

Sommaire

PATHOLOGIE INFECTIEUSE

- 273 **Epidémiologie de la peste des petits ruminants (PPR) et de la peste bovine au Mali : enquêtes sérologiques.** Tounkara K., Traore A., Traore A.P., Sidibe S., Samake K., Diallo B.O., Diallo A. (*en français*)
- 279 **Vaccination expérimentale des poulets de chair contre la maladie de Newcastle au Burkina Faso avec des grains de mil enrobés de vaccins thermotolérants LaSota/A300 et V4/276.** Nguyen-Ba-Vy, Yerbanga E., Demandiere J.M., Mercier P. (*en français*)
- 284 **Information**
- 285 **Virus Akabane: enquête sérologique des anticorps chez les animaux d'élevage au Soudan.** Mohamed M.E.H., Mellor P.S., Taylor W.P. (*en anglais*)
- 289 **Causes de mortalité des bovins de race N'Dama sur le plateau du Sankaran, Faranah, Guinée en 1993-1994.** Mourad M., Magassouba B. (*en français*)
- 295 **Diagnostic rapide de la peste équine.** Adeyefa C.A.O. (*en anglais*)
- 299 **Apparition de lésions proches de la variole bovine chez des bovins en Israël.** Yeruham I., Nyska A., Abraham A., Algazi R. (*en anglais*)
- 303 **Prévalence de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica* et *Cryptosporidium* spp. dans du lait en vrac, des matières fécales de vaches et des effluents de fermes laitières à Trinidad.** Adesiyun A.A., Webb L.A., Romain H., Kaminjolo J.S. (*en anglais*)
- 310 **Information**

PATHOLOGIE PARASITAIRE

- 311 **Influence de l'infection à *Trypanosoma congolense* sur quelques constituants protéiques et inorganiques du sang chez le mouton.** Katunguka-Rwakishaya E. (*en anglais*)
- 315 **Evaluation de la sensibilité du test de Woo pour la détection de *Trypanosoma vivax*.** Desquesnes M., Tresse L. (*en français*)
- 322 **Evaluation de la sensibilité de la PCR pour la détection de l'ADN de *Trypanosoma vivax* selon divers modes de préparation des échantillons sanguins.** Desquesnes M., Tresse L. (*en français*)
- 328 **Note de lecture**
- 329 **Etude en laboratoire de l'application topique de la deltaméthrine pendant le cycle nutritionnel des mâles de *Glossina tachinoides*.** Van den Bossche P. (*en anglais*)

RESSOURCES ALIMENTAIRES

- 334 **Note de lecture**
- 335 **Intérêt fourrager de *Calliandra calothyrsus* en altitude à la Réunion.** Mandret G., Tassin J. (*en français*)

RESSOURCES ANIMALES

- 341 **Aspects pratiques en élevage d'aulacodes (*Thryonomys swinderianus*). VI. Mesures préventives contre la mauvaise usure des incisives.** Mensah G.A., Schwarzenberg A., Stier C.-H., Kangni T., Gall C.F. (*en français*)
- 347 **Le polymorphisme des protéines sanguines chez le dromadaire (*Camelus dromedarius*) au Maroc.** Ouragh L., Bengoumi M. (*en anglais*)
- 349 **Facteurs affectant le poids à la naissance et la mortalité néonatale chez les moutons Massa et Foulbé dans un environnement chaud et sec au Cameroun.** Ebangi A.L., Nwakalor L.N., Mbah D.A., Abba D. (*en anglais*)

INDEX

- 354 **Index 1996 des auteurs, des mots-clés et géographique**

Contents

INFECTIOUS DISEASES

- 273 **Epidemiology of peste des petits ruminants (PPR) and rinderpest in Mali: serological surveys.** Tounkara K., Traore A., Traore A.P., Sidibe S., Samake K., Diallo B.O., Diallo A. (*in French*)
- 279 **Experimental vaccination of broiler chickens against Newcastle disease in Burkina Faso using the thermotolerant LaSota/A300 and V4/276 coated-millet vaccines.** Nguyen-Ba-Vy, Yerbanga E., Demandiere J.M., Mercier P. (*in French*)
- 284 **Information**
- 285 **Akabane virus: serological survey of antibodies in livestock in the Sudan.** Mohamed M.E.H., Mellor P.S., Taylor W.P. (*in English*)
- 289 **Causes of N'Dama breed cattle mortality in the plateau of Sankaran, Faranah, Guinea, in 1993-1994.** Mourad M., Magassouba B. (*in French*)
- 295 **Rapid diagnosis of African horse sickness.** Adeyefa C.A.O. (*in English*)
- 299 **Occurrence of cowpox-like lesions in cattle in Israel.** Yeruham I., Nyska A., Abraham A., Algazi R. (*in English*)
- 303 **Prevalence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica* and *Cryptosporidium* spp. in bulk milk, cows' faeces and effluents of dairy farms in Trinidad.** Adesiyun A.A., Webb L.A., Romain H., Kaminjolo J.S. (*in English*)
- 310 **Information**

PARASITIC DISEASES

- 311 **Influence of *Trypanosoma congolense* infection on some blood inorganic and protein constituents in sheep.** Katunguka-Rwakishaya E. (*in English*)
- 315 **Evaluation of the sensitivity of Woo test for detection of *Trypanosoma vivax*.** Desquesnes M., Tresse L. (*in French*)
- 322 **PCR sensitivity for *Trypanosoma vivax* detection with several methods of blood sample preparation.** Desquesnes M., Tresse L. (*in French*)
- 328 **Reading notes**
- 329 **Laboratory bioassays of deltamethrin, topically applied, during the hunger cycle of male *Glossina tachinoides*.** Van den Bossche P. (*in English*)

FEED RESOURCES

- 334 **Reading notes**
- 335 **Forage advantages of *Calliandra calothyrsus* in Réunion.** Mandret G., Tassin J. (*in French*)

ANIMAL RESOURCES

- 341 **Practical aspects of grass-cutter (*Thryonomys swinderianus*) breeding. VI. Preventive measures against insufficient incisor wear.** Mensah G.A., Schwarzenberg A., Stier C.-H., Kangni T., Gall C.F. (*in French*)
- 347 **Blood protein polymorphism in the one-humped camel (*Camelus dromedarius*) in Morocco.** Ouragh L., Bengoumi M. (*in English*)
- 349 **Factors affecting the birth weight and neonatal mortality of Massa and Fulbe sheep breeds in a hot and dry environment, Cameroon.** Ebangi A.L., Nwakalor L.N., Mbah D.A., Abba D. (*in English*)

INDEX

- 354 **Author, key word, geographical 1996 index**

Sumario

PATOLOGIA INFECCIOSA

- 273 **Epidemiología de la peste de los pequeños rumiantes (PPR) y de la peste bovina en Mali: encuestas serológicas.** Tounkara K., Traore A., Traore A.P., Sidibe S., Samake K., Diallo B.O., Diallo A. (en francés)
- 279 **Vacunación experimental de pollos de carne contra la enfermedad de Newcastle en Burkina Faso, con granos de mijo recubiertos de vacunas termotolerantes LaSota/A300.** Nguyen-Ba-Vy, Yerbanga E., Demandiere J.M., Mercier P. (en francés)
- 284 **Información**
- 285 **Virus Akabane: encuesta serológica de los anticuerpos en los animales domésticos de Sudán.** Mohamed M.E.H., Mellor P.S., Taylor W.P. (en inglés)
- 289 **Causas de mortalidad de los bovinos de raza N'Dama en la meseta de Sankaran, Faranah, Guinea, en 1993-1994.** Mourad M., Magassouba B. (en francés)
- 295 **Diagnóstico rápido de la fiebre equina africana.** Adeyefa C.A.O. (en inglés)
- 299 **Incidencia de lesiones similares a cowpox en Israel.** Yeruham I., Nyska A., Abraham A., Algazi R. (en inglés)
- 303 **Prevalencia de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica* y *Cryptosporidium*, en leche de tanque (no embalada), en heces de vacas lecheras y en efluentes de lecherías en Trinidad.** Adesiyun A.A., Webb L.A., Romain H., Kaminjolo J.S. (en inglés)
- 310 **Información**

PATOLOGIA PARASITARIA

- 311 **Influencia de la infección por *Trypanosoma congolense* en algunos constituyentes inorgánicos y proteicos de la sangre en ovinos.** Katunguka-Rwakishaya E. (en inglés)
- 315 **Evaluación de la sensibilidad del test de Woo para la detección del *Trypanosoma vivax*.** Desquesnes M., Tresse L. (en francés)
- 322 **Evaluación de la sensibilidad de la PCR para la detección del ADN del *Trypanosoma vivax* según diversos métodos de preparación de las muestras sanguíneas.** Desquesnes M., Tresse L. (en francés)
- 328 **Nota de lectura**
- 329 **Bioanálisis de laboratorio de la delta-metrina, aplicada en forma tópica, durante el «ciclo de hambre» del macho de la *Glossina tachinoides*.** Van den Bossche P. (en inglés)

RECURSOS ALIMENTICIOS

- 334 **Nota de lectura**
- 335 **Importancia forrajera de la *Calliandra calothyrsus* en altitud, en la Reunión.** Mandret G., Tassin J. (en francés)

RECURSOS ANIMALES

- 341 **Aspectos prácticos de la crianza del cobayo *aulacodes* (*Thryonomys swinderianus*). VI. Medidas preventivas contra el mal desgaste de los incisivos.** Mensah G.A., Schwarzenberg A., Stier C.-H., Kangni T., Gall C.F. (en francés)
- 347 **Polimorfismo proteico sanguíneo en el camello de una joroba (*Camelus dromedarius*) en Marruecos.** Ouragh L., Bengoumi M. (en inglés)
- 349 **Factores que afectan el peso al nacimiento y la mortalidad neonatal de las ovejas Massa y Fulbe en un medio caliente y seco en Camerún.** Ebangi A.L., Nwakalor L.N., Mbah D.A., Abba D. (en inglés)

INDICE

- 354 **Indice 1996 de autores, de temas y geográfico**

Epidémiologie de la peste des petits ruminants (PPR) et de la peste bovine au Mali : enquêtes sérologiques

K. Tounkara ^{1*} A. Traore ¹ A.P. Traore ¹ S. Sidibe ¹
K. Samake ¹ B.O. Diallo ¹ A. Diallo ²

Mots-clés

Ovin - Caprin - Bovin - Troupeau - Peste bovine - Morbillivirus - Immunologie - Epidémiologie - Test ELISA - Anticorps - Morbidité - Enquête - Mali.

