBY H., 1937. Experimental work on reproduction in the tsetse fly *G. palpalis*. *Parasitology*, **29** : 131-141.
- NASH T.A.M., JORDAN A.M., BOYLE J.A., 1967. A promising method of maintaining *G. austeni* Newst. singly and a study of the feeding habits of the female in relation to larviposition and pupal weight. *Bull. ent. Res.*, **57** : 327.
- OKIWELU S.N., 1977. Insemination, pregnancy and suspected abortion rates in a natural population of *G. m. morsitans* (Diptera : Glossinidae) in the Republic of Zambia. *J. Med. Entomol.*, **14** : 19-23.
- ONYIAH J.A., AHMED A.B., AJAGBONNA B.O., NDAMS I.S., 1987. The rearing of a colony of *G. palpalis palpalis* (Diptera : Glossinidae) at NITR, Kaduna. In : 19th meeting OUA/STRC, Lome, Togo, 1987. Nairobi, Kenya, ISCTRC, p. 507.
- ROBERTS A., GRILLIOT J.P., RAABE M., 1983. Reproduction endocrine control in the tsetse fly (*G. fuscipes*). In : 3rd Int. Symp. Invert. Reprod., 22-27 August, 1983, Federal Republic of Germany. Abstract.
- ROBINSON G.G., 1964. Abnormality in tsetse fly. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, **58** : 579.
- SAUNDERS D.S., 1960. The ovulation cycle in *G. morsitans* West. (Diptera : Muscidae) and a possible method of age determination for female tsetse flies by examination of their ovaries. *Trans. R. ent. Soc. Lond.*, **112** : 221-228.
- SAUNDERS D.S., 1962. Age determination for female tsetse flies and the age composition of samples of *G. pallidipes* Aust., *G. p. fuscipes* Newst. and *G. brevipalpis* Newst. *Bull. ent. Res.*, **53** : 579-595.
- SAUNDERS D.S., 1971. Reproductive abnormalities in the tsetse fly *G. m. orientalis* Vanderplank caused by a maternally acting toxicant in rabbit food. *Bull. ent. Res.*, **60** : 431-438.
- SAUNDERS D.S., PHELPHS R.J., 1970. Reproduction in *Glossina* : Breeding sites. In : Mulligan H.M., Ed. The African Trypanosomiasis. London, U.K., Allen and Unwin, 1970, 950 p.

28. SAUNDERS D.S., DODD C.W.H., 1972. Mating, insemination and ovulation in the tsetse fly *G. morsitans*. *J. Insect Physiol.*, **18** : 187-198.
29. SELLIN E., FEVERIER J., CUISANCE D., HERVY J.P., 1980. The main ovaro-uterine abnormalities found amongst *G. p. gambiensis* at Bobo-Dioulasso Breeding units. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **33** : 295-302.
30. SIMPSON J.J., 1917. Bionomics of tsetse and other parasitological notes in the Gold Coast. *Bull. ent. Res.*, **8** : 193-214.
31. TENABE S.O., 1985. Reproductive status of a wild population of *G. tachinodes* West. (*Diptera* : *Glossinidae*). *Niger. J. Ent.* **6** : 1-4.
32. TOBE S.S., DAVEY K.G., 1972. Volume relationship during pregnancy cycle of the tsetse fly *G. austeni*. *Can. J. Zool.*, **50** : 999-1010.
33. TURNER D.A., MARASHI M.H., 1973. A second incident of reproductive abnormalities in colonised *G. m. morsitans* West. caused by maternally acting toxicant in rabbit food. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, **67** : 292-293.
34. TURNER D.A., SNOW W.F., 1984. Reproductive abnormality and loss in natural population of *G. pallidipes* Austen (*Diptera* : *Glossinidae*) in Kenya. *Bull. ent. Res.*, **24** : 299-309.

AHMED (A.B.), ONYIAH (J.A.), SULEIMAN (S.N.). Troubles de la reproduction dans un élevage en laboratoire de *Glossina palpalis palpalis* Robineau-Desvoidy (*Diptera* : *Glossinidae*). *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1995, **48** (3) : 259-263.

Les troubles de la reproduction ont été utilisés comme paramètre pour l'évaluation de la baisse de fécondité d'une colonie de *G. p. palpalis*. Mille cinq cents femelles, parvenues à différents stades du cycle de la gestation, ont été choisies au hasard au sein de la colonie principale et réparties en dix groupes de 150 individus chacun en fonction de leur âge compris entre 5 et 90 jours. Tous les groupes ont été soumis à une observation au cours des 30 jours suivants et, au terme de cette période, les glossines ont été disséquées. Les résultats ont montré que l'avortement représentait la forme la plus courante des troubles de la fonction de reproduction et la cause principale de la baisse de la fécondité, suivi immédiatement par la pupaison *in utero* des larves parvenues au troisième stade larvaire. L'incidence du blocage ovulaire, de l'échec de l'insémination et de la dégénérescence des follicules de l'embryon ou de l'œuf était faible. On n'a observé aucun cas d'atrophie de l'ovaire. Les avortements d'œufs et de larves ont été enregistrés dans toutes les classes d'âge étudiées, ce qui indique que l'avortement survient à n'importe quel stade du cycle de gestation des femelles. Les troubles de la reproduction ne dépassant pas 3 p. 100 au total, la baisse de la fécondité due à des anomalies de la reproduction dans la colonie de tsé-tsé étudiée est minime.

Mots-clés : *Glossina* - Trouble de la reproduction - Avortement - Nigeria.

AHMED (A.B.), ONYIAH (J.A.), SULEIMAN (S.N.). Desórdenes reproductivos en una colonia de *Glossina palpalis palpalis* Robineau-Desvoidy (*Diptera* : *Glossinidae*) en laboratorio. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1995, **48** (3) : 259-263.

Los desórdenes reproductivos se utilizaron como marco para confirmar la pérdida de fecundidad de una colonia de *G. p. palpalis*. A partir de una colonia principal, se seleccionaron al azar 1 500 hembras en diversos estadios del ciclo de preñez y se dividieron en 10 grupos de 150 individuos, de acuerdo a la edad, variando entre 5 y 90 días. Todos los grupos se observaron durante los siguientes 30 días y luego fueron disecados. El resultado demostró que los abortos constituyen el desorden más frecuente y la principal fuente de pérdida de fecundidad, seguidos de cerca por la puparización *in utero* de larvas de tercer estadio. La incidencia de bloqueo ovular, el fracaso de la inseminación y la degeneración de folículos embrión/huevo fue baja. No se observó atrofia de ovario. Se observaron los huevos abortados y las larvas de todos los grupos estudiados, indicando que el aborto se presenta a cualquier edad del ciclo de preñez. Con un total de desórdenes reproductivos de 3 p. 100, las pérdidas de fecundidad provocadas por anomalías del ciclo reproductivo de las colonias tsetse estudiadas fueron mínimas.

Palabras clave : *Glossina* - Trastorno de la reproducción - Aborto - Nigeria.

Contribution à l'étude de l'émission de *Trypanosoma congolense* par *Glossina morsitans morsitans* (Diptera, Glossinidae) au laboratoire

A.M. Gidudu¹, D. Cuisance², J.M. Reifenberg², J.L. Frézil³

GIDUDU (A.M.), CUISANCE (D.), REIFENBERG (J.M.), FRÉZIL (J.L.). Contribution à l'étude de l'émission de *Trypanosoma congolense* par *Glossina morsitans morsitans* (Diptera, Glossinidae) au laboratoire. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1995, 48 (3) : 264-270.

Le processus d'émission des trypanosomes est étudié chez *Glossina morsitans morsitans* expérimentalement infectée par *Trypanosoma congolense* EATRO 325 (type savannah). La technique utilisée est la salivation provoquée sur lame chauffée (38 °C) pendant 5 minutes. L'influence de divers supports (PSG, sang, PSG + ATP) est évaluée. Quel que soit le sexe, les pourcentages d'infections décelés par cette technique ne diffèrent pas significativement selon l'utilisation de PSG ou de sang. La détection des parasites par examen microscopique du salivat montre que 75 à 100 p. 100 des mâles émettent des trypanosomes au cours des sondages successifs, alors que 30 à 100 p. 100 des femelles sont détectées positives selon le même protocole. Le nombre de trypanosomes émis par individu varie fortement au cours du temps avec une moyenne de 48,4 (dont 32,5 métatrypanosomes infectants) pour les mâles et de 19,3 (dont 12,2 métatrypanosomes infectants) pour les femelles avec une proportion croissante des formes courtes. L'adjonction d'ATP n'affecte pas la proportion de glossines trouvées positives, mais semble favoriser l'éjection des trypanosomes, notamment des formes infectantes. Ces résultats sont discutés par rapport aux relations vecteurs-parasites et à la compétence vectorielle de *G. morsitans morsitans* vis-à-vis d'un parasite appartenant au sous-genre *Nannomonas*.

Mots-clés : *Trypanosoma congolense* - Trypanosomose - *Glossina* - Maladie transmise par vecteur - Salive.

INTRODUCTION

En zone subhumide et humide d'Afrique, l'épidémiologie des trypanosomoses humaines et animales est étroitement associée aux glossines avec cependant une grande variation du risque trypanosomien. Celui-ci est en particulier tributaire de la « capacité vectorielle » qui est liée à la fois à des facteurs extrinsèques (le milieu) mais surtout à des facteurs intrinsèques dépendants de la glossine. Ces derniers déterminent sa « compétence vectorielle », c'est-à-dire l'aptitude de l'insecte vecteur à s'infecter, à permettre la maturation des trypanosomes et à les transmettre à l'hôte mammifère (19). Dans des foyers de maladie, la connaissance du statut infectant du vecteur est d'un grand intérêt. Chez les glossines, il se traduit par l'émission de trypanosomes infectants au moment de la piqûre, du fait de la présence de ces formes dans le salivat transitant par l'hypopharynx (transmission cyclique)

ou dans les parties distales souillées du proboscis (transmission mécanique).

Tant en situation enzootique qu'épizootique, il est important de connaître la circulation du parasite à un instant donné chez les vecteurs, ce qui nécessite sur le terrain la dissection des glossines (tube digestif, glandes salivaires, proboscis), technique très incertaine pour caractériser les trypanosomes. Au laboratoire, l'utilisation de sourceaux permet de connaître l'infectivité d'une glossine (17) mais cette méthode est longue et impraticable sur le terrain.

La salive est porteuse de trypanosomes métacycliques infectants et donne à la glossine son caractère de vecteur. Elle constitue un milieu translucide facile à observer (2) ou à utiliser pour l'application de biotechnologies (PCR* et sondes ADN** (4, 8, 9, 10). De plus, il apparaît d'un grand intérêt de connaître dans le temps l'émission de trypanosomes, son caractère permanent ou transitoire, pour mieux comprendre la compétence vectorielle des glossines. Ce type d'évaluation nécessite le suivi d'une glossine au cours de sa vie.

Une première étude (5) sur le comportement de piqûre et de salivation a permis de retenir certains facteurs favorisant le réflexe de sondage sur lame chauffée (1). Les performances les plus remarquables étant obtenues avec *Glossina morsitans morsitans* infectée par *Trypanosoma congolense*, ce couple est retenu dans cette seconde partie de l'étude.

MATÉRIEL et MÉTHODE

Glossina morsitans morsitans Westwood, 1850, originaire du Zimbabwe, provient de l'élevage commun CIRAD-ORSTOM de Montpellier. *Trypanosoma* (*Nannomonas*) *congolense* Broden, 1904, souche EATRO 325 (type savannah) a été isolée en Ouganda en 1962 (21). Des lapins (néo-zélandais) de 2,5 à 4 kg, inoculés par voie I.V. avec cette souche sont utilisés pour l'infection des mouches ténérales (1-2 jours) tandis que des lapins sains servent ultérieurement à leur alimentation quotidienne. Les glossines sont mises individuellement en position de sonder une microgoutte de liquide (10 µl), sang hépariné ou PSG (phosphate buffered saline glucose), déposée sur une lame chaude (38 °C ± 1) après un jeûne de 72 heures.

1. Ministry of Agriculture, Animal Industry and Fisheries, Department of Entomology, PO Box 201, Entebbe, Ouganda.

2. CIRAD-EMVT, c/o ORSTOM, Département Santé, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France.

3. ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France.

Reçu le 24.3.1995, accepté le 4.12.1995.

* Polymerase Chain Reaction.

** Méthode d'hybridation moléculaire.

Suivi individuel des glossines

Deux lots expérimentaux sont constitués :

- Les glossines du premier lot (40 femelles et 11 mâles) prennent les trois premiers repas de sang sur un lapin infecté (parasitémie de 1 à $2 \cdot 10^6$ trypanosomes/ml). A un âge de 20 à 45 jours, chaque glossine est placée en position de sonder une goutte de PSG sur la lame chaude.

Les glossines trouvées positives sont placées dans une cage individuelle et leur salivat sera examiné toutes les 72 heures avec la même technique (PSG), soit 6 fois pendant 20 jours.