Résumé

Dans le cadre de l'épidémiosurveillance de la peste bovine au Mali, une enquête sérologique a été conduite dans 58 troupeaux de petits ruminants. Sur 567 sérums analysés pour la détection des anticorps anti-peste bovine, deux seulement se sont révélés positifs. Ils proviennent de deux animaux âgés de plus de 6 ans et donc probablement contaminés lors de la dernière épidémie de peste bovine survenue en 1986. Il est probable que le virus bovipestique ne circule plus au Mali depuis cette date. En revanche, l'infection des chèvres et des moutons avec le virus de la peste des petits ruminants semble être importante : 74 p. 100 des troupeaux ont déjà été contaminés. La prévalence de l'infection individuelle est de 32 p. 100. Une enquête sérologique similaire conduite chez 450 bovins dépourvus d'anticorps anti-peste bovine a montré que 1,78 p. 100 de ces animaux a été en contact avec le virus PPR. Avec un taux si faible d'infection de bovins, le virus PPR n'a probablement pas d'incidence sur l'épidémiologie de la peste bovine au Mali.

■ INTRODUCTION

Le Mali, dans le cadre de la Campagne panafricaine de lutte contre la peste bovine (PARC), assure chaque année la vaccination de son cheptel. Les efforts accomplis jusqu'à présent ont été couronnés de succès puisqu'aucun cas de peste bovine n'a été enregistré depuis 1986. Il peut donc être considéré comme «provisoirement indemne de la maladie», première étape de la voie, dite de l'OIE, dans l'éradication de la peste bovine (15). Ce statut implique la cessation de la vaccination contre la peste bovine. En même temps doivent être mises en place des structures pour une bonne épidémiosurveillance de la maladie chez toutes les espèces sensibles au virus bovipestique, dont les petits ruminants. Ces derniers ne font l'objet d'aucune vaccination, ni contre la peste bovine, ni contre la

peste des petits ruminants (PPR), autre maladie des chèvres et des moutons. Avec des symptômes similaires sinon identiques, ces deux maladies sont provoquées par deux virus antigéniquement très apparentés entraînant des immunités croisées. Ce processus, suite à une primo-infection par le virus PPR (PPRV), serait à l'origine de la présence d'un taux élevé de bovins ne répondant pas à la vaccination antibovipestique (2).

Dans le présent article, les résultats d'enquêtes sérologiques menées dans le cadre de l'épidémiosurveillance de la peste bovine sont rapportés. Les premières ont concerné les petits ruminants et avaient un double objectif : déceler toute trace de circulation de virus bovipestique dans cette population et estimer la prévalence de la PPR au Mali. Les secondes ont porté sur des sérums de bovins ne renfermant pas d'anticorps anti-peste bovine. Cette catégorie de bovins représentait environ 20 p. 100 des animaux contrôlés entre 1990 et 1992 par le test spécifique d'ELISA de compétition (21, 22, 23). Ce chiffre est important eu égard aux efforts de vaccination antibovipestique annuelle. En raison de la possibilité d'interférence primo-infection PPR - vaccination anti-peste bovine évoquée par Anderson et McKay (2), 450 sérums de ces bovins ont été analysés pour la présence d'anticorps anti-PPR.

1. Laboratoire Central Vétérinaire, BP 2295, Bamako, Mali

Tél. : (223) 22 33 44, (223) 22 66 53

Fax : (223) 22 98 09

2. CIRAD-EMVT, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

* Auteur pour la correspondance

■ MATERIEL ET METHODES

Prélèvements

Sur les petits ruminants

L'étude transversale a porté sur 567 sérums de petits ruminants, récoltés parmi 58 troupeaux, des régions de Kayes (12 sérums, 2 troupeaux), Koulikoro (16 sérums, 1 troupeau), Sikasso (188 sérums, 13 troupeaux) et Ségou (351 sérums, 42 troupeaux). L'âge des animaux était compris entre 6 mois et 6 ans.

Dans la région de Ségou le nombre de sérums prélevés par troupeau était déterminé sur la base de 95 p. 100 de probabilité de dépistage de la maladie à 1 p. 100 de prévalence (4). En revanche, dans les autres régions aucune méthodologie appropriée d'échantillonnage ne pouvait être adoptée car le nombre d'animaux mis à disposition était fonction de la volonté du propriétaire du troupeau.

A chaque sérum était attribué un code indiquant la région, le secteur, le site et le numéro de prélèvement. Les sérums étaient conservés dans des congélateurs, au niveau des postes vétérinaires ou des secteurs d'élevage, puis transportés au laboratoire sous glace, où ils étaient stockés à -20°C avant d'être testés.

Sur les bovins

Au total 450 sérums ont été retenus. Ils provenaient de 15 troupeaux identifiés, sur la base de l'enquête de sérosurveillance des anticorps antibovipestiques (23), comme n'ayant aucun animal immunisé : Kayes (30 sérums, un troupeau), Koulikoro (30 sérums, un troupeau), Sikasso (30 sérums, un troupeau) et Mopti (360 sérums, 12 troupeaux).

Tests sérologiques

Les sérums ovins, caprins et bovins ont été testés pour la détection des anticorps antibovipestiques et anti-PPR par les méthodes de l'ELISA de compétition peste bovine et PPR (3, 11). La trousse de réactifs, les plaques NUNC MAXISORP (cat 4-39454) ont été fournies par l'Agence internationale de l'énergie atomique (AIEA) de Vienne.

Analyse statistique des résultats

La prévalence des anticorps antibovipestiques (PAC) a été estimée en rapportant le nombre de sérums positifs au nombre de sérums testés.

La prévalence de l'infection individuelle (PIi) de la PPR (prévalence des anticorps anti-PPR) a été estimée en rapportant le nombre de sérums positifs au nombre de sérums testés et celle de l'infection des troupeaux (PIt) de la PPR en rapportant le nombre de troupeaux ayant au moins un petit ruminant séropositif au nombre de troupeaux visités.

Les intervalles de confiance des prévalences ont été calculés avec 5 p. 100 d'erreur si : $n \times PIi > 15$ et $n(1-PIi) > 15$ (17).

■ RESULTATS

Recherche des anticorps antibovipestiques chez les petits ruminants

Les résultats sont indiqués dans le tableau I. Il en ressort que la prévalence des anticorps antibovipestiques était très faible chez les

petits ruminants : seuls deux sérums sur 567 étaient positifs (0,35 p. 100). Les animaux sur lesquels ils ont été prélevés étaient âgés de 6 ans ; ils pouvaient donc avoir été contaminés depuis relativement longtemps.

Tableau I

Prévalence des anticorps antibovipestiques chez les petits ruminants par région

Région	Sérums testés	Sérums positifs	Prévalence (%)
Kayes	12	0	0
Koulikoro	16	0	0
Ségou	351	1	0,28
Sikasso	188	1	0,53
Total	567	2	0,35

Recherche des anticorps anti-PPR chez les petits ruminants

Dans le tableau II sont mentionnés les résultats d'analyse des sérums des petits ruminants pour la présence d'anticorps anti-PPR. La prévalence de l'infection individuelle (PIi) était variable suivant la région : elle était de 15,43 p. 100 à Sikasso et a atteint 41,9 p. 100 à Ségou.

Tableau II

Prévalence des anticorps anti-PPR (l'infection individuelle) par région

Région	Sérums testés	Sérums positifs	Prévalence (PIi) (%)
Kayes	12	4	33,33
Koulikoro	16	4	25
Ségou	327	137	41,9 ± 5,35
Sikasso	188	29	15,43 ± 5,16
Total	543	174	32,04 ± 3,93

Dans la région de Sikasso, les prélèvements sanguins ont été effectués dans 13 troupeaux. Parmi eux, cinq avaient des animaux positifs avec des taux variant de 15 à 37,5 p. 100. D'après la présente enquête, la région de Ségou avait le taux d'infection des troupeaux le plus élevé : 83,33 p. 100 (35/42) contre 38,46 p. 100 pour celle de Sikasso. Le taux de PIi pouvait y atteindre 100 p. 100.

Dans le tableau III figurent les résultats classés suivant les âges des animaux sur lesquels les sérums ont été prélevés.

On y constate que, suivant la classe d'âge, les taux de prévalence individuelle d'infection variaient de $22,86 \pm 5,68$ p. 100, pour la tranche de 6 mois-1 an, à $50 \pm 8,73$ p. 100 pour les animaux de plus de 3 ans. Cette évolution est conforme à une situation d'enzootie : la chance d'entrer en contact avec l'agent infectieux augmente avec l'âge.

Tableau III

Prévalence de l'infection individuelle de la PPR selon l'âge

Age	Sérums testés	Sérums positifs	Prévalence (%)
6 mois-1 an	210	48	22,86 ± 5,68
1-2 ans	112	39	34,82 ± 8,82
2-3 ans	95	24	25,26 ± 8,74
3-6 ans	126	63	50 ± 8,73
Total	543	174	32,04 ± 3,93

Recherche des anticorps anti-PPR chez les bovins

D'après les résultats rapportés ci-dessus, la PPR est donc une infection très répandue dans la population des petits ruminants au Mali. Les auteurs ont aussi cherché à savoir si les bovins, souvent élevés en contact avec les chèvres et les moutons, étaient contaminés par le virus de la PPR (PPRV). A cette fin, 450 sérums d'origine bovine ont été testés pour la détection d'anticorps anti-PPR. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau IV. Le taux moyen de positivité était de 1,78 p. 100 (8/450). Les huit sérums se répartissaient à raison d'un ou deux par troupeau (résultat non apparent dans le tableau IV). Il en ressort donc que les chances de contamination des bovins par le PPRV étaient assez faibles en comparaison avec celles des chèvres et des moutons.