Les glossines trouvées négatives sont testées 72 heures plus tard par sondage d'une goutte de sang hépariné. Puis, elles sont éliminées.

- Les glossines du deuxième lot (23 femelles et 31 mâles) prennent les 3 premiers repas sur un lapin infecté, mais, à l'âge de 20 à 45 jours, chaque glossine est amenée individuellement à sonder une goutte de sang hépariné.

Les glossines trouvées positives sont placées en cage individuelle et seront testées par sondage dans une goutte de PSG toutes les 72 heures, soit 6 fois pendant 20 jours.

Les glossines trouvées négatives sont testées 72 heures plus tard dans une goutte de PSG puis éliminées.

L'emploi dans un cas du PSG et dans l'autre du sang a pour objet de comparer la capacité de chaque liquide à stimuler la salivation et donc à révéler la présence de trypanosomes. Lorsque celle-ci est acquise, le PSG est le milieu de sondage retenu pour les essais suivants du fait de la visualisation plus aisée des trypanosomes au microscope et de sa facilité de préparation (5).

Suivi groupé de glossines

L'objectif n'est pas ici un suivi individuel, mais le suivi du pourcentage moyen de glossines trouvées infectantes dans chaque groupe.

Deux lots de 30 glossines femelles ténérables sont nourris à raison de trois repas consécutifs sur un lapin infecté par *T. congolense*. Elles seront alimentées pour le reste de leur vie sur un lapin sain. A partir du 25^e jour après le premier repas infectant, les mouches du premier lot sont individuellement amenées à sonder une microgoutte de PSG placée sur une lame chaude, puis elles sont rassemblées dans une même cage. Elles seront testées de la même manière à intervalle de 72 heures au cours de 6 essais.

Le même protocole est utilisé pour le deuxième lot de 30 femelles mais en ajoutant de l'ATP (adénosine 5' triphosphate, SIGMA Chimie) à raison de 0,014 g/20 ml PSG.

Chez les glossines, l'ATP est détecté par des chimiorécepteurs labellaires et induit fortement le réflexe de gorgement *in vitro* (3).

En fin d'expérience, les glossines de ces groupes sont disséquées.

RÉSULTATS

Présence de trypanosomes dans le salivat

Sans tenir compte du liquide de sondage utilisé (PSG ou sang), l'examen de 40 champs microscopiques par individu montre globalement que les pourcentages de glossines trouvées infectées au niveau du proboscis semblent plus importants chez les femelles (28,1 p. 100) que chez les mâles (14,6 p.100) mais il n'y a pas de différence significative ($\Sigma = 1,57$; N.S.). Que ce soit pour les mâles ou pour les femelles considérés séparément, l'emploi du PSG ou du sang hépariné ne change pas le pourcentage de révélation d'infections trypanosomiennes ($\Sigma = 1,58$; N.S. et $\Sigma = 0,49$; N.S.) (tableau I).

Ceci est confirmé par le fait que, chez les glossines femelles (les plus nombreuses) trouvées positives, le changement du support liquide de sondage (remplacement du PSG par le sang et vice versa) ne modifie pas le pourcentage de détection de *T. congolense* ($\Sigma = 0,05$ dans le sens PSG - sang ; N.S.) ($\Sigma = 0,09$ dans le sens sang-PSG ; N.S.) (tableau II).

TABLEAU I

Glossines mâles et femelles détectées infectées après sondage dans du PSG (1^{er} lot) ou du sang hépariné (2^e lot) (couple *G. morsitans* / *Trypanosoma congolense*)

	Mâles		Femelles	
	1 ^{er} lot PSG	2 ^e lot Sang	1 ^{er} lot PSG	2 ^e lot Sang
Nombre (p. 100)	3/10 (30,00)	3/31 (9,70)	9/35 (25,70)	7/22 (31,80)
	6/41 (14,60)		16/57 (28,10)	

TABLEAU II

Positivité comparée du salivat par sondage d'abord dans le PSG puis dans le sang chez toutes les femelles, puis chez les femelles trouvées négatives en inversant le milieu de sondage

	1 ^{re} expérience (toutes les femelles)		2 ^e expérience (femelles trouvées négatives)	
	PSG	Sang	Sang	PSG
Nombre (p. 100)	9/35 (25,70)	7/22 (31,80)	4/16 (25,0)	5/15 (33,30)

Emission des trypanosomes dans le temps

Six mâles et 15 femelles âgés de 40 jours et dont le salivat est positif à cet âge sont suivis individuellement et soumis à un sondage dans une micro-goutte de PSG toutes les 72 heures.

Caractère positif du salivat dans le temps

La détection de *Trypanosoma congolense* par examen microscopique du salivat montre que, toutes les 72 heures, entre 75 et 100 p.100 de l'effectif mâle de *G. m. morsitans* émet des trypanosomes lors des 4 tests successifs de sondage sur lame chaude (moy. = 85,4 ; e.t.* = 10,4) (figure 1).

Chez les 15 femelles, entre 30 et 100 p.100 (moyenne : 60,5 ; e.t. = 24,7) des individus sont trouvés positifs au cours des 6 tests espacés de 72 heures.

Quantité de trypanosomes dans le salivat

Chez les mâles (figure 2), le nombre de trypanosomes émis par individu fluctue fortement dans le temps de 1 à 200 avec une moyenne par essai variant de 6,6 à 126,6 (moyenne sur la totalité des essais = 48,4 ; e.t. = 55,3). Chez les femelles, cette quantité fluctue de 1 à 232 avec une moyenne par essai de 3,6 à 38,7 (moyenne = 19,3 ; e.t. = 14,8) (figure 2). Le petit effectif de mâles ne permet pas de comparer les sexes.

Formes des trypanosomes

Chez les deux sexes, on observe la présence dans le salivat à la fois de formes longues attribuées à des épi-mastigotes et de formes courtes attribuées à des métatrypanosomes infectants. Par individu, les quantités éjectées des formes longues sont dans l'ensemble minoritaires par rapport aux formes courtes.

Chez les mâles, au cours de chaque essai, les formes courtes varient de 2,6 à 126,3 par individu avec une moyenne de 32,5 métatrypanosomes pour la totalité des essais (e.t. = 58,6). Chez les femelles, on compte de 2,7 à 30,7 formes courtes par individu avec une moyenne de 12,2 métatrypanosomes (e.t. = 11,7).

Sur une période de 15 j. d'observation pour les mâles (4 essais espacés de 72 h) et de 21 j. chez les femelles (6 essais espacés de 72 h), on observe une proportion croissante des formes courtes au détriment des formes longues (figures 3 et 4). Les variations apparaissent fortes entre individus et d'un essai à l'autre.

* Ecart-type de l'échantillon.

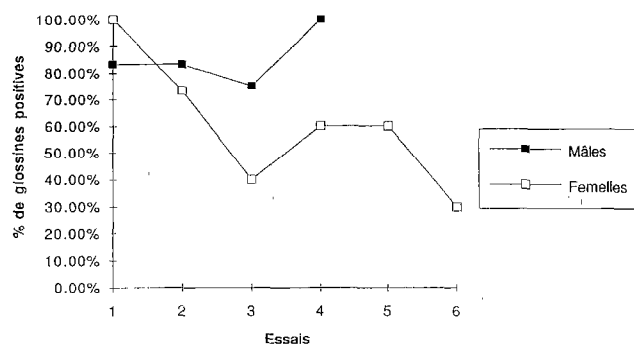


Figure 1 : Positivité des salivats dans le temps : évolution des pourcentages de *G. m. morsitans* trouvées porteuses de *T. congolense* chez 6 mâles et 15 femelles suivis individuellement (sondages espacés de 72 h sur une goutte de PSG chauffée).

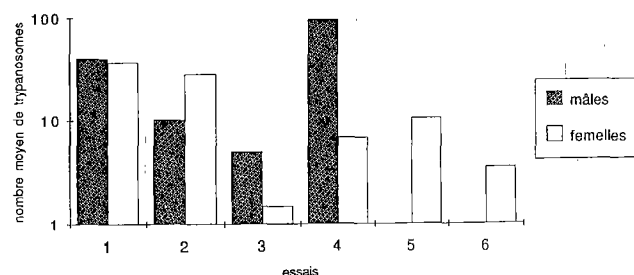


Figure 2 : Nombre moyen de trypanosomes émis par les mâles et les femelles au cours des différents essais.

L'inversion des proportions s'effectue entre le 2^e et le 3^e essai chez les mâles et entre le 1^{er} et le 2^e essai chez les femelles (figures 3 et 4).

Effet de l'addition d'ATP

Les proportions de *G. m. morsitans* femelles trouvées positives par sondage sur support liquide (PSG) avec addition ou non d'ATP, utilisé comme phagostimulant, montrent que (tableau III) :

- avec l'ATP, 11,7 p.100 des salivats de glossines sont trouvés positifs avec une émission moyenne de 38,4 trypanosomes par individu (variation de 2,5 à 72,3 ; e.t. = 26,3) ;

- sans ATP, 24,9 p.100 des salivats sont trouvés positifs avec une émission moyenne de 23,3 trypanosomes par individu (variation de 5,5 à 29,2 ; e.t. = 9,5).

Les proportions de glossines trouvées infectées entre les deux lots sont significativement différentes ($\Sigma = 3,07$; H.S.). Il n'y a pas eu accroissement du nombre d'individus émettant *T. congolense* en utilisant l'ATP.

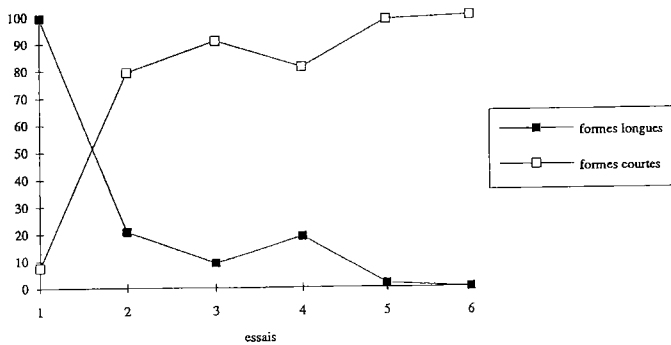


Figure 3 : Evolution des proportions de formes longues et courtes de *T. congolense* au cours de 6 essais espacés de 72 h chez *G. m. morsitans* femelles.

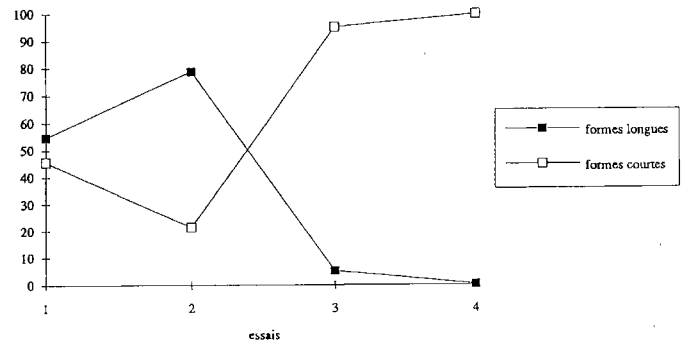


Figure 4 : Evolution des proportions de formes longues et courtes de *T. congolense* au cours de 4 essais espacés de 72 h chez *G. m. morsitans* mâles.

Par contre, dans ce même lot qui sonde dans une goutte de PSG additionné d'ATP, le nombre moyen de trypanosomes par individu (38,4) est significativement supérieur à celui du lot ne recevant pas d'ATP (18,0) ($\Sigma = 2,90$; S). De plus, avec l'ATP utilisé dans les lots de femelles, la proportion de formes courtes apparaît élevée dès le 1^{er} essai (figure 5a) alors que, sans ATP, l'émission ne s'accroît qu'après le 4^e essai (figure 5b).

Les résultats parasitologiques obtenus par la dissection des glossines en fin d'observation ne montrent pas de différence avec ceux de la salivation, tant pour le groupe PSG avec ATP ($\Sigma = 0,87$; N.S.) que pour le groupe PSG sans ATP ($\Sigma = 0,83$; N.S.).

DISCUSSION

Du fait de la charge de travail liée aux manipulations individuelles des glossines, les effectifs en observation sont limités et par conséquent petits. Toutefois, ces résultats confirment les chiffres obtenus par Lamine Dia (comm.

pers.) avec la même sous-espèce de glossine et la même souche de *T. congolense*.

Si le support liquide de sondage (PSG ou sang hépariné) améliore le comportement de sondage (5), l'un n'entraîne pas par rapport à l'autre d'amélioration dans le pourcentage révélé d'infections trypanosomiennes. Les deux permettent une meilleure observation à l'état frais des trypanosomes présents (mobilité dans un substrat liquide).

Le suivi individuel toutes les 72 heures des glossines mâles et femelles reconnues infectées montre que l'état infectant détecté par l'examen microscopique du liquide de sondage (PSG) n'apparaît pas être de 100 p. 100 à chaque essai, et ceci pour les deux sexes. Il reste cependant très élevé en particulier chez les mâles, où il est supérieur à 75 p. 100, mais concerne des petits effectifs. Chez les 15 femelles, il apparaît plus fluctuant.

La salive étant obtenue très artificiellement (lame chauffée), son émission et celle des trypanosomes localisés dans l'hypopharynx ne sont peut-être pas optimales.

TABLEAU III

Emission de *T. congolense* dans le temps par *G. m. morsitans* femelles après sondage du proboscis dans une goutte chauffée de PSG additionnée ou non d'ATP (0,014 g/20 ml)

Essai n°		1	2	3	4	5	6	Total (p. 100)
PSG avec ATP	Nombre de glossines	30	30	28	26	26	22	162
	Salivats positifs	4	6	2	3	2	2	19 (11,7)
	Formes courtes	162	251	13	53	2	25	506 (69,2)
	Formes longues	2	183	1	36	3	0	225 (30,8)
	Nombre de trypanosomes/glossine	41,0	72,3	7,0	29,6	2,5	12,5	Moy. = 38,4 (e.t. = 26,3)
PSG sans ATP	Nombre de glossines	30	30	30	30	25	24	169
	Salivats positifs	7	7	10	8	4	6	42 (24,9)
	Formes courtes	35	51	92	29	115	47	369 (48,8)
	Formes longues	131	121	116	15	2	2	387 (51,2)
	Nombre de trypanosomes/glossine	23,7	24,5	20,8	5,5	29,2	8,1	Moy. = 18,0 (e.t. = 8,7)

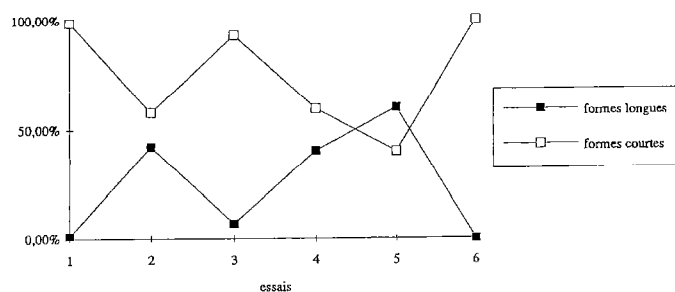


Figure 5a: Emission des formes longues et courtes de *T. congolense* dans une goutte chauffée de PSG avec ATP au cours de 6 essais chez un groupe de *G. m. morsitans* femelles.

Youdeowei (23) observe en effet que l'émission de salive chez *G. m. morsitans* a lieu non pas au moment du percement d'une membrane alaire de chauve-souris, mais principalement juste après, sous forme d'un flot important déposé dans les tissus de l'hôte. Celui-ci n'est peut-être pas aussi massif lorsqu'il s'agit de l'attouchement d'une lame chaude, l'éjection des trypanosomes n'étant pas favorisée par la pénétration mécanique du support ou par des stimuli gustatifs et olfactifs.

Ce caractère positif variable du salivat observé en microscopie optique reste à confirmer par les biotechnologies, la PCR en particulier, pour s'assurer qu'un très faible nombre de trypanosomes émis au cours des sondages n'échappe pas à l'observateur.

Le contact avec un substrat artificiel n'induit probablement pas une décharge unique de salive comme dans un tissu vivant. En effet, il apparaît qu'une glossine peut émettre des trypanosomes au moins dans 10 gouttes de PSG qui lui sont présentées successivement en moins de 2 minutes (travaux en cours), montrant ainsi ses capacités de décharge parasitaire intermittente *in vitro* (23). Ceci est un facteur important d'amplification de la capacité vectorielle (nombre de nouvelles infections par situation et par jour) pouvant expliquer les fortes prévalences chez le bétail par rapport aux relativement faibles prévalences chez les glossines sur le terrain.

Les quantités de *T. congolense* émises varient beaucoup par individu et à l'occasion de chaque test. Dans tous les cas, on observe l'émission d'un mélange de formes longues et de formes courtes avec une domination croissante des formes courtes métacycliques. Il est connu en effet que des épimastigotes du labre et des formes trypanostigotes longues venant du proventricule peuvent être régurgitées (16).

Mawuena *et al.* (14), avec le même couple *G. m. morsitans* / *T. congolense* et la même technique de salivation sur lame chaude (jeûne de 24 h mais sans support liquide) trouvent des résultats très voisins avec une émission moyenne de 31,7 métatrypanosomes infectants par glossine (tous sexes confondus) et une domination progressive des formes courtes sur les formes longues avec le

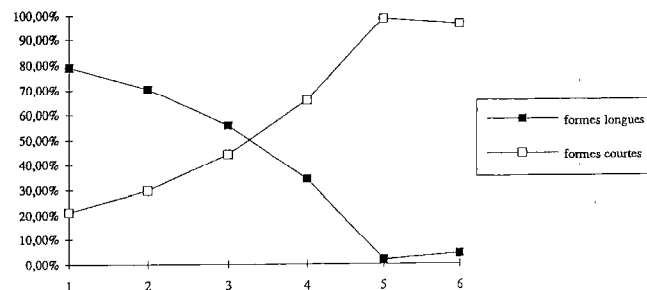


Figure 5b: Emission des formes longues et courtes de *T. congolense* dans une goutte chauffée de PSG sans ATP au cours de 6 essais chez un groupe de *G. m. morsitans* femelles.

temps. Selon ces auteurs, le nombre moyen de métatrypanosomes éjectés pourrait être lié au nombre initial de repas infectants pris par la glossine.

Toutefois, sachant qu'un seul trypanosome sanguin peut infecter une glossine « réceptive » (13), il semble plus probable que l'installation de l'infection intestinale chez la glossine et surtout la maturation des trypanosomes jusqu'à l'obtention des formes infectantes dans l'appareil piqueur, soient dépendantes des niveaux d'activité enzymatique du tube digestif et des niveaux de lectines qui donnent les messages de migration, mais surtout de transformation et de maturation des trypanosomes au cours de leur cycle (11, 12, 22). Les différences de niveaux des lectines intestinales entre sexes pourraient expliquer l'évolution du rapport entre formes longues et formes courtes qui apparaît ici avec une inversion des proportions plus précoce chez les femelles que chez les mâles qui reste à confirmer (expérience en cours).

L'adjonction d'ATP n'a pas affecté la proportion de glossines trouvées positives. L'ATP est utilisé classiquement dans les élevages de masse de glossines nourries sur membrane de silicone (6) pour stimuler le réflexe de piqûre, car ce nucléotide et d'autres analogues de l'ATP (3) sont détectés par des chimiorécepteurs de l'extrémité du labium (20) et accroissent le comportement de piqûre/gorgement de la glossine (15), ce qui laissait espérer une meilleure salivation et donc une émission facilitée des trypanosomes de l'hypopharynx. Les proportions de salivats positifs n'ont pas été accrues pour les lots de femelles sondant sur le PSG additionné d'ATP par rapport à celui ne recevant pas d'ATP. Toutefois, bien que nourris initialement au même moment et sur le même lapin infectant, les deux lots n'ont pas acquis forcément la même prévalence d'infection au niveau du proboscis.

En revanche, le nombre moyen de trypanosomes par salivat est pratiquement double dans le lot sondant le PSG additionné d'ATP (38,4 contre 18 trypanosomes/glossine/essai). Si l'ATP semble donc favoriser l'éjection des trypanosomes, cet effet s'exerce tout particulièrement vis-à-vis des formes courtes.

La maturation de *T. congolense* semble se dérouler assez tardivement (glossines de 25-30 jours) et se pour-

suivre (effondrement du nombre de formes épimastigotes et augmentation du nombre de formes courtes) au cours des sondages après 30 jours d'âge. Des études menées sur le même couple vecteur-parasite (7) ont montré que 25 p.100 des glossines ont été décelées positives grâce à la technique de salivation entre le 12^e et le 40^e jour après le repas infectant.

Il est surprenant d'observer des pourcentages élevés de formes longues chez des glossines âgées de 40 jours. Des expériences en cours sur un suivi du même couple *G. m. morsitans/T. congolense* mais menées depuis l'éclosion des mouches confirment la présence d'un pourcentage de formes longues ayant certes tendance à baisser dans le temps mais pouvant atteindre 50 p.100 entre 40 et 50 jours traduisant un processus de maturation continu avec l'âge.

CONCLUSION

Le couple vecteur-parasite *Glossina morsitans-Trypanosoma congolense* est un modèle couramment exploité dans des études expérimentales. En effet de forts pourcentages d'infections matures peuvent être obtenus en laboratoire. De plus, en milieu naturel, les glossines appartenant au groupe *morsitans* sont reconnues comme d'excellents vecteurs des trypanosomoses animales, notamment du type *Nannomonas*.

Cette étude a permis d'évaluer plus précisément la technique de salivation sur lame chauffée et d'apporter quelques éléments d'amélioration pour détecter la présence des parasites chez une glossine infectante sans avoir à la disséquer. Elle confirme et complète les résultats précédemment obtenus par d'autres auteurs grâce à une technique délaissée pour le travail fastidieux qu'elle impose. Néanmoins, elle permet de travailler sur des glossines infectées vivantes et d'appréhender concrètement quelques aspects physiologiques et comportementaux des relations parasites-vecteurs.

La réhabilitation de ces techniques associée à la maîtrise des technologies moléculaires (PCR notamment) laisse entrevoir d'intéressantes perspectives de recherches actuellement mises en œuvre. L'apport de ces études de laboratoire est de mieux comprendre le comportement des glossines infectées dans la nature pour mieux préciser leur rôle parfois obscur dans l'épidémiologie de la maladie.

Bibliographie

- BURT E., 1946. Salivation by *Glossina morsitans* on to glass slides : a technique for isolating infected flies. *Ann. trop. Med. Parasit.*, **40** : 141-144.
- FAIRBAIRN H., WILLIAMSON J., 1956. The composition of tsetse fly saliva. I. A histochemical analysis. *Ann. trop. Med. Parasit.*, **50** : 322-333.
- GALUN R., KABAYO J.P., 1988. Gorging response of *Glossina palpalis palpalis* to ATP analogues. *Physiol. Entomol.*, **13** : 419-423.
- GIBSON W.C., DUKES P., GASHUMBA J.K., 1988. Species specific DNA probes for identification of African trypanosomes in tsetse flies. *Parasitology*, **97** : 63-73.
- GIDUDU A.M., CUISANCE D., REIFENBERG J.M., FRÉZIL J.L., 1995. Amélioration de la technique de salivation des glossines pour la détection des métatrypanosomes infectants : étude de quelques facteurs biologiques et non biologiques sur le comportement de sondage des glossines. *Rev. Élev. Méd. vét. Pays trop.*, **48** (2) : 153-160.
- ITARD J., BAUER B., 1984. Elevages des glossines. Synthèse. *Rev. Élev. Méd. vét. Pays trop.*, **37** (n° spécial) : 143-175.
- LADIKPO E., 1989. Relation vecteur-parasite au cours du cycle de *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* chez *Glossina morsitans morsitans* : étude structurale et ultrastructurale. Thèse doct., Spécialité Sciences biologiques, Parasitologie, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France, 144 p.
- McNAMARA J.J., SNOW W.F., 1990. Improved identification of *Nannomonas* infections in tsetse flies from The Gambia. *Acta trop.*, **48** : 127-136.
- MAJIWA P.A.O., THATTHI R., MOLOO S.K., NYEKO J.H.P., OTIENO L.H., MALOO S., 1994. Detection of trypanosome infections in the saliva of tsetse flies and buffy-coats samples from antigenaemic and aparasitaemic cattle. *Parasitology*, **108** : 312-322.
- MASIGA D.K., SMYTH A.J., HAYES P., BROMIDGE T.J., GIBSON W.C., 1992. Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *Int. J. Parasit.*, **22** : 909-918.
- MAUDLIN I., 1991. Transmission of African trypanosomiasis : interactions among tsetse immune system, symbionts and parasites. In : Kerry F.H. ed., *Advances in Disease Vector Research*, 7. New York, USA, Springer Verlag, p. 117-148.
- MAUDLIN I., WELBURN S.C., 1988. The role of lectins and trypanosome genotype in the maturation of midgut infections in *Glossina morsitans*. *Trop. Med. Parasit.*, **38** : 167-170.
- MAUDLIN I., WELBURN S.C., 1989. A single trypanosome is sufficient to infect a tsetse fly. *Ann. trop. Med. Parasit.*, **83** : 431-433.
- MAWUENA K., DOUMEY K., AKAKPO K., 1984. Nombre probable de *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* transmits par *Glossina morsitans morsitans*. *Rev. Élev. Méd. vét. Pays trop.*, **37** (n° spécial) : 186-191.
- MITCHELL B.K., 1976. Physiology of an ATP receptor in labellar sensilla of the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *Westw. J. exp. Biol.*, **65** : 259-271.
- MULLIGAN H.W., POTTS W.H., 1950. *The African trypanosomiasis*. London, U.K., George Allen and Unwin Ltd., 950 p.
- NITCHEMAN S., JACQUIET P., 1990. Utilisation de souriceaux pour la mise en évidence de l'infectivité des glossines. *Rev. Élev. Méd. vét. Pays trop.*, **43** : 219-223.
- OTHIENO L.H., 1993. Inadequacy of the dissection method for estimating trypanosome infection rates. *Ann. trop. Med. Parasit.*, **77** : 329-330.
- REISEN W.H., 1989. Estimation of vectorial capacity : introduction. *Bull. Soc. Vector Ecol.*, **14** : 39-40.
- RICE M.J., GALUN R., MARGALIT J., 1973. Mouthpart sensilla of the tsetse fly and their function : labial sensilla. *Ann. trop. Med. Parasit.*, **67** : 101-107.
- UILENBERG G., MAILLOT L., GIRET M., 1973. Etudes immunologiques sur les trypanosomes. II. Observations nouvelles sur le type antigénique de base d'une souche de *Trypanosoma congolense*. *Rev. Élev. Méd. vét. Pays trop.*, **26** : 27-35.
- WELBURN S.C., ARNOLD K., MAUDLIN I., GOODAY G.W., 1993. Rickettsia-like organisms and chitinase production in relation to transmission of trypanosomes by tsetse flies. *Parasitology*, **107** : 141-145.
- YOUDEOWEI A., 1975. A simple technique for observing and collecting the saliva of tsetse flies (Diptera, Glossinidae). *Bull. ent. Res.*, **65** : 65-67.