Tableau IV

Prévalence des anticorps anti-PPR chez les bovins par région

Région	Sérums testés	Sérums positifs	Prévalence (%)
Kayes	30	0	0
Koulikoro	30	2	6,67
Sikasso	30	1	3,33
Mopti	360	5	1,39
Total	450	8	1,78

■ DISCUSSION

Choix d'une méthodologie d'échantillonnage

L'interprétation des résultats de toute enquête est fonction de la méthodologie du choix des échantillons. L'échantillonnage aléatoire est souhaitable car il permet non seulement d'éliminer les biais liés à une sélection suivant des critères discutables, mais aussi de simplifier les calculs des erreurs relatives (4). Cependant, dans les conditions d'élevage extensif telles que celles du Mali, il est pratiquement impossible de l'appliquer correctement. Ceci explique l'absence de son application dans les régions d'élevage de

Kayes, Koulikoro et Sikasso où le nombre des prélèvements a été fonction de la volonté des propriétaires d'animaux. En revanche, dans la région de Ségou les prises de sang ont été effectuées de façon à avoir 95 p. 100 de probabilité de dépistage de 1 p. 100 de la maladie.

Le sondage par choix raisonné a été utilisé pour les prélèvements effectués sur les bovins. Les sérums bovins proviennent uniquement des troupeaux à très faible prévalence d'anticorps antibovipestiques et leur choix a été fait sur la base des résultats de séro-surveillance de la campagne de vaccination de 1992 (23).

Choix du test sérologique

Diverses méthodes sérologiques sont utilisées pour la détection des anticorps antibovipestiques et anti-PPR : la séroneutralisation, l'immunodiffusion en gélose, l'immunoélectroosmophorèse ; l'ELISA indirect, l'ELISA de compétition et le «Blocking» ELISA (3, 9, 11). Parmi celles-ci, seule la séroneutralisation, l'ELISA de compétition et le «Blocking» ELISA permettent de différencier les anticorps dirigés contre les virus de la peste bovine et de la PPR. La séroneutralisation nécessite non seulement un temps relativement long pour obtenir des résultats (10-15 jours), mais aussi est soumise aux aléas des contaminations bactériennes des cellules. Les tests immunoenzymatiques (ELISA de compétition et «Blocking» ELISA) sont reconnus comme étant très sensibles (3, 9, 11). Ils sont simples à utiliser, permettent de tester plusieurs sérums en un minimum de temps avec peu de réactifs et ils ne sont pas affectés par la non stérilité des sérums. Tous ces avantages ont motivé le choix de l'ELISA de compétition dans la présente étude.

Résultats sérologiques

Dans le cadre de PARC, des enquêtes sérologiques ont été effectuées sur le cheptel bovin du Mali afin d'évaluer la prévalence des anticorps antibovipestiques du cheptel bovin du Mali. Elle a été évaluée à 55 et 77 p. 100 respectivement pour les années 1989 et 1990 (22). Ces résultats, notamment la progression du taux de prévalence des anticorps anti-virus peste bovine, sont des reflets du succès de la vaccination. Ceci est confirmé par l'absence de foyer ou de suspicion de peste bovine dans le pays depuis 1986. Le Mali peut donc être considéré comme «provisoirement indemne de la maladie» et l'arrêt de la vaccination peut y être recommandé. En revanche, il devrait être mis en place un système efficace de dépistage et d'élimination de toute circulation de virus bovine pestique chez tous les animaux sensibles, les petits ruminants y compris. Il est en effet reconnu que le virus de la peste bovine peut infecter ces animaux avec expression ou non de la maladie (1, 6, 7). Jusqu'à présent, ils ont été mis à l'écart de la Campagne panafricaine de lutte contre la peste bovine ; or ils vivent en contact avec les bovins sur les pâturages au Mali. Aussi les auteurs ont-ils cherché à repérer des traces d'une infection éventuelle des petits ruminants par le virus bovine pestique. Sur un échantillon de 567 sérums de petits ruminants analysés pour la présence d'anticorps anti-virus peste bovine, seuls 2 (0,35 p. 100) se sont révélés positifs. Ils proviennent d'animaux âgés (6 ans) et donc très certainement contaminés lors de la dernière épizootie de peste bovine au Mali en 1986, les prélèvements ayant été effectués en 1992. Ces résultats confirment une fois de plus le succès de la campagne de vaccination anti-peste bovine.

Si cette enquête a révélé un taux d'infection des chèvres et des moutons par le virus bovine pestique presque nul, elle a, en revanche, montré qu'une grande proportion (plus de 30 p. 100) de ces animaux porte des anticorps anti-virus de la peste des petits rumi-

nants. La prévalence de l'infection individuelle varie de 25 p. 100 à Koulikoro à 41,9 p. 100 à Ségou. Par rapport à l'âge, les résultats de la présente enquête confirment l'idée selon laquelle la prévalence des anticorps augmente progressivement avec l'âge pour atteindre jusqu'à 74 p. 100 chez les animaux âgés de plus de 3 ans (Taylor 1979 cité par Scott (18)). Il existe une différence statistique entre les prévalences des quatre groupes d'âge enquêtés : elles varient de $22,86 \pm 5,68$ p. 100, pour la tranche d'âge 6 mois-1 an, à $50 \pm 8,73$ p. 100, pour les animaux de 3-6 ans. En analysant les résultats de cette étude, non plus au niveau individuel mais plutôt à celui des troupeaux, on trouve, une fois de plus, des taux très élevés, variant de 38,46 p. 100, à Sikasso, à 100 p. 100, à Kayes et Koulikoro. Ainsi, le virus de la PPR (PPRV) circule énormément au sein de la population des petits ruminants au Mali, comme dans presque tous les pays d'Afrique situés entre le Sahara et l'équateur (12, 16, 24), en Jordanie (10), en Inde (19) et au Sri Lanka (1). En revanche, il infecte peu les bovins car, d'après cette enquête sérologique, seul 1,78 p. 100 de ces animaux ont des anticorps anti-PPR. Ce taux est proche de celui trouvé en Côte d'Ivoire par Couacy (2,4 p. 100) (5) et au Cameroun par Ngangnou et coll. (4,5 p. 100) (14). Il est beaucoup plus faible que les chiffres rapportés par Anderson et McKay en Gambie et au Ghana (2) : respectivement 27 et 96 p. 100 des bovins séronégatifs en anticorps anti- peste bovine. La grande différence observée entre ces deux catégories de résultats peut être due à celle de la sensibilité entre les deux kits utilisés : celui du CIRAD-EMVT au Mali, au Cameroun et en Côte d'Ivoire, et celui de Pirbright en Gambie et au Ghana.

■ CONCLUSION

La campagne d'éradication de la peste bovine en Afrique, menée depuis plus de dix ans, a permis de réduire énormément l'incidence de cette maladie sur le continent. Ce succès a été obtenu grâce à une vaste campagne de vaccination des bovins. Les petits ruminants, comme tous les animaux de l'ordre des Artiodactyles, sont réceptifs au virus bovine pestique bien qu'ils y soient moins sensibles. Leur contamination par cet agent, même par une souche très pathogène, résulte parfois par une infection subclinique. Celle-ci est découverte lors d'enquêtes sérologiques qui mettent en évidence des anticorps antibovine pestiques. Cependant, dans certains cas, la présence du virus est révélée chez les bovins qui, après une contamination par des chèvres ou moutons non visiblement infectés, développent une forme clinique de la maladie (2). Aussi, bien que les petits ruminants n'aient pas été pris en considération dans la campagne de vaccination anti- peste bovine, ils sont soumis à l'épidémiologie de la maladie. C'est dans ce cadre qu'un test de détection d'anticorps anti- peste bovine sur 567 sérums prélevés sur des petits ruminants en 1992 a été effectué. Parmi eux, seuls deux se sont révélés positifs. Ils proviennent de deux animaux âgés de 6 ans et donc probablement contaminés lors de la dernière épidémie de peste bovine survenue au Mali en 1986. Il est fort probable que, depuis cette période, le virus bovine pestique ne circule plus dans le pays. La présente enquête a, en revanche, montré une forte présence d'un virus apparenté, celui de la PPR. La prévalence de l'infection des troupeaux par cet agent est de l'ordre de 74 p. 100. Avec des taux de morbidité et de mortalité certes très variables mais qui peuvent atteindre 60-80 p. 100, la PPR apparaît comme une des dominantes pathologiques des petits ruminants au Mali. Selon une étude faite par Stem au Niger (20), la vaccination des petits ruminants contre la PPR est économiquement bénéfique avec une valeur présente nette (NPV) de 24 millions de dollars en cinq ans sur un investissement de 2 millions de dollars. Il est donc souhaitable de mener une lutte contre cette ma-

ladie en incitant à la vaccination des chèvres et des moutons. A cette fin, le vaccin anti- peste bovine a été utilisé jusqu'à présent. Dans la stratégie d'éradication de la peste bovine, son emploi sera interdit dans tous les pays à partir du statut « provisoirement indemne ». Il sera donc recommandé d'utiliser chez les petits ruminants le vaccin homologué anti-PPR (6, 8, 13).

Bien que le Mali soit un pays d'enzootie de la PPR, le virus de cette maladie ne semble pas pouvoir interférer avec la vaccination antibovine pestique au Mali car seul 1,78 p. 100 des bovins contrôlés ont des anticorps anti-PPR.