A.M. Gidudu D. Cuisance J.M. Reifenberg J.L. Frézil

GIDUDU (A.M.), CUISANCE (D.), REIFENBERG (J.M.), FRÉZIL (J.L.). Contribution to the study of the ejection of *Trypanosoma congolense* by *Glossina morsitans morsitans* (Diptera, Glossinidae) in the laboratory. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1995, **48** (3) : 264-270.

The process of trypanosome ejection was studied in *Glossina morsitans morsitans* experimentally infected with *Trypanosoma congolense* EATRO 325 (savannah type). The technique used was that of salivation on warm slides (38 °C) for 5 minutes. The effect of various media (PSG, blood, PSG + ATP) was evaluated. Whatever the sex of the flies, the percentages of infections revealed by this technique do not differ significantly using either PSG or blood. Detection of parasites by microscopic examination of saliva showed that 75 to 100 % of the males eject trypanosomes during successive probes, whereas 30 to 100 % of the females were found to be positive using the same procedure. The number of trypanosomes ejected per fly varied greatly in the course of time, with an average of 48.4 (of which 32.5 were infective metatrypanosomes) among the males and 19.3 (of which 12.2 were infective metatrypanosomes) among the females, with an increasing proportion of stumpy forms. Addition of ATP did not affect the proportion of flies found positive, but seemed to favour the ejection of trypanosomes notably stumpy infectant forms. These results are discussed by comparing the aspects of the vector-parasite relationships and the vectorial capacity of *G. morsitans morsitans* with a parasite belonging to the subgenus *Nannomonas*.

Key words : *Trypanosoma congolense* - Trypanosomosis - *Glossina* - Vectorborne disease - Saliva.

GIDUDU (A.M.), CUISANCE (D.), REIFENBERG (J.M.), FRÉZIL (J.L.). Contribución al estudio de la eliminación de *Trypanosoma congolense* por parte de la *Glossina morsitans morsitans* (Diptera, Glossinidae), bajo condiciones de laboratorio. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1995, **48** (3) : 264-270.

Se estudió el proceso de eliminación de tripanosomas por parte de la *Glossina morsitans morsitans*, infectada en forma experimental con *Trypanosoma congolense* EATRO 325 (tipo savannah). Se utilizó la técnica de la salivación inducida sobre lámina caliente (38 °C), durante 5 min. Se evaluó también la influencia de los diversos tipos de soporte (PSG, sangre, PSG + ATP). Se obtuvieron los porcentajes de infección, independientemente del sexo, los cuales no difieren significativamente mediante esta técnica, con la utilización de PSG o de sangre. La detección de parásitos por medio del examen microscópico de la saliva demuestra que 75 a 100 por ciento de los machos eliminan los tripanosomas durante diversos exámenes sucesivos, mientras que 30 a 100 por ciento de las hembras se detectaron positivas únicamente en el curso de un mismo protocolo. La cantidad de tripanosomas eliminados por individuo varía en forma importante con el tiempo, con un promedio de 48,4 (de los cuales 32,5 metatripanosomas infectantes) para los machos y de 19,3 (de los cuales 12,2 metatripanosomas infectantes) para las hembras, con una proporción creciente de formas cortas. La adición de ATP no afecta la proporción de glosinas positivas, pero parece favorecer la eliminación de tripanosomas, sobre todo de las formas infectantes. Se discuten los resultados en cuanto a las relaciones vector-parásito y a la capacidad vectorial de *G. morsitans morsitans*, con respecto a un parásito perteneciente al sub género *Nannomonas*.

Palabras clave : *Trypanosoma congolense* - Tripanosomosis - *Glossina* - Enfermedad transmitida vector - Saliva.

Communications

Facteurs de variation des indicateurs plasmatiques du statut nutritionnel en oligo-éléments chez le dromadaire au Maroc

I. Valeurs usuelles et variations physiologiques

M. Bengoumi¹B. Faye²K. El Kasmi¹J.C. Tressol³

BENGOUMI (M.), FAYE (B.), EL KASMI (K.), TRESSOL (J.C.). Facteurs de variation des indicateurs plasmatiques du statut nutritionnel en oligo-éléments chez le dromadaire au Maroc. I. Valeurs usuelles et variations physiologiques. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1995, **48** (3) : 271-276

Trois essais réalisés dans des contextes climatiques et alimentaires différents (Guelmim, Laâyoune, Tadla) et concernant au total 125 dromadaires ont été mis en œuvre en vue de préciser le statut nutritionnel en cuivre et zinc des camelins au Maroc. Les valeurs moyennes régionales ont varié de 65 à 102 µg/100 ml pour la cuprémie, et de 38 à 59 µg/100 ml pour la zincémie. Exception faite de l'effet de l'âge sur la zincémie, plus élevée chez les jeunes, il n'y a aucune variation significative de la cuprémie et de la zincémie en fonction des facteurs physiologiques (âge, sexe). Les résultats sont discutés en fonction des variations des apports alimentaires dans les différents essais.

Mots clés : Dromadaire - Alimentation - Cuivre - Zinc - Plasma sanguin - Maroc.

Introduction

A l'exception des minéraux d'intérêt biologique tels que le calcium ou le sodium, la concentration plasmatique des éléments majeurs et des éléments-traces constitue généralement un bon indicateur du statut nutritionnel des animaux en ces minéraux (17). En dépit des quelques données disponibles dans la littérature concernant les valeurs usuelles des concentrations plasmatiques des minéraux chez le dromadaire (5, 13), il est difficile de statuer sur leur intérêt dans l'évaluation de l'état nutritionnel de cette espèce.

1. Laboratoire de Biochimie clinique et nutritionnelle, I.A.V. Hassan II, BP 6202, Rabat-Instituts, Maroc.

2. Laboratoire d'Ecopathologie, INRA-Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France.

3. Laboratoire des Maladies nutritionnelles, INRA-Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France.

Reçu le 26.6.1995, accepté le 20.12.1995.

Parmi les éléments mineurs, le cuivre et le zinc sont les plus couramment étudiés, du fait de l'importance de leur rôle dans de nombreux processus métaboliques, sous forme de cofacteurs enzymatiques, et du fait de la facilité relative de leur dosage dans le plasma. Les carences en éléments-traces peuvent entraîner des perturbations métaboliques se traduisant par une diminution des performances de production et de reproduction. Chez le dromadaire, les concentrations plasmatiques sont assez peu étudiées et l'expression clinique des carences plutôt mal connue (13).

L'objectif du présent article est de déterminer les concentrations plasmatiques en cuivre (Cu) et en zinc (Zn) chez le dromadaire dans les conditions climatiques, alimentaires et zootechniques prévalant au Maroc. Les observations réalisées dans différentes situations doivent permettre de proposer des valeurs de référence pour cette espèce.

Matériel et méthodes

Animaux et dispositifs expérimentaux

Trois essais mis en œuvre dans des contextes différents (respectivement dans la région de Guelmim, à Laâyoune et à Tadla) sont proposés (fig. 1) :

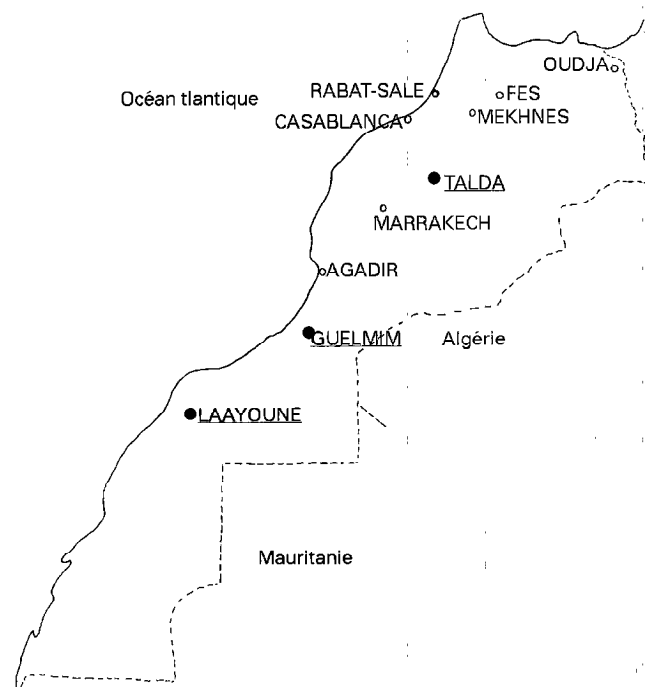


Figure 1 : Emplacement des essais sur le territoire marocain.

Communication

Essai 1

La première étude a été réalisée sur un effectif de 60 dromadaires : 20 mâles âgés de 4 à 15 ans, 20 chamelles en début de lactation âgées de 4 à 12 ans et 20 chameçons âgés de moins de 2 mois. Les animaux étaient conduits en système nomade dans la région de Guelmim, au sud du Maroc, c'est-à-dire dans un contexte climatique aride sous influence océanique. Les femelles étaient traitées une fois par jour, le matin. La production laitière était d'environ 2 000 litres par an et l'allaitement durait plus de 6 mois. L'alimentation reposait uniquement sur les parcours naturels en saison humide (octobre-mai) et sur les chaumes de céréales en saison sèche (juin-septembre). Les principaux fourrages ingérés pendant la saison humide étaient, pour les plantes herbacées, *Aristida pungens* et *Rumex vesicarius*. Les plantes ligneuses les plus consommées étaient *Ziziphus lotus*, *Europhobia echinusus*, *Salsolla* sp., *Atriplex hatinus*, *Zycophyllum gastulum*, *Frankenia thymifolia*, *Launea arborescens* et *Ozyris alba*.

Les animaux étaient déparasités deux fois par an (distribution d'albendazole *per os* et spray antiparasitaire externe à base de tétrachlorure de carbone). Ils étaient en bon état de santé au moment des prélèvements. Les animaux suspects de maladies infectieuses pouvant influencer les concentrations plasmatiques des éléments-traces, ont été écartés. Un seul prélèvement par animal a été réalisé dans le courant du mois de mars, période caractérisée par une alimentation verte abondante et un meilleur état d'embonpoint des animaux.

Essai 2

La seconde étude a concerné un troupeau comprenant 30 chamelles suitées, âgées de 6 à 10 ans. Les animaux appartenaient à la station de Recherches camelines de Laâyoune, dans la zone saharienne du Maroc. Durant la période où les prélèvements ont été réalisés (avril), les chamelles étaient en début de lactation (20 à 30 j.), et l'alimentation était basée sur le pâturage dans les parcours naturels et sur une complémentation fourragère à raison de 2 kg de foin de luzerne par animal et par jour en moyenne. Les principaux fourrages naturels consommés pendant cette période étaient *Salsolla foetida*, *Salsolla tetragona*, *Anabasis* sp., *Zygophyllum gaetulum*, *Frankenia thymifolia*, *Launea arborescens* et *Ozyris alba*. Les teneurs moyennes de ces plantes en oligo-éléments (en mg/kg de M.S.) variaient de 2,5 à 13,2 pour le cuivre, et de 6,9 à 18,1 pour le zinc (6).

Les animaux étaient déparasités deux fois par an (injection sous-cutanée d'ivermectine), et cliniquement en bon état de santé au moment des prélèvements qui ont eu lieu une fois par animal chez les chamelles et leurs petits, soit 60 prélèvements.