Remerciements

Les auteurs remercient l'Agence internationale de l'énergie atomique (AIEA) pour son aide.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSON E.C., HASSAN A., BARRETT T., ANDERSON J., 1990. Observation on the pathogenicity for sheep and goats and the transmissibility of the strain of virus isolated during the rinderpest outbreak in Sri Lanka in 1987. *Vet. Microbiol.*, **21**: 309-318.
- ANDERSON J., MCKAY J.A., 1994. The detection of antibodies against peste des petits ruminants virus in cattle, sheep and goats and the possible implications to rinderpest control programmes. *Epidemiol. Infect.* **112**: 225-231.
- ANDERSON J., MCKAY J.A., BUTCHER R.N., 1991. The use of monoclonal antibodies in competitive ELISA for the detection of antibodies to rinderpest and peste des petits ruminants viruses. The sero-monitoring of rinderpest throughout Africa - Phase I. Vienna, Austria, AIEA, p. 45-53. (TECDOC - 623)
- CANNON R.M., ROE R.T., 1982. Livestock disease surveys a field manual for veterinarians. Canberra, Australia, Australian Bureau of Animal Health, Australian Government Publishing Service.
- COUACY-HYMAN E., 1992. Séro-surveillance de la peste bovine dans les espèces bovine, ovine/caprine et porcine. In: Proc. Res. Coord. Meet., Entebbe, Uganda, Septembre 21-25, 1992, FAO/IAEA/SIDA/OAU/IBAR/PARC Coordinated Research Programme, p. 103-111.
- COUACY-HYMAN E., BIDJEH K., ANGBA A., DOMENECH J., DIALLO A., 1995. Protection of goats against rinderpest by vaccination with attenuated peste des petits ruminants virus. *Res. vet. Sci.*, **59**: 106-109.
- DIALLO A., 1988. Peste bovine et peste des petits ruminants. Des menaces constantes contre l'élevage dans beaucoup de pays en voie de développement. *Impact : Sci. Soc.*, n° 150 : p. 191-204.
- DIALLO A., TAYLOR W.P., LEFEVRE P.C., PROVOST A., 1989. Atténuation d'une souche de virus de la peste des petits ruminants : candidat pour un vaccin homologué vivant. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **42** : 311-319.
- JEREMIAH T.S., GENEVIEVE L., HOUSE J.A., CHARLES A.M., EDWARD J.D., 1993. Monoclonal antibody-based blocking enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection and titration of peste des petits ruminants virus antibody in caprine and ovine sera. *J. clin. Microbiol.*, **31**: 1075-1082.
- LEFEVRE P.C., DIALLO A., SCHENKEL F., HUSSEIN S., STAAK G., 1991. Serological evidence of peste des petits ruminants in Jordan. *Vet. Rec.*, **128**: 110.
- LIBEAU G., PREHAUD C., LANCELOT R., COLAS F., GUERRE L., BISHOP D.H.L., DIALLO A., 1995. Development of a competitive ELISA for detecting antibodies to the peste des petits ruminants virus using a recombinant nucleoprotein. *Res. vet. Sci.*, **58**: 50-55.
- MAJIYAGBE K.A., SHAMAKI D., KULU D., UDEANI T.K.C., 1992. Peste des petits ruminants (PPR) and rinderpest (RP) antibodies in clinically normal small ruminants in the Cameroon and Nigeria. In: 2nd Biennial Conf. Small Ruminant Research Network, Arusha, Tanzania,

Decembre 7-12, 1992.

13. MARTRENCHAR A., ZOYEM N., DIALLO A., 1997. Study of a mixed vaccine against peste des petits ruminants and capripox infection in Northern Cameroon. *Small Ruminant Res.* (à paraître).
14. NGANGNOU A., ZOYEM N., HAMET M., ABDOULKADIRI S., 1996. Evaluation de la protection vaccinale contre la peste bovine au Cameroun. III - Evaluation globale. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **49** : 18-22.
15. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 1989. Report of the Expert consultation on rinderpest surveillance systems. Paris, France, OIE.
16. ROEDER P.L., ABRAHAM G., KENFE G., BARRETT T., 1994. Peste des petits ruminants in Ethiopian goats. *Trop. Anim. Health Prod.*, **26**: p. 69-73.
17. SCHWARTZ D., 1989. Méthodes statistiques à l'usage des médecins et biologistes, 3^e ed. Paris, France, Flammarion Médecine-Sciences, 318 p.
18. SCOTT G.S., 1981. Peste des petits ruminants (goat plague) virus, Chapter 33. The Hague, The Netherlands, Boston, USA, London, United Kingdom, Martinus Nijhoff Publishers, p 355-361.
19. SHAILA M.S., PURUSHOTHAMAN V., BHAVASAR D., VENUGOPAL K., VENKATESAN R.A., 1989. Peste des petits ruminants in sheep in India. *Vet. Rec.*, **125**: 602.

20. STEM C., 1993. An economic analysis of the prevention of peste des petits ruminants in Nigerian goats. *Prev. vet. Med.*, **16**: 141-150.
21. TOUNKARA K., 1991. La surveillance sérologique des anticorps antibovipeptiques chez les bovins au Mali (Résultats de 1990). *Revue malienne Sci. Tech.*, n° 2 : 31-43.
22. TOUNKARA K., 1991. Report on the Sero-monitoring Programme in Mali: The sero-monitoring of rinderpest throughout Africa. Phase I. In: Proc. Res. Coord. Meet. of the FAO/IAEA/SIDA/OAU/IBAR/PARC, Coordinated Research Programme, Bingerville, Côte d'Ivoire, November 19-23, 1990, p. 167-178.
23. TOUNKARA K., 1992. La surveillance sérologique des anticorps antibovipeptiques chez les bovins au Mali (Résultats de 1992). In: Proc. Res. Coord. Meet. of the FAO/IAEA/SIDA/OAU/IBAR/PARC Coordinated Research Programme, Entebbe, Uganda, 21-25 septembre 1992, p. 155-170.
24. WAMWAYI H. M., ROSSITER P.B., KARIUKI D.P., WAFULA J.S., BARRETT T., ANDERSON J., 1995. Peste des petits ruminants antibodies in East Africa. *Vet. Rec.*, **136**: 199-200.

Reçu le 26.2.97, accepté le 14.4.97

Summary

Tounkara K., Traore A., Traore A.P., Sidibe S., Samake K., Diallo B.O., Diallo A. Epidemiology of peste des petits ruminants (PPR) and rinderpest in Mali: serological surveys

Within the epidemiological surveillance of rinderpest in Mali a serological survey has been carried out on 58 herds of small ruminants. Out of 567 tested sera for the detection of antibodies against rinderpest 2 were positive. These sera were collected from two animals over 6 years old, probably infected during the last outbreak of rinderpest in Mali in 1986. Therefore, it can be assumed that the rinderpest virus has not circulated in Mali since that year. However, the infection rate among goats and sheep due to the PPR virus seemed to be high: 74 % of herds had already been infected. The prevalence of individual infection is 32 %. A similar serological survey was conducted on 450 cattleheads, without antibodies against the rinderpest virus and showed that 1.78 % of these animals had been in contact with the PPR virus. With such a low infection rate in cattle, the PPR virus probably has no incidence in the epidemiology of rinderpest in Mali.

Key words: Sheep - Goat - Cattle - Herd - Rinderpest - Morbillivirus - Immunology - Epidemiology - ELISA - Antibodies - Morbidity - Survey - Mali.

Resumen

Tounkara K., Traore A., Traore A.P., Sidibe S., Samake K., Diallo B.O., Diallo A. Epidemiología de la peste de los pequeños rumiantes (PPR) y de la peste bovina en Mali: encuestas serológicas

En el cuadro de la vigilancia epidemiológica de la peste bovina en Mali, se llevó a cabo una encuesta serológica en 58 hatos de pequeños rumiantes. Solamente dos de los 567 sueros analizados para la detección de anticuerpos anti-peste bovina, fueron positivos. Estos provenían de dos animales de más de seis años de edad y por consiguiente contaminados posiblemente durante la última epidemia de peste bovina, ocurrida en 1986. Es probable que el virus de la peste bovina no circule en Mali desde dicha fecha. Por el contrario, la infección de cabras y de ovejas con el virus de la peste de los pequeños rumiantes parece ser importante: 74 p. 100 de los hatos están contaminados. La prevalencia de la infección individual es de 32 p. 100. Una encuesta serológica similar llevada a cabo en 450 bovinos sin anticuerpos anti-peste bovina, demostró que 1,78 p. 100 de estos animales habían estado en contacto con el virus PPR. Con una tasa tan baja de infección bovina, el virus de la PPR no tiene posiblemente incidencia sobre la epidemiología de la peste bovina en Mali.

Palabras clave: Ovino - Caprino - Ganado bovino - Hato - Peste bovina - Morbillivirus - Immunología - Epidemiología - ELISA - Anticuerpo - Morbosidad - Encuesta - Mali.

Vaccination expérimentale des poulets de chair contre la maladie de Newcastle au Burkina Faso avec des grains de mil enrobés de vaccins thermotolérants LaSota/A300 et V4/276

Nguyen-Ba-Vy ^{1*} E. Yerbanga ² J.M. Demandiere ²
P. Mercier ²

Mots-clés

Volaille - Poulet de chair - Maladie de Newcastle - Vaccin - LaSota/A300 - V4/276 - Anticorps - Immunité - Aptitude à la conservation - Saison - Burkina Faso.

Résumé

La vaccination contre la maladie de Newcastle par la méthode de distribution des grains de mil enrobés de vaccins thermotolérants LaSota/A300 et V4/276 a été essayée à Ouagadougou, Burkina Faso, sur 298 poulets de chair d'origine européenne pourvus d'anticorps maternels. Des infections opportunistes, comme la colibacillose, ont décimé de 70 à 81 p. 100 des effectifs des trois lots vaccinés et aussi 24 p. 100 du lot témoin avant d'être éradiquées par une antibiothérapie. L'épreuve virulente avec la souche de virus Hertz 33/56, appliquée aux survivants deux mois après la vaccination, a tué 100 p. 100 des témoins, 78 p. 100 des poulets vaccinés avec le V4/276, 7 p. 100 des vaccinés avec le LaSota/A300, et n'en a tué aucun dans le groupe qui a reçu à la fois le V4/276 et le LaSota/A300 à une semaine d'intervalle. Ces deux derniers groupes possédaient aussi, avant l'épreuve, de hauts titres d'anticorps IHA. Les vaccins lyophilisés LaSota/A300 et V4/276 ont conservé de hauts titres de virus après des expositions de 8 à 34 jours à la température ambiante de la saison fraîche à Ouagadougou.