Essai 3

Cinq dromadaires déparasités (injection sous-cutanée d'ivermectine) et en bon état de santé, d'un poids moyen

de 350 kg, comprenant 2 femelles vides et tarées et 3 mâles en période de repos sexuel, ont participé à l'essai. Ces animaux, de la station expérimentale de Tadla (zone à climat aride du centre du Maroc), recevaient une ration quotidienne constituée de 2 kg d'orge, 2 kg de luzerne et 2 kg de paille de blé. L'orge était distribuée le matin, la luzerne le matin et le soir. Cette ration a été établie à partir d'études antérieures (5) montrant qu'elle subvenait aux besoins d'entretien des animaux tout en évitant les refus. Les dromadaires étaient abreuvés *ad libitum* une fois par jour.

Les animaux ont été suivis, après une période d'adaptation de 15 jours, pendant 45 jours (J0 à J45). Entre J8 et J15, les animaux ont bénéficié d'une complémentation minérale administrée quotidiennement par voie orale sous forme d'une solution contenant 500 mg de sulfate de cuivre pentahydraté, 3 200 mg de sulfate de zinc heptahydraté, 2 200 mg de sulfate de manganèse monohydraté, 27 g de chlorure de calcium, 56 g de phosphate de sodium monosodique et 23,5 g de sulfate de magnésium heptahydraté. Cette complémentation assurait un apport minéral correspondant au double des besoins généralement admis chez les bovins à l'entretien recommandés par Lamand (16), ceci afin d'espérer une réponse rapide des animaux soumis à une complémentation orale de courte durée. Les prélèvements de sang, réalisés à la même heure et avant la distribution des repas, ont été quotidiens de J0 à J30, puis, dans les mêmes conditions, hebdomadaires à partir de J30. Un prélèvement des différents éléments de la ration de base a été réalisé en vue de la détermination de leur composition minérale.

Méthode de prélèvement sanguin

Les prélèvements ont été réalisés par ponction de la veine jugulaire dans des tubes en plastique contenant de l'héparine. Après centrifugation, les échantillons de plasma ont été stockés dans des tubes en plastique à -20°C jusqu'au moment de l'analyse.

Méthodes analytiques

Les concentrations plasmatiques du cuivre et du zinc ont été déterminés par spectrophotométrie d'absorption atomique selon la méthode décrite par Bellanger et Lamand (4). Dans les fourrages, ces éléments ont été évalués par la méthode de Bellanger (3).

Traitement statistique

L'analyse de variance à un critère de variation a été utilisée pour évaluer l'effet de la complémentation sur les paramètres plasmatiques étudiés. Les effets éventuels de l'âge et du sexe ont été évalués à l'aide de la méthode paramétrique (test t de Student) et la corrélation entre cuprémie et zincémie, par la méthode de Spearman.

Résultats

Essai 1 (tabl. I)

TABLEAU I

Concentrations en cuivre et zinc plasmatique (en µg/100 ml) chez le dromadaire dans la région de Guelmim (essai 1)

	Femelles	Mâles	Jeunes
Cuivre (µ ± E.T.)	63 ± 19	67 ± 17	66 ± 17
min.-max.	25 - 92	27 - 98	35 - 105
Zinc (µ ± E.T.)	50 ± 15 ^a	57 ± 17 ^a	69 ± 12 ^b
min.-max.	18 - 85	23 - 85	46 - 87

a-b p < 0,05.

La cuprémie moyenne était de 65 µg/100 ml, avec des valeurs extrêmes de 25 à 105 µg/100 ml. Aucune différence entre les groupes d'animaux n'a pu être observée. Le pourcentage de valeurs faibles en cuivre plasmatique dans l'ensemble de l'échantillon, soit inférieures à 60 µg/100 ml, limite de carence préconisée chez les bovins, a été de 32 p. 100. Ce pourcentage était sensiblement plus important chez les chamelles et les chameçons (35 p. 100) que chez les mâles (25 p. 100).

La zincémie moyenne était de 59 µg/100 ml, avec des valeurs extrêmes de 18 à 87 µg/100 ml. Elle est significativement plus élevée (p < 0,05) chez les jeunes que chez les adultes (69 vs. 53,5 µg/100 ml). En revanche, aucune différence significative liée au sexe n'a été mise en évidence en dépit des valeurs plus faibles enregistrées chez les femelles : 74 p. 100 des zincémies des femelles étaient inférieures à 60 µg/100 ml contre 50 p. 100 chez les mâles.

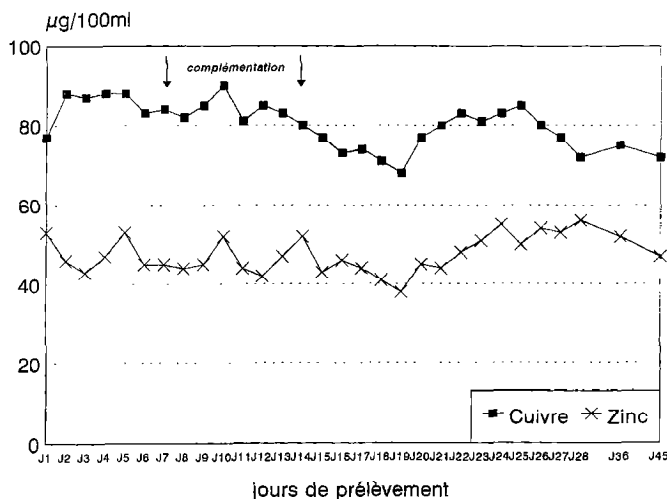


Figure 2 : Evolution quotidienne des concentrations plasmatiques en minéraux mineurs chez le dromadaire (essai 3).

Essai 2 (tabl. II)

TABLEAU II

Concentrations en cuivre et zinc plasmatique (en µg/100 ml) chez le dromadaire dans la région de Laâyoune (essai 2)

	femelles	produits
Cuivre (µ ± E.T.)	102 ± 25	94 ± 17
min.-max.	48 - 140	53 - 132
Zinc (µ ± E.T.)	34 ± 7 ^a	42 ± 5 ^b
min.-max.	24 - 52	31 - 58

a-b p < 0,05.

Avec une valeur moyenne de 102 µg/100 ml, la cuprémie relevée chez les chamelles à Laâyoune était sensiblement plus élevée que lors de l'essai précédent. Il en était de même pour les chameçons (94 µg/100 ml). Ces résultats étaient inverses pour la zincémie, beaucoup plus basse qu'à Guelmim, chez les chameçons (42 µg/100 ml) et surtout chez les mères (34 µg/100 ml). L'effet de l'âge sur la zincémie a été confirmé dans cet essai avec des valeurs significativement plus élevées chez le jeune (p < 0,05).

Essai 3 (tabl. III, fig. 2)

La ration de base n'a pas apporté une quantité suffisante de minéraux pour couvrir les besoins d'entretien (tabl. III). Les différents aliments rentrant dans la composition de la ration ont été particulièrement déficitaires en cuivre et en zinc. La complémentation minérale a bien assuré au moins le double des besoins recommandés chez les bovins pour ces deux éléments.

La cuprémie et la zincémie moyennes ont été respectivement de 80 ± 6 et 47 ± 7 µg/100 ml, soit des valeurs intermédiaires aux essais précédents. La complémentation minérale, de courte durée, a été sans effet sur ces deux paramètres (fig. 2).

TABLEAU III

Composition minérale des aliments et apports nécessaires pour la complémentation des dromadaires (essai 3). Les besoins sont estimés à partir des recommandations de Lamand (16) pour les bovins

Minéraux	Luzerne	Paille	Orge	Total des apports	Besoins X2	Net à compléter
Cu (mg/kg M.S.)	13,0	5,0	8,0	46,8	108	61,2
Zn (mg/kg M.S.)	21,0	7,0	17,0	81,0	540	459

Discussion

Valeurs moyennes

Les valeurs moyennes de la cuprémie et de la zincémie, observées au cours des trois essais, sont globalement comparables à celles relevées dans la littérature comme l'indique la revue de Faye et Bengoumi (13). Pour le cuivre plasmatique, les valeurs moyennes dans les trois essais varient de 65 à 102 µg/100 ml, soit des concentrations tout-à-fait similaires à celles relevées dans d'autres pays (tabl. IV). En considérant que la limite de carence en cuivre chez les dromadaires est similaire à celle des bovins, les cuprémies répertoriées au Maroc semblent indiquer que les animaux de la région de Guelmim sont en situation légèrement déficitaire. Seuls les résultats de Faye et Mulato à Djibouti (11) sont en moyenne plus faibles, mais on se situe dans ce dernier cas dans un contexte alimentaire carenciel caractérisé (12). L'effet de l'âge sur la cuprémie n'a jamais été mis en évidence. En revanche, Faye et Mulato (11) ont relevé un effet du sexe contrairement à Abdalla *et al.* (1). La cuprémie diminuant en fin de gestation (7) du fait d'un transfert actif du cuivre maternel vers le fœtus (20), les résultats contradictoires de la littérature peuvent être dus à l'effet du stade physiologique selon qu'il est ou non pris en compte dans l'échantillonnage des animaux.

Contrairement à la cuprémie, les valeurs moyennes enregistrées pour la zincémie (de 38 à 59 µg/100 ml) sont inférieures à celles rapportées chez les autres espèces de ruminants domestiques (17). Il apparaît d'ailleurs, à la lumière de plusieurs travaux mis en œuvre dans des contextes écologiques variés et avec une plus grande rigueur analytique (10, 14) que le dromadaire présente des zincémies plus faibles que les autres espèces (tabl. V). Les variations de la zincémie en fonction de l'âge et du sexe ont rarement été rapportées. L'âge des animaux représente cependant un paramètre discriminant déjà observé (11). Les plus fortes concentrations en zinc plasmatique chez le jeune pourrait s'expliquer par la richesse du lait de chamelle en zinc dont les teneurs moyennes atteignent 2 871 µg/l (6).

Cependant, on observe globalement peu d'effets significatifs des différents facteurs étudiés du fait de la forte variabilité individuelle. Le diagnostic de carence en éléments-traces n'est, de ce fait, jamais porté à la lumière de résultats individuels, mais en s'appuyant sur des données de troupeau (8, 16).

Effet de l'alimentation

La régulation du cuivre plasmatique dépend non seulement des apports dans la ration, mais aussi de l'état du stockage hépatique en cet élément. Sur les parcours naturels (essais 1 et 2), les fourrages ligneux qui repré-

TABLEAU IV
Valeurs de la cuprémie du dromadaire
selon divers auteurs (en µg/100 ml)

Valeurs Moyennes	Min.-max. ou E.T.	n	Références/pays
83	± 6,7	19	Moty <i>et al.</i> , 1968. Egypte (18)
95,3	59 - 137	19	Tartour, 1975. Soudan (19)
118,3	± 28,8	96	Wahbi <i>et al.</i> , 1979. Soudan (22)
92,6	66 - 129	17	Abu-Damir <i>et al.</i> , 1983. Soudan (2)
76,5	± 4,3	45	El Tohamy <i>et al.</i> , 1986. Egypte (7)
107,0	66-151	53	Faye <i>et al.</i> , 1986. Ethiopie (8)
75	59-90	25	Abdalla <i>et al.</i> , 1988. E.A.U. (1)
60,7	7 - 122	52	Faye et Mulato, 1991. Djibouti (11)
65,4	± 20,2	65	Faye <i>et al.</i> , 1995. France (14)

TABLEAU V
Valeurs de la zincémie du dromadaire selon divers auteurs
(en µg/100 ml)

Valeurs Moyennes	Min.-max. ou E.T.	n	Références/pays
135	± 4,1	19	Moty <i>et al.</i> , 1968. Egypte (18)
93,4	± 4,2	45	El Tohamy <i>et al.</i> , 1986. Egypte (7)
100,4	81 - 160	53	Faye <i>et al.</i> , 1986. Ethiopie (8)
41	37 - 46	25	Abdalla <i>et al.</i> , 1988. E.A.U. (1)
46,3	9 - 100	52	Faye <i>et al.</i> , 1990. Djibouti (10)
34,6	± 7,8	65	Faye <i>et al.</i> , 1995. France (14)

sentent la dominante de la ration sont généralement plus riches en cuivre (9). Par ailleurs, on sait que l'équilibre protéo-énergétique de la ration influe sur la digestibilité des éléments-traces aussi bien chez les petits ruminants (15) que chez les dromadaires (12). Or, la période au cours de laquelle ont été réalisés les prélèvements, tant à Guelmim qu'à Laâyoune, était plutôt favorable du point de vue de la disponibilité alimentaire sur les parcours. Cet ensemble de facteurs a donc permis l'observation de valeurs normales de la cuprémie.

En revanche, dans l'essai 3, la ration était insuffisante pour satisfaire les besoins en minéraux de l'animal, et la complémentation a vraisemblablement contribué à favoriser en priorité le stockage hépatique, la période de complémentation étant sans doute trop courte pour observer un effet significatif sur les teneurs plasmatiques, en dépit de la quantité proposée.