■ INTRODUCTION

La distribution aux volailles de granulés ou de grains alimentaires enrobés d'un vaccin vivant a été préconisée pour la lutte contre la maladie de Newcastle dans les élevages villageois des pays chauds (1, 2, 3, 4). Après le succès de la vaccination des poussins EOPS (exempts d'organismes pathogènes spécifiés) avec des grains de mil enrobés de virus LaSota/A300 (6), cette méthode a été essayée dans cette étude au Burkina Faso sur des poulets de chair avec des vaccins thermotolérants V4/276 et LaSota/A300. Les résultats sont présentés dans cet article.

1. CIRAD-EMVT, 10 rue Pierre Curie, 94704 Maisons-Alfort Cedex, France

2. Programme de Développement des Animaux Villageois (PDAV), BP 1907, Ouagadougou, Burkina Faso

* Adresse actuelle : CIRAD-EMVT, Campus international de Baillarguet, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

■ MATERIEL ET METHODES

Souches de virus

La souche vaccinale V4/276 est une variante thermotolérante issue de la souche de virus lentogène V4/UPM de la maladie de Newcastle (5). La souche LaSota/A300 est un dérivé thermotolérant (6) de la souche de virus LaSota. Les techniques de culture et de titrage de ces virus sur des oeufs embryonnés ainsi que celles de la fabrication des vaccins ont été décrites (5, 6).

La souche de référence Hertz 33/56 a été utilisée pour les épreuves virulentes.

Exposition des flacons de vaccins à la température ambiante

La thermotolérance et la décroissance des titres des vaccins V4/276 et LaSota/A300 ont été étudiées (5, 6).

Les vaccins lyophilisés V4/276 et LaSota/A300, fabriqués par CIRAD-EMVT à Maisons-Alfort, France, ont été envoyés par voie aérienne à Ouagadougou, Burkina Faso, et stockés dans une chambre froide à 4°C. Différents lots de ces vaccins ont subi ou non des périodes d'exposition à la température ambiante avant d'être renvoyés en France pour des retirages. Le titre moyen de chaque lot est la moyenne géométrique des titres de trois flacons, calculés selon la méthode de Reed-Muench (7). La température diurne-nocturne à Ouagadougou a été enregistrée en continu du 22 décembre 1993 jusqu'au 22 février 1994.

Technique de vaccination des volailles à Ouagadougou

La méthode de vaccination des volailles avec des grains de mil enrobés de virus a été décrite (6). Elle se résume brièvement à la reconstitution du contenu de chaque flacon de vaccin avec 30 ml d'une suspension de lait écrémé à 0,25 p. 100, puis à la distribution à chaque lot de 10 poulets de 100 g de grains de mil blanc mouillés extemporanément avec ces 30 ml de suspension de virus. Le titre moyen des flacons de vaccin conservés dans les mêmes conditions que ceux utilisés pour la vaccination des volailles a permis l'estimation de la dose de vaccin prise par chaque poulet.

Cinq cents poussins de souche chair «Darco 109», issus des œufs embryonnés importés de France et non vaccinés contre la maladie de Newcastle, ont été achetés à l'âge de 1 jour et mis en observation à la Station expérimentale de Gampela et dans les bâtiments du PDAV. Après l'élimination des sujets en mauvaise santé ainsi que ceux qui ont conservé encore à l'âge de 20 j des anticorps IHA d'origine maternelle à des titres supérieurs à 20 (inverse de la dilution sérique), les poulets sélectionnés ont été utilisés à l'âge de 7 semaines.

Les 98 volailles du premier lot ont reçu, à une semaine d'intervalle, deux fois des grains-vaccin V4/276. La seconde administration du vaccin n'est pas un rappel mais une simple mesure de prudence pour compléter la dose vaccinale sur des oiseaux qui ont ingéré une quantité insuffisante de grains-vaccin lors de la première distribution.

Les 100 poulets du second lot ont d'abord été vaccinés avec du V4/276 puis, une semaine plus tard, avec du LaSota/A300.

Les 100 sujets du troisième lot ont reçu deux distributions du vaccin LaSota/A300 à une semaine d'intervalle.

Le lot témoin ne comporte que 50 poulets.

Titration des anticorps

Des échantillons de sérums ont été prélevés avant la vaccination puis aux 30^e et 58^e jours après la première distribution des grains-vaccin. Les anticorps IHA ont été titrés selon la microméthode du Laboratoire central de Recherches avicole et porcine (CNEVA) de Ploufragan, France. Le titre moyen est l'antilogarithme de la moyenne géométrique (MG) des titres individuels (en log₁₀). Cette MG s'obtient en multipliant d'abord le log₁₀ de l'inverse de chaque dilution sérique par le nombre d'observations correspondantes, puis en divisant la somme de ces résultats par le nombre total des observations (9).

Epreuve virulente

L'épreuve virulente au 60^e jour après la vaccination a été effectuée avec la souche de virus Hertz 33/56 à la dose individuelle de 10^{5.2}

DIO₅₀ (dose infectant 50 p. 100 des oeufs) par la voie intramusculaire. Par précaution, toutes les volailles des élevages situés aux alentours de la station expérimentale avaient été immunisées avec un vaccin inactivé (ITA-NEW) 40 jours avant la date de l'épreuve. Le taux de protection est le pourcentage des poulets résistants à l'épreuve virulente. L'indice de protection (en log₁₀) d'un vaccin est la différence entre le taux de protection du lot vacciné et celui du lot témoin.

■ RESULTATS

Existence d'anticorps d'origine maternelle chez les poussins achetés dans le commerce

Les analyses sérologiques effectuées sur les 500 poussins de race de chair, achetés non vaccinés à l'âge de 1 jour, ont montré la présence d'anticorps IHA contre le virus de la maladie de Newcastle : 128 sujets avaient des titres supérieurs à 1,30 (log₁₀ de l'inverse de la dilution sérique) à l'âge de 20 jours; ceux-ci ont dû être écartés de l'expérimentation des vaccins. Les autres ont gardé au 30^e jour des titres égaux ou inférieurs à 0,7 pour 49,8 p. 100 d'entre eux, égaux à 1 pour 34,7 p. 100, et égaux à 1,30 pour 15,5 p. 100. Le titre moyen géométrique de ces poulets était 0,89, indiquant une dilution positive à 1/8. Ces volailles n'ont été utilisées qu'à l'âge de 48 jours, lorsque le taux moyen d'anticorps maternels était devenu plus faible.

Possibilité de vaccination des poulets de chair par la méthode de distribution des grains de mil enrobés de vaccin anti-Newcastle

A Ouagadougou, Burkina Faso, trois lots de poulets de chair ont reçu une double administration, à une semaine d'intervalle, de grains de mil recouverts soit avec du vaccin V4/276, soit avec du LaSota/A300. Les titrages des flacons de vaccins renvoyés en France ont permis d'estimer que les 98 poulets du premier lot ont reçu chacun le vaccin V4/276 à la dose moyenne de 10^{8.3} DIO₅₀ (dose infectant 50 p. 100 des oeufs) à la première administration, et de 10^{7.9} à la seconde. Les 100 sujets du deuxième groupe ont reçu chacun 10^{8.3} DIO₅₀ de V4/276 à la première distribution, et 10^{7.9} de LaSota/A300 à la suivante. Les 100 sujets du troisième lot ont ingéré deux fois des grains-vaccin LaSota/A300 aux doses respectives de 10^{8.2} et 10^{7.9} DIO₅₀.

Existence de graves infections opportunistes chez les volailles vaccinées

Des infections opportunistes sont apparues à partir de la deuxième semaine après la vaccination, non seulement dans les lots vaccinés, mais aussi parmi les témoins. Des cas de mortalité ont été constatés durant cinq semaines, amenant la perte de 81,6 p. 100 de l'effectif du 1^{er} lot, de 77 p. 100 du 2^e, de 70 p. 100 du 3^e et de 24 p. 100 du lot témoin. L'autopsie des morts a montré des lésions variables : pleurésie, poumons hémorragiques, rate hypertrophiée, foie congestionné, distension de vésicules biliaires, fausses membranes au niveau du jabot et du proventricule, congestion des méésentères, hypertrophie de la bourse de Fabricius, entérites avec dépôt fibrineux, etc. Le diagnostic de la maladie de Gumboro par le test d'immunodiffusion en gélose s'est révélé négatif. Il n'y avait pas de passage de virus virulent de la maladie de Newcastle dans cette station, puisque les analyses des sérums des survivants du 1^{er} lot et du témoin aux 50^e et 58^e jours après la vaccination n'ont montré que des titres insignifiants (inférieurs à 1/8) d'anti-

Tableau I

Titres moyens géométriques d'anticorps IHA des poulets vaccinés et non vaccinés (avant l'épreuve virulente)

Titres d'anticorps IHA (Log ₁₀ des inverses des dilutions sériques)	Nombre de poulets ayant des anticorps IHA			
	1 ^{er} lot (V4/276)	2 ^e lot (V4/276 et LaSota/A300)	3 ^e lot (LaSota/A300)	Témoin
0	11	0	0	7
0,7	3	0	0	31
1	1	0	0	0
1,3	0	0	0	0
1,6	2	0	0	0
1,9	1	1	9	0
2,2	0	4	8	0
2,5	0	9	10	0
2,8	0	7	3	0
3,1	0	2	0	0
3,4	0	0	0	0
Total de poulets	18	23	30	38
Titres moyens géométriques IHA				
- inverse des dilutions sériques	6	367	186	< 4
- en log ₁₀	0,80	2,56	2,27	0,57

corps IHA. Il a été isolé des morts une souche de colibacille qui était sensible à la colistine et aux nitrofuranes, mais résistante à l'amoxicilline, à la tétracycline, à l'ampicilline et au chloramphénicol. Un traitement tardif des volailles avec de l'oxyfurane pendant cinq jours a permis le sauvetage du reste des effectifs.

Formation d'anticorps IHA après la vaccination

Dans le 1^{er} lot vacciné par deux administrations de V4/276, les 18 rescapés des infections opportunistes ont montré, au 58^e jour après la vaccination, des titres d'anticorps IHA égaux ou inférieurs à 0,7 (log₁₀ de l'inverse des dilutions sériques), sauf pour quatre d'entre eux ayant des titres variant de 1 à 1,9 (tableau I). La moyenne géométrique des titres de ce lot est égale à 0,80, correspondant à une dilution positive à 1/6.