Bien que la régulation de la zincémie ne dépende pas d'un stockage tissulaire, la complémentation n'a pas eu non plus d'effet sur les taux observés conformément à des résultats antérieurs (12). Les valeurs rapportées dans l'essai 3 restent faibles, indépendamment des apports alimentaires en zinc, ce qui confirme plusieurs observations récentes (1, 12, 14) tendant à considérer

que le dromadaire a la capacité de réguler sa zincémie à des niveaux nettement inférieurs à ceux des autres ruminants domestiques. D'ailleurs dans les essais 1 et 2 sur parcours naturels, et bien que les teneurs en zinc dans les fourrages accessibles aux animaux en zone saharienne demeurent nettement inférieures aux normes préconisées pour les ruminants (16), les valeurs de la zincémie se situaient à des niveaux soient sensiblement plus faibles (Laâyoune), soient plus élevées (Guelmim) qu'à la station de Tadla. La zincémie paraît donc un reflet inconstant de l'apport alimentaire en zinc. Il est vrai que dans ces essais, les auteurs n'ont pas approché les interférences possibles avec d'autres minéraux (calcium par exemple), ni le niveau précis des apports alimentaires (21). A titre indicatif, la luzerne qui entre dans la ration proposée dans l'essai 3 se singularise par un déséquilibre phosphocalcique au bénéfice du calcium dont l'effet dépresseur sur l'absorption intestinale de certains minéraux pourrait contribuer à l'absence d'un effet remarquable de la complémentation. L'apport de foin de luzerne aux animaux de l'essai 2 pourrait, pour les mêmes raisons, expliquer partiellement les différences observées entre Laâyoune et Guelmim : les interactions calcium-zinc sont souvent évoquées dans la littérature (16, 21) et le foin de luzerne est relativement riche en cuivre (5).

Les différents essais présentés ici relèvent d'une approche transversale (un seul prélèvement dans les essais 1 et 2) ou d'une observation dynamique sur une courte période (essai 3). Ils ne permettent donc pas d'apporter des précisions sur les variations saisonnières pourtant observés en Ethiopie (8) et au Maroc (5). L'effet saison demeure cependant essentiellement lié à la variation du disponible fourrager. L'étude de cet effet demande donc de décrire plus précisément la nature et la qualité des parcours.

Conclusion

Les observations faites en différents points du territoire marocain et en fonction de diverses situations alimentaires confirment la similitude du comportement du dromadaire en matière de régulation de la cuprémie par comparaison aux autres ruminants. Il n'en est pas de même pour la zincémie qui paraît relever d'un métabolisme quelque peu différent. L'étude comparative des différentes voies d'apport en cuivre et en zinc, et sur des périodes de complémentation plus longues permettrait d'approfondir certains aspects des mécanismes de régulation de ces deux éléments dans cette espèce.

Bibliographie

1. ABDALLA O.M., WASFI I.A., GADIR F.A., 1988. Arabian race camel normal parameters. I. Haemogram, enzymes and minerals. *Comp. Biochem. Physiol.*, **90A** : 237-239.
2. ABU DAMIR H., TARTOUR G., ADAM E.I., 1983. Mineral contents in livestock in eastern Sudan. *Trop. Anim. Hlth Prod.*, **15** : 15-16.
3. BELLANGER J., 1971. Dosage des oligo-éléments dans les fourrages. *Ann. Nutr. Aliment.*, **25** : 59-96.
4. BELLANGER J., LAMAND M., 1975. Méthode de dosage de cuivre et du zinc plasmatique. *Bull. tech. INRA Theix*, **20** : 23-54.
5. BENGOUIMI M., 1992. Etude de la biochimie clinique et des mécanismes d'adaptation du dromadaire à la deshydratation. Thèse doct. ès-Sciences agronomiques, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, 184 p.
6. BENGOUIMI M., FAYE B., TRESSOL J.C. Composition minérale du lait de chamelle au Maroc. In : Bonnet P. ed., Actes de l'atelier Chameaux et dromadaires, animaux laitiers, 24-26 oct. 1994, Nouakchott, Mauritanie. Montpellier, France, CIRAD-EMVT, UCEC (à paraître).
7. EL TOHAMY M.M., SALAMA A., YOUSEF A.E.A., 1986. Blood constituents in relation to the reproductive state in she-camel (*Camelus dromedarius*). *Beit. trop. Landwirtschaft. vet. Med.*, **24** (4) : 425-430.
8. FAYE B., GRILLET C., TESSEMA A., 1986. Teneur en oligo-éléments dans les fourrages et le plasma des ruminants domestiques en Ethiopie. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop.*, **39** (2) : 227-237.
9. FAYE B., TISSERAND J.L., 1989. Problèmes de la détermination de la valeur alimentaire des fourrages prélevés par le dromadaire. *Options méditerran., sér. Sémin.*, **2** : 61-65.
10. FAYE B., KAMIL M., LABONNE M., 1990. Teneur en oligo-éléments dans les fourrages et le plasma des ruminants domestiques de Djibouti. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **43** : 365-373.
11. FAYE B., MULATO C., 1991. Facteurs de variation des paramètres protéo-énergétiques, enzymatiques et minéraux dans le plasma chez le dromadaire de Djibouti. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **44** : 325-344.
12. FAYE B., SAINT-MARTIN G., CHERRIER R., ALI RUFFA, 1992. The influence of high dietary protein, energy and mineral intake on deficient young camels in Djibouti. II. Changes in mineral status. *Comp. Biochem. Physiol.*, **102A** : 417-424.
13. FAYE B., BENGOUIMI M., 1994. Trace-elements status in camels. A review. *Biol. trace Elem. Res.*, **41** : 1-11.
14. FAYE B., CHACORNAC J.P., RATOVOANANAHARY M., SOUBRE P., 1995. Metabolic profiles and health status of camel in temperate conditions. *Comp. Biochem. Physiol.*, **112A** (1) : 67-73.
15. LAMAND M., 1985. Influence of protein intake on *per os* deficiency treatment in sheep. *Ann. Rech. vét.*, **16** (3) : 285-287.
16. LAMAND M., 1987. Les besoins en oligo-éléments des ruminants. *Bull. tech. CRZV Theix, INRA*, **70** : 113-116.
17. McDOWELL L.R., CONRAD J.M., GLEN HEMBRY F., 1993. Mineral grazing ruminants in tropical regions, 2nd Ed., USA, U.S.A.I.D. and C.B.A.G., Univ. Florida. 65 p.
18. MOTY I.A., MULLA A., ZAAFER S.A., 1968. Copper, iron and zinc in the serum of the egyptian farm animals. *Sudan agric. J.*, **3** : 146-151.
19. TARTOUR G., 1975. Copper status in livestock, pasture and soil in Western Sudan. *Trop. Anim. Hlth Prod.*, **7** : 87-94.
20. TARTOUR G., IDRIS O.F., 1970. Studies on copper and iron metabolism in the camel foetus. *Acta vet. Brno*, **39** (4) : 397-403.
21. UNDERWOOD E.J., 1971. Trace-element in human and animal nutrition, 3rd Ed. New york, USA. Academic Press.
22. WHABI A.A., ABDEL GADIR S.E., NEIMAT A.A., IDRIS O.F., 1979. Plasma electrolytes and minerals of normal camels in the Sudan. In : Cockrill W.R. ed., Camels and camelids. Uppsalla, Suède, 431-437.

Communication

BENGOUMI (M.), FAYE (B.), EL KASMI (K.), TRESSOL (J.C.). Variability factors in trace elements nutritional status by plasmatic indicators in camel (*Camelus dromedarius*) in Morocco. I. Normal value and physiological variability. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1995, **48** (3) : 271-276

To study the copper and zinc nutritional status of camel in different ecological areas from Morocco (Guelmim, Laâyoune, Tadla), one-hundred-twenty-five dromedary camels were used in three experiments. The mean

regional plasma values varied from 65 to 102 µg/100 ml for copper and from 38 to 59 µg/100 ml for zinc. Except the significant effect of age on plasma zinc concentration which was higher in youngers than adults, there was no significant effect of physiological factors (age and sex) on copper and zinc plasma concentrations. Results are discussed according to the variations of basal diet availability in the different trials.

Key words : Dromedary - Feeding - Copper - Zinc - Blood plasma - Morocco.

Facteurs de variation des indicateurs plasmatiques du statut nutritionnel en oligo-éléments chez le dromadaire au Maroc

II. Effet d'une complémentation minérale

M. Bengoumi¹

B. Faye²

J.C. Tressol³

D. Bengoumi¹

BENGOUMI (M.), FAYE (B.), TRESSOL (J.C.), BENGOUMI (D.). Facteurs de variation des indicateurs plasmatiques du statut nutritionnel en oligo-éléments chez le dromadaire au Maroc. II. Effet d'une complémentation minérale. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1995, **48** (3) : 276-280

Quatre lots de 5 dromadaires ont reçu respectivement une injection unique de cuivre et de zinc (lot IM), une complémentation orale pendant un mois de sulfate de cuivre (lot Cu), de sulfate de zinc (lot Zn) et aucune complémentation (lot T). L'essai a duré 111 jours et la période de complémentation est survenue entre 7^e et le 37^e jour. Dans le lot IM, la cuprémie et la zincémie ont significativement augmenté (maximum de 72 et de 73 µg/100 ml respectivement). Dans le lot Cu, la cuprémie a significativement augmenté ainsi que la zincémie dans le lot Zn, mais les valeurs observées ne dépassent pas les seuils admis comme limite de carence et chutent rapidement après l'arrêt de la complémentation. L'interaction cuivre-zinc se traduit par une diminution non significative de la zincémie dans le lot Cu et significative de la cuprémie dans le lot Zn.

Mots-clés : Dromadaire - Complément minéral - Cuivre - Zinc - Plasma sanguins - Maroc.

1. Laboratoire de Biochimie clinique et nutritionnelle, I.A.V. Hassan II, BP 6202, Rabat-Instituts, Maroc.

2. Laboratoire d'Ecopathologie, INRA-Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France.

3. Laboratoire des Maladies nutritionnelles, INRA-Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France.

Reçu le 26.6.1995, accepté le 20.12.1995.

Introduction

Des travaux antérieurs réalisés sur le chameleon polycarcencé ont montré l'absence d'effet notable d'une complémentation minérale spécifique sur la modification des teneurs plasmatiques en minéraux (4). De même, une complémentation orale de courte durée ne modifie pas la cuprémie et la zincémie des dromadaires recevant une alimentation assurant les besoins d'entretien (2).

Or, la régulation de certains éléments-traces, notamment du zinc, à des niveaux plus bas que chez les autres ruminants domestiques (2) semble faire intervenir non seulement le statut nutritionnel global des animaux (4), mais aussi la voie d'apport de la complémentation et la durée de celle-ci. L'objectif de ce travail est donc d'étudier la relation entre les apports alimentaires en cuivre et en zinc par différentes voies et leurs effets sur les concentrations plasmatiques observées en tenant compte des interférences entre ces éléments-traces.

Matériel et méthodes

Animaux

L'étude a été réalisée à la station expérimentale cameline de Laâyoune (Maroc) sur 20 dromadaires d'un poids moyen de 300 kg environ, âgés de 3 à 4 ans et en bon état de santé. Ces animaux étaient déparasités (injection sous-cutanée d'ivermectine) avant le début de l'expérimentation. Ils ont été maintenus en stabulation entravée et recevaient une ration de base comprenant 2 kg d'orge concassée, 1 kg de paille de blé et 1 kg de foin de luzerne, cette ration correspondant à des besoins d'entretien établis lors de travaux préliminaires (environ 1,2 kg MS/100 kg poids vif). Cette ration apportait 34 mg de cuivre et 62 mg de zinc (analyses effectuées au laboratoire INRA). Les animaux ont été abreuvés *ad libitum* pendant toute la durée de l'essai. Aucun refus n'a été constaté.

Dispositif expérimental

L'expérimentation a comporté, après une phase d'adaptation de 15 jours, les trois étapes suivantes :

1. Etape de contrôle (7 jours) au cours de laquelle les animaux ont été répartis aléatoirement en 4 lots de 5 dromadaires, et ont reçu la même ration de base.

2. Etape de complémentation (30 jours) : en plus de la ration de base identique pour tous les animaux, chaque groupe a reçu un des traitements suivants :

— lot IM : administration par une injection intra-musculaire, séparément dans les deux membres postérieurs, de 10 ml de Prolontex-ZincND soit 600 mg de Zinc Métal et de 10 ml de Prolontex-CuivreND soit 1 600 mg de Cu Métal au cours du premier jour de cette période ;

— lot Cu : administration quotidienne par voie orale de 340 mg de sulfate de cuivre pentahydraté dissous dans 200 ml d'eau distribués à la bouteille pendant toute la période de complémentation ;

— lot Zn : administration quotidienne par voie orale de 2 400 mg de sulfate de zinc heptahydraté dissous dans 200 ml d'eau distribués dans les mêmes conditions que précédemment ;

— lot T : groupe témoin ne recevant aucun traitement.

3. Etape de post-complémentation (75 jours) : pendant cette période, la complémentation des lots Cu et Zn a été arrêtée. Cependant les animaux étaient maintenus en lots et recevaient toujours la même ration de base.

Les prélèvements

Les prélèvements de sang ont été réalisés sur tous les animaux, le matin avant la distribution du repas par ponction de la veine jugulaire sur des tubes vacutainer. Le sérum a été recueilli sur des tubes en plastique et stocké à - 20 °C jusqu'à l'analyse. Le rythme de prélèvement adopté a été le suivant :

— pendant l'étape contrôle, le sang a été prélevé tous les deux jours, soit 4 prélèvements (J6, J4, J2, J0) ;

— pendant l'étape complémentation, les prélèvements ont été réalisés 6 h, 12 h, 24 h et 48 h après le début de la complémentation, puis une fois tous les deux jours jusqu'à J30, soit au total 18 prélèvements par animal ;

— au cours de la période suivante, les prélèvements ont été réalisés tous les deux jours pendant la première semaine (J32 à J38), puis une fois par semaine durant les trois semaines suivantes (J45, J52, J59), puis une fois par quinze jours jusqu'à la fin de l'essai (J74, J89, J104).

Analyses de sang

Les concentrations plasmatiques du cuivre et du zinc ont été déterminées par spectrophotométrie d'absorption atomique selon la méthode décrite par Bellanger et Lamand (1).

Traitement statistique

L'analyse de variance à un critère de variation a été utilisée pour évaluer l'effet des différents traitements sur l'évolution des paramètres plasmatiques étudiés.

Résultats

Les valeurs moyennes de la cuprémie et de la zincémie observées au cours de l'essai dans les différents lots ont respectivement varié de 41 à 56 µg/100 ml et de 45 à 53 µg/100 ml (tabl. I). Les valeurs extrêmes enregistrées ont été de 22 et 81 µg/100 ml pour le cuivre et de 32 à 80 µg/100 ml pour le zinc.

TABLEAU I

Valeurs moyennes et écart-types de la cuprémie et de la zincémie calculés sur 5 dromadaires par lot x 32 prélèvements, soit 160 prélèvements par groupe

Paramètre	IM	Cu	Zn	T
Cuivre (µg/100 ml)	56 ± 8	55 ± 4	41 ± 3	44 ± 2
Zinc (µg/100 ml)	53 ± 10	45 ± 2	52 ± 5	46 ± 2

Aucune différence significative, tant pour le cuivre que pour le zinc n'a été relevée entre les lots pendant la période contrôle ainsi que dans les 5 derniers prélèvements de la période post-complémentation (de J59 à J104).

La cuprémie dans le lot IM a été significativement plus élevée que dans le lot T dès le 2^e jour de la complémentation (J2) et le demeure jusqu'à J30 (fig. 1). C'est dans ce lot que la valeur moyenne maximale a été observée (72 ± 4 µg/100 ml) à J14. Dans le lot Cu (distribution de cuivre *per os*), la cuprémie est significativement augmentée de J2 à J36, soit une période plus longue que le lot précédent. Toutefois, la valeur moyenne maximale enregistrée n'a pas dépassé 60 µg/100 ml (fig. 1). Bien que faible, la diminution de la cuprémie dans le lot Zn par rapport au lot témoin est significative ($p < 0,01$) de J16 à J34.

Des évolutions similaires ont été observées pour la zincémie (fig. 2). Dans le lot IM, la différence avec le lot témoin

Communication

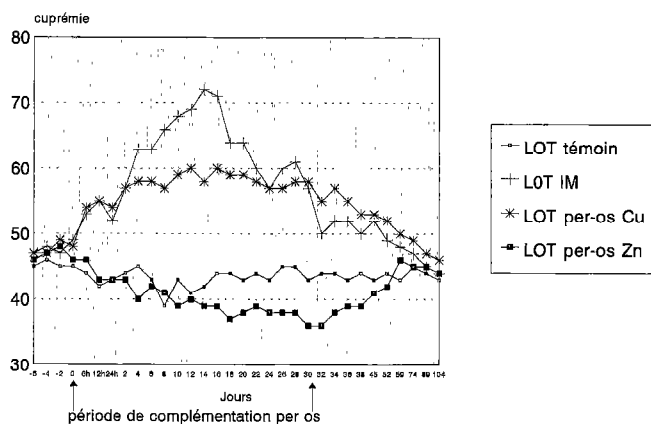
cuivre (en $\mu\text{g}/100\text{ml}$)

Figure 1 : Evolution de la cuprémie dans les quatre lots de dromadaires.

a été significative entre J1 et J22 avec un maximum de $73 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ à J14. Dans le lot Zn, l'augmentation de la zincémie était significative à partir de J4 et jusqu'à J32 avec un maximum observé de $59 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ à J12. La légère diminution de la zincémie observée entre J10 et J30 dans le lot Cu par rapport au lot témoin n'est pas significative (fig. 2).

Discussion

La ration de base distribuée aux dromadaires apportait environ 10 mg de cuivre et 17 mg de zinc par kg de MS selon les analyses effectuées à l'INRA, soit des quantités juste suffisantes pour le cuivre et très inférieures aux besoins pour le zinc d'après les recommandations préconisées pour cette espèce (4). Il apparaît en effet que les besoins du dromadaire en éléments-traces rapportés au kg de MS ingérée sont plus élevés que chez les bovins. Cependant, compte tenu de la plus faible quantité de MS ingérée par cette espèce comparativement à des bovins de même poids (environ deux fois moins), et de la faible qualité nutritionnelle globale des rations généralement à la disposition de ces animaux, les quantités recommandées exprimées en mg par kg de poids vif pour le dromadaire demeurent comparables à celles des bovins.

Cuivre

En début d'essai, après 15 jours d'adaptation, les animaux présentaient des valeurs moyennes de cuprémie inférieures à la limite de carence généralement admise pour les ruminants ($60 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$). L'injection de cuivre a modifié les concentrations sériques en cet élément dès le 2^e jour suivant le traitement et a permis d'atteindre la

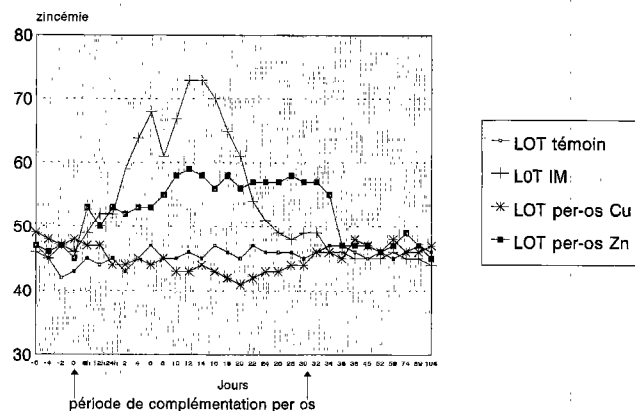
zinc (en $\mu\text{g}/100\text{ml}$)

Figure 2 : Evolution de la zincémie dans les quatre lots de dromadaires.

valeur-seuil de $60 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ dès le 4^e jour. Le maintien de la cuprémie au-dessus de ce seuil a duré près d'un mois, soit une durée inférieure à celle obtenue chez des ovins en Ethiopie (3) dans des situations de carence comparables, mais similaire à celle observée en France sur des moutons non-carencés (8).

Conformément aux observations faites sur le mouton (9), aucune réaction inflammatoire locale n'a été décelée au point d'injection.

L'apport par voie orale de 340 mg de sulfate de cuivre a permis d'augmenter la quantité de cuivre ingérée, la faisant passer de 10 mg à $33 \text{ mg}/\text{kg MS}/\text{j}$, soit un peu plus du double des apports recommandés par Faye *et al.* (4) pour le dromadaire. Cette forme de complémentation a permis une augmentation significative de la cuprémie dans le lot Cu dès le second jour, mais celle-ci ne s'est maintenue qu'une semaine après l'arrêt de la complémentation. Ce dernier résultat est similaire à celui observé à Djibouti sur des chamelons carencés ayant reçu une complémentation orale pendant 3 mois (4). Par ailleurs, les concentrations maximales atteintes ($60 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$) demeurent à la limite inférieure des valeurs observées au Maroc chez le dromadaire sur parcours (1). On peut considérer que les animaux dans notre essai étaient en situation de déficit cuprique et que l'apport de 33 mg de cuivre par kg/MS a permis d'élever les concentrations plasmatiques sans favoriser un stockage hépatique. Ces observations confirment celles faites par Faye *et al.* (4) qui ont recommandé chez le dromadaire en croissance, des apports quotidiens de l'ordre de 15 à 20 mg de cuivre / kg MS , soit des valeurs sensiblement plus élevées que chez les bovins (10).

Dans le lot Zn, la diminution sensible de la cuprémie peut être attribuée à une interaction négative mutuelle entre le

cuivre et le zinc durant le processus d'absorption au niveau de la muqueuse intestinale, phénomène déjà mis en évidence chez le rat (16, 17). Chez les bovins, une ration très enrichie en zinc diminue la concentration en cuivre plasmatique jusqu'à des niveaux de carence (15). Cette interaction est due à une compétition dans le transport des éléments-traces au niveau des sites d'absorption de la paroi intestinale (13).

Zinc

La zincémie moyenne relevée pendant la phase de contrôle était dans l'intervalle des valeurs usuelles du dromadaire (5). L'injection de zinc a entraîné une augmentation nette de la zincémie dès le premier jour et pendant 3 semaines, soit une durée sensiblement plus courte que chez le mouton (12). Cependant, le niveau maximum atteint de la zincémie (73 µg/100 ml) reste relativement faible par rapport aux résultats rapportés par d'autres espèces de ruminants (8).

La distribution *per os* de 2 400 mg de sulfate de zinc a permis de multiplier par 10 la quantité ingérée de zinc (de 18 à 185 mg/kg MS). Cette quantité représente à peine le double des apports recommandés par Faye *et al.* (4) chez le dromadaire (100 mg/kg MS), et plus de trois fois ceux recommandés chez les bovins (11).

La complémentation orale en zinc a permis une amélioration notable de la zincémie, mais celle-ci demeure inférieure à 60 µg/100 ml et chute très rapidement dès la fin de la complémentation, conformément aux résultats déjà obtenus à Djibouti sur des chamelons carencés et complémentés pendant 3 mois (4). L'évolution en plateau de la zincémie et la chute brutale après l'arrêt de la complémentation s'explique par l'absence de forme connue de stockage du zinc dans les tissus des animaux domestiques (14). Il est connu par ailleurs que, aussi bien chez la brebis (10) que chez le chamelon (4), la complémentation orale en zinc s'avère inefficace lorsque la ration de base est pauvre en azote.

L'interaction cuivre-zinc dans le lot Cu est moins marquée que dans le lot Zn. Ceci peut être attribué à une régulation de la zincémie sensiblement différente chez le dromadaire, ce que confirment les résultats récents de la littérature concernant les niveaux usuels de la zincémie dans cette espèce (6, 7).

Conclusion

Ces résultats montrent qu'il subsiste encore des zones d'ombre dans la compréhension de la régulation des éléments-traces tels que le cuivre et le zinc chez le dromadaire. Il conviendrait à l'avenir de prendre en considération des périodes de complémentation plus longues et,

surtout, d'estimer le rôle du stockage hépatique et de l'excrétion urinaire et fécale dans les mécanismes de régulation des minéraux concernés. Une étude comparative bovins-camelins est mise actuellement en place dans ce sens. La comparaison avec les bovins permettra, en outre, de déterminer la spécificité physiologique du dromadaire, en relation avec ses capacités d'adaptation aux conditions désertiques.

Remerciements

Nous tenons à remercier la Fondation internationale pour la science (IFS) pour son appui financier dans la réalisation de ce travail (Bourse B/2293 - 1). Les auteurs remercient également le Docteur Hidane Kamal, Chef des Services vétérinaires de Laâyoune pour son aide.