Dans le 2^e lot vacciné avec les souches V4/276 et LaSota/A300, l'examen des sérums des 23 survivants au 58^e jour a révélé des titres d'anticorps IHA égaux à 1,9 sur 4,4 p. 100 des sujets, à 2,2 sur 17,4 p. 100, à 2,5 sur 39,1 p. 100, à 2,8 sur 30,4 p. 100 et à 3,1 sur 8,7 p. 100 (tableau I). La moyenne géométrique est égale à 2,56 indiquant une dilution positive à 1/367.

Dans le 3^e lot vacciné deux fois avec le LaSota/A300, les 30 survivants étaient munis au 58^e jour d'anticorps IHA avec des titres égaux à 1,9 pour 30 p. 100 d'entre eux, à 2,2 pour 26,67 p. 100, à 2,5 pour 33,33 p. 100 et à 2,8 pour 10 p. 100 (tableau I). Le titre moyen géométrique a une valeur de 2,27, révélant une dilution positive à 1/186.

Les 38 survivants du lot témoin non vacciné ont montré, au 50^e jour de l'expérimentation, des titres d'anticorps IHA égaux à 0,7

pour 81,58 p. 100 des sujets et des titres négatifs pour 18,42 p. 100. La moyenne géométrique est égale à 0,57, indiquant une dilution positive à 1/4.

La formation d'anticorps IHA était donc insignifiante dans le lot témoin et dans le 1^{er} lot vacciné avec le V4/276. Elle a atteint des valeurs très significatives dans les deux autres lots qui ont reçu le LaSota/A300 seul ou en association avec le V4/276.

Pouvoir immunogène des vaccins LaSota/A300 et V4/276

L'épreuve virulente a été effectuée avec la souche de virus Hertz 33/56 sur des poulets au 60^e jour après la vaccination.

Dans le 1^{er} lot, 14 des 18 sujets vaccinés avec le V4/276 ont succombé à l'épreuve. Ce vaccin n'a donc conféré qu'une faible protection avec un taux de 22,2 p. 100 et un indice de protection (IP) de 1,34 (tableau II).

Dans le 2^e lot, les 23 poulets ayant reçu successivement le V4/276, puis le LaSota/A300, ont tous résisté à l'épreuve. Le taux de protection était de 100 p. 100 avec un IP égal à 2.

Dans le 3^e lot, les 30 sujets vaccinés avec le LaSota/A300 ont été protégés à 93 p. 100 avec deux morts à l'épreuve. Ce vaccin a donc un IP de 1,97.

Les 38 poulets non vaccinés du lot témoin ont péri à 100 p. 100 lors de l'épreuve virulente (tableau II).

Tableau II

Taux et indice de protection des vaccins

Lot	1	2	3	Témoin
Vaccins utilisés	V4/276	V4/276 et LaSota/A300	LaSota/A300	
Poulets - vaccinés - non vaccinés	98	100	100	50
Survivants - avant l'épreuve - après l'épreuve	18 4	23 23	30 28	38 0
Taux de protection	22,2	100	93,3	0
Indice de protection (en log ₁₀)	1,34	2	1,97	

■ PATHOLOGIE INFECTIEUSE

Thermotolérance des vaccins LaSota/A300 et V4/276

Les titrages des flacons de vaccin renvoyés d'Ouagadougou après différentes périodes de séjours à la température ambiante ont prouvé que chaque flacon de LaSota/A300 lyophilisé gardait en moyenne 10^{9.2} DIO₅₀ après 1 jour à l'extérieur, 10^{8.9} DIO₅₀ après 8 jours, et 10^{8.5} DIO₅₀ au bout de 34 jours. Chaque flacon de V4/276 lyophilisé contenait encore 10^{9.3} DIO₅₀ après 1 jour dans le milieu ambiant, 10^{8.9} après 8 jours et 10^{8.6} après 30 jours.

La température à Ouagadougou, enregistrée en continu du 22 décembre 1993 jusqu'au 22 février 1994, variait entre 18 et 30°C, mais se situait le plus souvent entre 20 et 26°C, avec une différence diurne-nocturne de 2 à 4°C. Pendant les 34 jours d'exposition des flacons de vaccin à l'extérieur, la température a fluctué entre 18 et 25°C au cours des deux premières semaines, puis entre 22 et 29°C le reste du temps. Ces vaccins lyophilisés n'ont donc jamais été conservés à des températures supérieures à 30°C, ce qui leur permettait de garder des titres relativement élevés après des séjours à l'extérieur.

■ DISCUSSION

La faisabilité de la méthode de vaccination des volailles contre la maladie de Newcastle avec des grains de mil enrobés de virus atténués, qui avait été vérifiée sur des poussins EOPS (6), a été confirmée par les expériences de cette étude à Ouagadougou. La taille de ces grains convient aussi bien aux poussins qu'aux adultes, outre leur appétence. La possibilité de mouiller ces grains avec une solution lactée facilite la tâche des vaccinateurs qui n'ont pas besoin de les concasser ou de les cuire, comme dans le cas des grains de maïs ou de riz (4, 8).

La mortalité constatée dans les différents lots de poulets après la vaccination ne peut être imputée à une quelconque virulence résiduelle des virus LaSota/A300 et V4/276, car l'innocuité de ces vaccins a été vérifiée sur des poussins EOPS avant leur administration à des poulets du commerce. Elle s'explique par l'inadaptation de l'organisme des poussins importés aux conditions de vie tropicale et leur manque de résistance au microbisme du milieu ambiant, car leurs anticorps d'origine maternelle ne correspondent pas aux germes de l'environnement. Il faut reconnaître toutefois

que la sensibilité de ces volailles a été exacerbée par le stress vaccinal, car les pertes se sont révélées plus importantes dans les lots vaccinés (70-81 p. 100) que parmi les témoins (24 p. 100). Il est prudent de faire accompagner la vaccination par une antibioprévention durant 4-5 jours et par une administration des vitamines antistress, notamment pour les poulets de race sensible. Des travaux en cours des auteurs au Sénégal, ont montré que les volailles de race locale des villageois sont beaucoup moins sensibles à ce stress vaccinal.

Les résultats d'immunisation des volailles ont mis en évidence l'efficacité du vaccin LaSota/A300. Le virus V4/276 ne leur a pas conféré une protection suffisante malgré l'usage de fortes doses. L'indice de protection a une différence significative entre ces deux vaccins. Selon les travaux de Westbury (10), la souche de virus V4 serait plus sensible aux anticorps d'origine maternelle que la souche LaSota. Ces anticorps pourraient donc empêcher le virus V4/276 de se multiplier jusqu'à un seuil suffisant pour induire une bonne immunité. Par contre, la croissance du virus LaSota/A300 serait moins gênée par cette barrière de protection.

Les enregistrements de la température ambiante à Ouagadougou au cours de cette étude ainsi que lors de la précédente (5) ont prouvé que dans un pays chaud, comme au Burkina Faso, il existe toujours au cours de l'année des périodes relativement fraîches où la température ambiante reste inférieure à 30°C. Elles sont propices au transport et à la distribution aux éleveurs de vaccins thermotolérants qui n'ont plus besoin d'une chaîne de froid. Le vaccin thermotolérant LaSota/A300 est destiné beaucoup plus aux éleveurs villageois des pays défavorisés qu'aux industriels. S'il fallait pratiquer une antibioprévention au moment de la vaccination, le coût deviendrait inabordable pour ces petits éleveurs. Heureusement, des travaux en cours des auteurs au Sénégal, ont permis d'envisager la suppression de cette mesure coûteuse.

■ CONCLUSION

La méthode de vaccination des volailles contre la maladie de Newcastle avec des grains de mil enrobés de virus atténués est faisable dans le milieu tropical. Les vaccins V4/276 et LaSota/A300 sont thermotolérants, mais seul le LaSota/A300 a conféré une bonne immunité aux poulets munis d'anticorps d'origine mater-

nelle. Dans un milieu malsain, la prévention contre les infections opportunistes est indispensable lors de la vaccination des races de volailles sensibles. L'étude des conditions optimales, encore mal connues, pour l'administration du vaccin LaSota/A300 aux poulets de race locale des villageois doit être poursuivie.

Remerciements

Nous remercions les directions du CIRAD-EMVT à Maisons-Alfort, du Programme de Développement des Animaux Villageois, du Laboratoire National d'Élevage et de l'Institut de Développement Rural à Ouagadougou, qui nous ont appuyés et accordé toutes les facilités pour la réalisation de cette expérimentation. Ces travaux ont été subventionnés par le Ministère français de la Coopération et du Développement.

BIBLIOGRAPHIE

1. AINI I., IBRAHIM A.L., 1990. Field trials of a food-based vaccine to protect village chickens against Newcastle disease. *Res. vet. Sci.*, **49**: 216-219.
2. FONTANILLA B.C., SILVANO F., CUMMING R., 1991. Oral vaccination against Newcastle disease of village chickens in the Philippines. *Prev. vet. Med.*, **10**: 273-283.

3. JAGNE J., AINI I., SCHAT K.A., FENNEL A., TOURAY O., 1991. Vaccination of village chickens in the Gambia against Newcastle disease using heat-resistant food-pelleted V4 vaccine. *Avian Pathol.*, **20**: 721-724.
4. JAYAWARDANE G.W.L., DE ALWIS M.C.L., BANDARA D., 1990. Oral vaccination of chickens against Newcastle disease with V4 vaccine delivered on processed rice grains. *Aust. vet. J.*, **67**: 364-366.
5. NGUYEN-BA-VY, 1992. Evaluation de la thermotolérance du vaccin V4 lyophilisé contre la maladie de Newcastle. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **45** (3-4) : 235-240.
6. NGUYEN-BA-VY, 1994. Essai de vaccination des poussins EOPS contre la maladie de Newcastle par la méthode des grains de mil enrobés d'une variante thermotolérante du virus LaSota. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **47** (4) : 357-360.
7. REED I.J., MUENCH H., 1938. A simple method for estimating fifty per cent end points. *Am. J. Hyg.*, **27**: 493-497.
8. SAMUEL J.L., BENSINK Z., SPRADBROW P.B., 1933. Oral vaccination of chickens with the V4 strain of Newcastle disease virus. Cooked and raw rice as a vehicle. *Trop. Anim. Health Prod.*, **25**: 2-10.
9. VILLEGAS P., PURCHASE H.G., 1989. Titration of biological suspensions. In : A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 3rd ed. Philadelphia, USA, University of Pennsylvania, Amer. Assoc. Avian Pathologists, p. 186-191.
10. WESTBURY H.A., 1984. Comparison of the immunogenicity of Newcastle disease virus strain V4, B1 and LaSota in chickens. 2. Tests in chickens with maternal antibody to the virus. *Aust. vet. J.*, **61**: 10-13.