Bibliographie

- BELLANGER J., LAMAND M., 1975. Méthode de dosage du cuivre et du zinc plasmatique. *Bull. tech. CRZV Theix, INRA*, **20** : 23-54.
- BENGOUMI M., FAYE B., EL KASMI K., TRESSOL J.C., 1995. Facteurs de variation des indicateurs plasmatiques du statut nutritionnel en oligo-éléments chez le dromadaire au Maroc. I. Valeurs usuelles et variations physiologiques. *Rev. Élev. Méd. vét. Pays trop.*, **48** : 271-276.
- FAYE B., GRILLET C., 1984. La carence en cuivre chez les ruminants domestiques dans la région d'Awash (Ethiopie). *Rev. Élev. Méd. vét. Pays trop.*, **37** (1) : 42-60.
- FAYE B., SAINT-MARTIN G., CHERRIER R., ALI RUFFA, 1992. The influence of high dietary protein, energy and mineral intake on deficient young camels in Djibouti. II. Changes in mineral status. *Comp. Biochem. Physiol.*, **102A** : 417-424.
- FAYE B., BENGOUMI M., 1994. Trace-elements status in camels. A review. *Biol. trace Elem. Res.*, **41** : 1-11.
- FAYE B., JOUANY J., CHACORNAC J.P., RATOYONANAHARY M., 1995. L'élevage des grands camélidés. Analyse des initiatives réalisées en France. *INRA Prod. anim.*, **8** (1) : 3-17.
- FAYE B., CHACORNAC J.P., RATOYONANAHARY M., SOUBRE P., 1995. Metabolic profiles and health status of camel in temperate conditions. *Comp. Biochem. Physiol.*, **112A** (1) : 67-73.
- LAMAND M., 1978. Copper and zinc deficiencies treatment by intramuscular injections in sheep. *Ann. Rech. vét.*, **9** (3) : 495-500.
- LAMAND M., 1978. Copper deficiency prophylaxis in grazing sheep by copper oxide injection. *Ann. Rech. vét.*, **9** (3) : 501-504.
- LAMAND M., 1985. Influence of protein intake on *per os* deficiency treatment in sheep. *Ann. Rech. vét.*, **16** (3) : 285-287.
- LAMAND M., 1987. Les besoins en oligo-éléments des ruminants. *Bull. tech. CRZV Theix, INRA*, **70** : 113-116.

Communication

12. LAMAND M., LAB C., TRESSOL J.C., 1980. Comparaison of the efficiency of zinc injected as metal oxide for zinc deficiency treatment in sheep. *Ann. Rech. vét.*, **11** (2) : 147-149.
13. Mc DOWELL L.R., 1992. Minerals in animal and human nutrition. San Diego, USA, Academic Press, 517 p.
14. Mc DOWELL L.R., CONRAD J.M., GLEN HEMBRY F., 1993. Mineral grazing ruminants in tropical regions, 2nd Ed., USA, U.S.A.I.D. and C.B.A.G., Univ. Florida, 65 p.
15. TOWERS N.R., YOUNG P.W., WRIGHT D.E., 1981. Effect of zinc supplementation on bovine plasma copper. *N.Z. vet. J.*, **29** : 113-114.
16. VAN CAMPEN P.R., 1971. Copper inference with intestine absorption of zinc⁶⁵ rats. *J. Nutr.*, **97** : 104.
17. YU S., BEYNEN A.C., 1994. The combined effect of high iron and zinc intake on copper status in rats. *Biol. trace Elem. Res.*, **42** : 71-79.
- BENGOUMI (M.), FAYE (B.), TRESSOL (J.C.), BENGOUMI (D.).** Variability factors in trace elements nutritional status by plasmatic indicators in camel (*Camelus dromedarius*) in Morocco. II. Effect of mineral supplement. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1995, **48** (3) :276-280.

Four groups of 5 camels received one injection of copper and zinc (IM group), an oral supplementation during one month with copper sulphate (Cu group), or zinc sulphate (Zn group), and no supplementation (T group) respectively. The trial was performed during 111 days and complementation occurred from day 7 to 37. In the IM group, cupremia and zincemia significantly increased (72 and 73 µg/100 ml maximum respectively). Cupremia increased in Cu group as zincemia in Zn group but the observed values did not overpass the threshold of admitted deficiency limit, and fall down fastly after the end of the supplementation period. The interaction copper-zinc explained the non-significant decreasing of zincemia in Cu group and significant decreasing of cupremia in Zn group.

Key words : Dromedary - Mineral supplement - Copper - Zinc - Blood plasma - Morocco.

Informations

“FLOTROP”, une base de données agropastorales sur l’Afrique tropicale au CIRAD-EMVT

En 1958, le Docteur Pagot a créé à l’IEMVT une section chargée de l’étude de la végétation en tant que ressource alimentaire du bétail africain. Depuis, les agropastoralistes de terrain ont arpenté l’Afrique tropicale en tous sens et, sous l’impulsion de G. Boudet, ont enregistré des observations floristiques par dizaines de milliers dans un nombre très élevé de relevés largement répartis du Cap-Vert à Djibouti et de la zone guinéenne à la zone saharienne. Plus de 3,5 millions d’hectares sont ainsi concernés par une grande série de rapports décrivant les formations végétales, leurs usages, leur valeur pastorale, leurs possibilités d’amélioration. Une synthèse des connaissances a été faite dans une série d’atlas à moyenne échelle^{1,2} : «Elevage et potentialités pastorales sahéliennes».

Par ailleurs, les collections botaniques effectuées à l’occasion de ces tournées ont permis la constitution d’un herbier de référence qui fait autorité pour les régions sahéliennes. Cet herbier va prochainement être installé dans les locaux neufs du nouveau campus du CIRAD à Baillarguet, près de Montpellier. En complément de la mise sur une base de données de la nomenclature et des collectes, déjà faite³, les aménagements et équipements réunis à cette occasion feront de cette collection de référence une des mieux installées et des plus modernes de France. La codification des espèces sahéliennes initiée par G. Boudet sert d’ores et déjà de référence auprès des utilisateurs, comme la mise au point nomenclaturale par Lebrun et Stork⁴, en cours d’achèvement, constitue désormais une référence internationale incontournable.

Si l’on ajoute aux relevés propres des agrostologues du CIRAD-EMVT ceux des chercheurs d’autres instituts (Muséum national d’histoire naturelle, Universités), les observations faites en Afrique tropicale paléarctique sont en nombre considérable et s’étalent sur les 60 dernières années.

Le projet FLOTROP⁵, mis en place par le CIRAD-EMVT avec l’aide du CNRS, a pour objectif de rassembler cette masse de données, d’en homogénéiser la présentation et la nomenclature et d’intégrer le corpus ainsi réuni dans une base de données floristiques et agrostologiques. Il porte sur un territoire qui s’étend sur 80° de longitude, de 25° ouest à 55° est et sur 20° de latitude de 5° nord à 25°

nord, donc du Hoggar au golfe de Guinée et des Iles du Cap-Vert à la corne de l’Afrique. Cette portion de l’Afrique comporte 1 600 degrés-carré. Elle a été divisée en 18 territoires qui peuvent correspondre à un seul pays ou en réunir plusieurs contigus lorsque leurs dimensions sont plus réduites :

1 Algérie	10 Mauritanie
2 Bénin	11 Mali
3 Burkina Faso	12 Niger
4 Cameroun	13 Sénégal, Gambie
5 Cap-Vert	14 Soudan
6 Centrafrique	15 Tchad
7 Côte d’Ivoire	16 Ethiopie, Somalie
8 Djibouti, Erythrée	17 Nigeria
9 Guinéas, Liberia	18 Togo, Ghana

Si la base doit rassembler le plus possible de relevés, elle ne peut incorporer n’importe quelle observation ! Il y a des conditions à remplir pour qu’un relevé puisse être accepté et intégré.

- Tout d’abord, un relevé doit être **daté** avec autant de précision que possible. Chacun connaît les différences considérables existant entre les phénophases des formations sahéliennes, c’est-à-dire entre les aspects que peut présenter la physionomie d’une végétation sahélienne en fin de saison sèche et au cœur de la saison des pluies. Pour que la banque de données permette d’aborder des études comparatives précises, et surtout dans le cas de suivi, il faut être en mesure de localiser les observations utilisées par rapport aux dates du début des saisons sèche et pluvieuse, des premières “pluies efficaces”, en fonction de la durée de la saison des pluies, du total des précipitations déjà reçues et du module pluviométrique, alors que tous ces paramètres changent d’une manière importante d’une année à l’autre.

- Ensuite, un relevé doit être **géoréférencé**, c’est-à-dire localisé dans l’espace avec une précision suffisante pour permettre le rapprochement de deux observations faites en des emplacements très voisins par des observateurs différents et à des dates pouvant être éloignées ; c’est aussi la contrainte qui garantit la validité des cartes de répartition permises par la banque de données. L’idéal est que l’observateur localise ses observations avec un GPS, mais pour les relevés anciens, c’est impossible. Certains observateurs, ou certaines études particulièrement soignées, donnent les coordonnées précises des emplacements de leurs relevés ; d’autres permettent d’en

1. Elevage et potentialités pastorales sahéliennes. Wageningen, Pays-Bas, CTA ; Maisons-Alfort, France, CIRAD-IEMVT.

2. GASTON A. (ed.), 1994. Les pâturages sahéliens de l’Afrique de l’Ouest. Wageningen, Pays-Bas, CTA ; Maisons-Alfort, France, CIRAD-EMVT, 220 p.

3. ROY F., 1993. Structure de la base de données botaniques du CIRAD-EMVT. Maisons-Alfort, France, CIRAD-EMVT, 18 p.

4. LEBRUN J.P., STORK A., 1991, 1992, 1995. Enumération des plantes à fleurs d’Afrique tropicale. Genève, Suisse, Conservatoire et Jardin botanique, 250 p., 258 p., 300 p.

5. TACHER G., 1993. Le projet FLOTROP au CIRAD-EMVT. *Flotrop info*, 1 : 1-2.

retrouver les valeurs par des cartes de localisation. Certaines, seulement verbales, sont alors très difficiles à positionner sur une carte et laissent un "déchet" de 25 à 50 p. 100.

• Enfin, un relevé doit être **signé**. D'abord, pour que les travaux de synthèse qui peuvent être faits à partir de la base FLOTROP puissent rendre à chacun son dû. Ensuite, parce que la connaissance de l'identité du collecteur peut faciliter les procédures de transcription nomenclaturale, expliquer des anomalies apparentes de biodiversité (les aires analysées, dites aires minimales, sont très différentes d'un collecteur à l'autre dans le même type de végétation), permettre de remonter aux sources lorsque des cas de singularités apparaissent.

Un outil informatique d'analyse et de gestion de ces données est développé dans le cadre du laboratoire de Botanique de l'EMVT à Montpellier. Il a pour fonction de permettre la validité des données à entrer, d'en assurer l'incorporation et la maintenance et d'en permettre l'utilisation.

Cet outil permet la reprise aisée de tableaux phytosociologiques et leur réorganisation en relevés individualisés ; il permet la codification rapide de liste d'espèces et la "décodification" de séries de codes. Les codes utilisés antérieurement à l'EMVT sont conservés, mais la liste en a été complétée par la codification des genres et par l'addition progressive de codes nouveaux pour les espèces nouvellement rencontrées dans les listes incorporées, toujours en référence à la nomenclature de Lebrun et Stork⁴ et des synonymes aux binoms de ces auteurs.

Les entrées sont assorties d'un système de contrôle qui vérifie la cohérence des valeurs tapées avant de les accepter et d'un système de correction permettant de modifier chacun des éléments enregistrés. Ces enregistrements sont traités et répartis dans une série de fichiers dont la spécialisation permet une exploitation rapide ; de plus, chaque enregistrement est directement accessible quelle que soit sa place dans les fichiers par sa structure même, ce qui permet encore d'accélérer les accès aux données.

Contrairement à beaucoup de systèmes développés dans d'autres institutions, FLOTROP n'est pas destiné à effectuer directement des traitements statistiques ou des «analyses de données». FLOTROP comporte des modules de sortie générant des fichiers «ASCII» dont les formats permettent la reprise par les progiciels.

Par contre, les divers types de sortie font l'objet d'une attention particulière. Outre ceux qui viennent d'être évoqués, il est possible d'obtenir une **édition standardisée des relevés** dans la nomenclature de référence (celle de la note 4) ; d'obtenir la **florule** d'un degré-carré, d'un groupe de degrés-carré contigus (une fenêtre) ou d'un territoire entier et d'opter pour un classement des espèces par ordre de code (par défaut), par ordre alphabétique, ou par famille ; d'extraire la liste des relevés d'un degré-carré, d'une fenêtre, d'un auteur dans un pays, contenant une espèce particulière dans un territoire ; de **cartographier** à 3' près l'ensemble des relevés de la dition, ou seulement ceux qui contiennent une espèce particulière, ou l'ensemble des relevés d'un degré-carré (localisés à 1' près sur une carte au millionième), ou encore l'ensemble des relevés d'un territoire contenant une espèce particulière. Toutes ces sorties cartographiques sont accompagnées de sorties sur des fichiers «ASCII» des données exploitées pour permettre leur incorporation dans des rapports.

Le progiciel FLOTROP est prévu pour intégrer les références des cartes écologiques ou agrostologiques pertinentes et afficher la liste des documents concernés lors d'interrogations par degré-carré. Il permettra, dans une étape ultérieure, des interprétations agrostologiques des relevés incorporés : construction du **diagramme pastoral**, des **spectres biologiques**, de la **biodiversité**, mise en évidence des **potentialités pastorales**. Il permettra aussi l'édition de fiches spécifiques sur les caractéristiques des espèces pastorales.

Un bulletin bimestriel, Flotrop info, est diffusé par le laboratoire de Botanique de l'EMVT pour traduire et suivre l'état d'avancement des travaux et de l'enrichissement de la base.

Philippe DAGET

CNRS - CIRAD-EMVT