Reçu le 26.10.95, accepté le 2.4.97

Summary

Nguyen-Ba-Vy, Yerbanga E., Demandiere J.M., Mercier P. Experimental vaccination of broiler chickens against Newcastle disease in Burkina Faso using the thermotolerant LaSota/A300 and V4/276 coated-millet vaccines

Vaccination against Newcastle disease with the thermotolerant LaSota/A300 and V4/276 coated-millet vaccines was tried in Ouagadougou, Burkina Faso, by feeding 298 European broiler chickens exhibiting maternal antibodies. Opportunistic infections, such as colibacteriosis, decimated 70-81 % of the three vaccinated groups and 24 % of control, before being eradicated by antibiotic therapy. The surviving chickens were challenged two months after vaccination with the Hertz 33/56 virus strain. This resulted in 100 % deaths in the control group, 78 % in birds vaccinated with the V4/276, 7 % in birds fed with LaSota/A300, and in no death in the group given both vaccines at one week interval. These last two groups also exhibited high titres of IHA antibodies before the challenge. The lyophilized LaSota/A300 and V4/276 vaccines kept high viral titres after 8-34 days' ambient temperature exposure during the cool season in Ouagadougou.

Key words: Poultry - Broiler chicken - Newcastle disease - Vaccine - LaSota/A300 - V4/276 - Antibody - Immunity - Keeping quality - Season - Burkina Faso.

Resumen

Nguyen-Ba-Vy, Yerbanga E., Demandiere J.M., Mercier P. Vacunación experimental de pollos de carne contra la enfermedad de Newcastle en Burkina Faso, con granos de mijo recubiertos de vacunas termotolerantes LaSota/A300

Se probó la vacunación contra la enfermedad de Newcastle, mediante la distribución de granos de mijo recubiertos de vacunas termotolerantes LaSota/A300 y V4/276, en Ouagadougou, Burkina Faso, en un total de 298 pollos de carne de origen europeo, provistos con anticuerpos maternos. Las infecciones oportunistas, como la colibacilosis, decimaron de 70 a 81 p. 100 de los efectivos de los tres grupos vacunados y el 24 p. 100 del grupo testigo, antes de la erradicación mediante tratamiento antibiótico. La prueba de virulencia con la cepa del virus Hertz 33/56, aplicada a los sobrevivientes, dos meses después de la vacunación, mató 100 p. 100 de los testigos, 78 p. 100 de los pollos vacunados con la V4/276, 7 p. 100 de los vacunados con la LaSota/A300, mientras que no hubo ningún deceso en el grupo que recibió la V4/276 y la LaSota/A300 al mismo tiempo, a una semana de intervalo. Estos dos últimos grupos presentaban también la prueba de títulos altos de anticuerpos IHA. Las vacunas liofilizadas LaSota/A300 y V4/276 conservaron títulos altos de virus post-exposición, de 8 a 34 días a temperatura ambiente en la estación fresca en Ouagadougou.

Palabras clave: Ave de corral - pollo de engorde - Enfermedad de Newcastle - Vacuna - LaSota/A300 - V4/276 - Anticuerpo - Inmunidad - Aptitud para la conservación - Estación del año - Burkina Faso.

Akabane virus: serological survey of antibodies in livestock in the Sudan

M.E.H. Mohamed¹ P.S. Mellor² W.P. Taylor³

Key words

Cattle - Sheep - Goat - Cow - Calf - Akabane virus - Neutralization test - Blood serum - Antibody - Sudan.

Summary

An investigation was conducted to assess the prevalence of Akabane virus antibodies in domestic ruminants from different ecological zones of Sudan. Neutralizing antibodies were demonstrated in sheep, goats and cattle sampled between 1979 and 1980 from El Obeid, Nyala, Kassala, Jonglei and Sennar. The highest prevalence was in Jonglei where 27 % of six sheep, 36 % of eleven goats and 47 % of 90 cattle had antibodies to the virus. Although antibodies were demonstrated in 8 % of 79 dams and 15 % of 70 dams of two sentinel calf herds in Central Sudan at Shambat and Um Benein, respectively, none of their sentinel calves sampled between 1981 and 1983 had antibodies. Antibodies were subsequently detected in 8 (14 %) out of 57 calves from Shambat and 5 (12 %) out of 40 from Um Benein of the random samples collected during 1985 from 1-3 year old calves. The implications of these results are discussed.

■ INTRODUCTION

Akabane virus, an arbovirus in the Simbu serogroup of the family *Bunyaviridae*, causes premature birth, still birth and congenital arthrogryposis hydranencephaly in cattle, sheep and goats (5, 7, 9). Major epizootics have occurred in Israel (7, 16), Japan (11) and Australia (4). The virus does not apparently produce ill effects in cattle, sheep and goats infected after birth (6, 12) and attempts to recover it from bull semen have been unsuccessful (13).

In Africa, outbreaks of congenital defects due to Akabane virus have been reported in South Africa (2, 19). The virus has also been isolated from a pool of about 100 *Culicoides* midges in that country by Theodoridis *et al.* (18), who also detected antibodies to the virus in cattle. In Kenya, Akabane virus was isolated from *Anopheles funestus* (8) and antibodies were detected both in domestic and wild ruminants, but without any evidence of congenital malformations (3). Al-Busaidy *et al.* (1) reported antibodies to Akabane virus in the sera of wildlife from two African countries South of the Sahara showing the wide geographical distribution of the virus in this continent.

To date no information is available concerning Akabane virus in the Sudan. The aim of the present work was therefore to investigate the epidemiology of this virus in domestic ruminants in the Sudan.

■ MATERIALS AND METHODS

Virus

The virus used was the JaGAR 39 strain of Akabane virus originally supplied by Dr. Y. Inaba of the National Institute of Animal Health, Tokyo, Japan, at the 19th passage in suckling mouse brain. The 6th passage in BHK-21 cells was used in the serum neutralization test.

Test sera

Field sera

Serum samples were collected during 1979 and 1980 from various domestic species from Nyala, El Obeid, Sennar, Kassala and Jonglei. The origins of the sera were related to different ecological zones of Sudan (figure 1).

Sentinel herds' sera

Between October 1980 and September 1983 sentinel calf herds were established at Khartoum University Farm, Shambat, Kartoum

1. Department of Preventive Medicine and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Science, University of Khartoum, PO Box 32, Khartoum North, Sudan

2. Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Woking, Surrey GU24 0NF, United Kingdom

3. EEC Delegation, YMCA Cultural Centre, JAI Singh Road, New Delhi, India

Akabane virus antibodies in Sudan

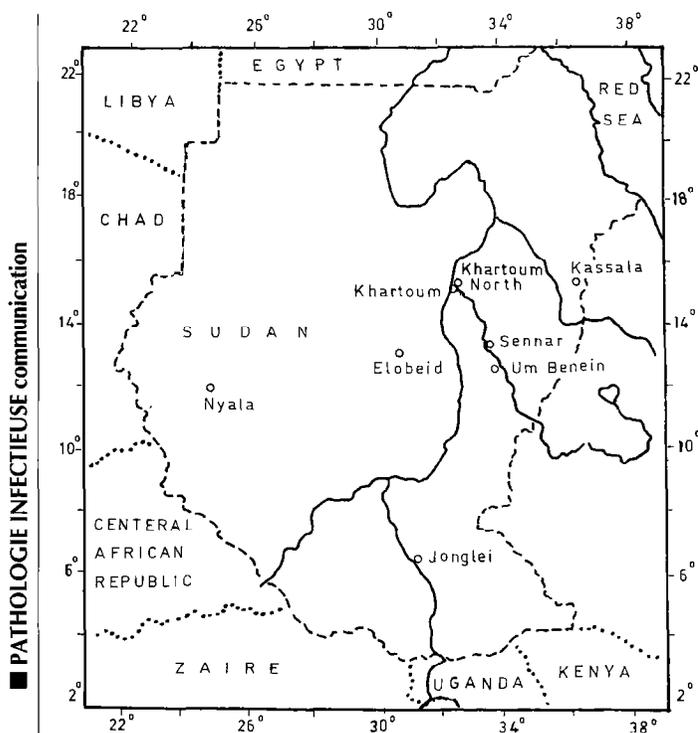


Figure 1 : map of the Sudan showing the locations of the two sentinel herds and areas from which sera were collected.

North and at Um Benein Animal Production Research Station, about 250 miles South of Khartoum on the Blue Nile. The purpose was to monitor the activity of some arboviruses of animals in these areas (10). Initial sera were obtained from the sentinel calves during the first month of life and thereafter at monthly intervals for one year or more. Monthly serum samples collected between July and December from 37 calves in 1981 and 53 calves in 1982, in addition to sera from 37 calves sampled between June and September 1983, were selected from the sentinel herd at Shambat for the purpose of the present investigation. From the sentinel herd at Um Benein sera collected from 45 calves in 1981, 27 calves in 1982 and 24 calves in 1983 during the same months as for Shambat were available for examination. Sera from 79 dams at Shambat and from 70 dams at Um Benein were also used. In addition, sera collected at random from 57 calves (one to three years old) at Shambat and from 40 calves at Um Benein during January and February 1985 were included in this investigation.

Serum neutralization test

The test was performed in disposable flat bottomed tissue culture microtitre plates as previously described (1). Controls carried out with each test included titration of the virus and known negative and positive sera.

RESULTS

The results of neutralization tests in field sera from sheep, goats and cattle are shown in table I. Serum neutralizing antibodies to Akabane virus were found in all three species examined and in all five locations. The highest proportion of animals with antibodies were from Jonglei, where 27.3 % of sheep, 36.3 % of goats and 47.8 % of cattle were positive. Among all three species cattle seemed to be the preferred feeding host for the vector in the Sudan.

The results of serum neutralization tests carried out on serum samples from Shambat and Um Benein sentinel calf herds and their dams between 1980 and 1983, together with the results obtained with sera collected from the calves sampled in 1985, are shown in table II. Neutralizing antibodies against Akabane virus were not detected in serum samples collected between 1981 and 1983 from either sentinel calf herd. Nevertheless, neutralizing antibodies were detected in seven dams from Shambat (8.8 %) and in 11 dams from Um Benein (15.7 %). Neutralizing antibodies were also detected in eight out of 57 calves from Shambat and in five out of 40 calves from Um Benein sampled during 1985.

DISCUSSION

In the present study sera were only considered positive for Akabane when titres were 80 or above as it has been suggested by Al-Busaidy *et al.* (1) that titres below this value may be due to non specific inhibitors of viral growth in the test sera. The results presented in table I indicated that antibodies to Akabane were detected in domestic animals in five ecological zones of Sudan. The highest proportion of animals with antibodies to Akabane virus were those from Jonglei. Cattle from this area showed the highest percentage of neutralizing antibodies of any groups tested. It is evident that a significant epizootic of Akabane virus had occurred in Jonglei during the years before those samples were collected in 1980. In this region, the White Nile spreads out and gives rise to large swampy areas. During the dry months and when the water level is low, these swampy areas are favourite grazing grounds for cattle and other livestock. They also provide ideal breeding sites for a huge variety of biting insects. This may explain why the number of animals with antibodies to Akabane virus in Jonglei was so much higher than in any other part of the Sudan and may support the hypothesis of Davies and Jesset (3) that Akabane virus is endemic in those areas of Sub-Saharan Africa which share ecological characteristics with parts of Kenya of known endemicity.

Table II shows that Akabane virus infections of sentinel calves at Shambat and Um Benein had not occurred between July and December of 1981 and 1982 and between June and September 1983.

The fact that most animals were examined at least twice (i.e. in two successive years) and in some cases in all three years without the detection of antibodies, eliminates the possibility that infection could have occurred between the sampling periods. However, antibodies were detected in dams from both Shambat and Um Benein indicating that these animals had been infected with Akabane virus at some stage during their life (table II). The absence of neutralizing antibodies from the sera of sentinel calves in Shambat and Um Benein between July 1981 and September 1983 and the subsequent detection of antibodies in 15 calves sampled from these two areas in 1985 indicate that Akabane virus was active in both areas some time between October 1983 and January 1985.

Infection of animals with either bluetongue virus (BTV) or bluetongue-related orbiviruses in both Shambat and Um Benein sentinel calves has previously been shown to occur each year between July and December (10). From the data presented here and the variability observed in the Akabane virus it seems likely that infection of animals with Akabane virus in Shambat and Um Benein is not an annual event but has a more sporadic occurrence. This view is supported by the observations made with other arbovirus diseases such as bovine ephemeral fever where major

Tableau I

Prevalence of neutralizing antibodies against Akabane virus in sera of sheep, goats and cattle from five regions in the Sudan

Location	Year and origin of samples	Sheep Num. positive/ Num. sampled (%)	Goats Num. positive)/ Num. sampled (%)	Cattle Num. positive/ Num. sampled (%)
El Obeid	1979 (abattoir)	12/114 (10.5)	-	14/98 (14.3)
Nyala	1980 (abattoir)	6/27 (22.2)	1/14 (7.1)	3/11 (27.3)
Kassala	1980 (field)	4/69 (5.8)	0/54	-
Jonglei	1980 (field)	6/22 (27.3)	4/11 (36.3)	43/90 (47.8)
Sennar	1980 (field)	16/101 (15.8)	-	5/47 (10.6)

Table II

Prevalence of antibodies against Akabane virus in bovine sera from Shambat and Um Benein

Location	Origin of samples	Date collected	Num. positive/ Num. sampled (%)
Shambat	Sentinel calves 8 months to 1 year old (1-2 years old) (up to 3 years old)	July-December 1981 July-December 1982 June-September 1983	0/37 0/53 0/37
	Mothers (age unknown, > 4 years)	October 1980 to September 1982	7/79 (8.8)
	Random samples (1-3 year old calves)	February 1985	8/57 (14.0)
	Um Benein	Sentinel calves (8 months to 1 year old) (1-2 years old) (up to 3 years old)	July-December 1981 July-December 1982 June-December 1983
Mothers (age unknown, > 4 years)		November 1980 to March 1982	11/70 (15.7)
Random samples (1-3 year old calves)		January 1985	5/40 (12.5)

epizootics occur after a number of years with either few or no cases in the interepizootic years (17). The epidemiology of Akabane virus in Central Sudan is therefore different from that of BTV and BTV-related orbiviruses. This difference may mean that Akabane virus is transmitted either less efficiently than bluetongue and other related orbiviruses or by different vectors. Unless major epizootics of Akabane disease occur, leading to noticeable outbreaks of abortion and foetal malformation, this disease may pass undetected. Even in the event of such outbreaks, agents other than Akabane virus which cause similar clinical signs usually have to be eliminated before Akabane virus is suspected (14).

In a study carried out by Sato *et al.* (15), it was shown that the sensitivity of the neutralization test for bovine antibodies against Akabane virus had been improved by incubation of virus-serum mixtures at 4°C for 48 h, followed by incubation with complement at 37°C for 30 min as compared with incubation at 37°C for 60 min in the absence of complement. The authors showed that sera collected from nine animals four weeks after vaccination with live

virus gave negative results by the traditional neutralization test, but recorded neutralizing antibody titres of 8-128 by the new method. It is therefore possible that some animals considered negative in the present study might have been positive if examined by the method of Sato *et al.* (15).

Acknowledgements

This work was supported by funds from the University of Khartoum, Sudan and the Overseas Development Agency. The authors would like to thank all field veterinarians who helped in the collection of samples. The work was conducted at the Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, United Kingdom.

REFERENCES

1. AL-BUSAIDY S., HAMBLIN C., TAYLOR W.P., 1987. Neutralizing antibodies to Akabane virus in free-living wild animals in Africa. *Trop. Anim. Health Prod.*, **19**: 197-202.

2. BARNARD B.J.H., 1977. Akabane virus in South Africa. *J. South Afr. Vet. Assoc.*, **48**: 161.
3. DAVIES F.G., JESSET D.M.A., 1985. A study of the host range and distribution of antibodies to Akabane virus (genus Bunyavirus, family Bunyaviridae) in Kenya. *J. Hyg.*, **95**: 95-196.
4. DELLA-PORTA A.J., MURRAY M.D., CYBINISKY D.H., 1976. Congenital bovine epizootic arthrogryposis and hydranencephaly in Australia. *Austr. vet. J.*, **52**: 594-595.
5. INABA Y., KUROGI H., OMORI T., 1975. Akabane disease: epizootic abortion, premature birth, stillbirth and congenital arthrogryposis-hydranencephaly in cattle, sheep and goats caused by Akabane virus. *Aust. vet. J.*, **51**: 584-585.
6. KUROGI H., INABA Y., TAKAHASHI E., SATO K., SATODA T., GOTO Y., OMORI T., MATUMOTO M., 1977. Congenital abnormalities in newborn calves after inoculation of pregnant cows with Akabane virus. *Infect. Immun.*, **17**: 338-343.
7. MARKUSFELD O., MAYER E., 1971. An arthrogryposis and hydranencephaly syndrome in calves in Israel 1969/70 - epidemiological and clinical aspects. *Refuah Vet.*, **28**: 51-61.
8. METSELLAR D., ROBIN Y., 1976. Akabane virus isolated in Kenya. *Vet. Rec.*, **99**: 86.
9. MIURA Y., HAYASHI S., ISHIHARA T., INABA Y., OMORI T., MATUMOTO M., 1974. Neutralizing antibody against Akabane virus in precolostral sera from calves with congenital arthrogryposis-hydranencephaly syndrome: brief-report. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, **46**: 377-380.
10. MOHAMED M.E.H., TAYLOR W.P., 1987. Infection with bluetongue and related orbiviruses in the Sudan detected by the study of sentinel calf herds. *Epidem. Infect.*, **99**: 533-545.
11. OMORI T., INABA Y., KUROGI H., MIURA Y., NOBUTO K., OHASHI Y., MATSUMOTO M., 1974. Viral abortion, arthrogryposis-hydranencephaly syndrome in cattle in Japan 1972-1974. *Bull. Off. int. Epizoot.*, **81**: 447-458.
12. PARSONSON I.M., DELLA-PORTA A.J., SNOWDON W.A., 1977. Congenital abnormalities in newborn lambs after infection of pregnant sheep with Akabane virus. *Infect. Immun.*, **15**: 254-262.
13. PARSONSON I.M., DELLA-PORTA A.J., SNOWDON W.A., O'HALLORAN M.L., 1981. Experimental infection of bulls with Akabane virus. *Res. vet. Sci.*, **31**: 157-160.
14. PORTERFIELD J.S., DELLA-PORTA A.J., 1981. Bunyaviridae: infection and diagnosis. In: Kurstak E., Kurstak C. eds., *Comparative diagnosis of viral diseases*, Vol. 4. London, United Kingdom, Academic Press, p. 479-508.
15. SATO K., TANAKA Y., TOKUHISA S., INABA Y., FUSHIKI T., MATUMOTO M., 1987. Appearance of slow-reacting and complement requiring neutralizing antibody in cattle infected with Akabane virus. *Vet. Microbiol.*, **14**: 183-189.
16. SHIMSHONY S., 1980. An epizootic of Akabane disease in bovines, ovines and caprines in Israel 1969/1970: epidemiological assessment. *Acta Morphol. Acad. Sci. Hungar.*, **28**: 197-200.
17. ST GEORGE T.D., STANDFAST H.A., CHRISTIE D.G., KNOTT S.G., MORGAN I.R., 1977. The epizootiology of bovine ephemeral fever in Australia and Papua-New Guinea. *Aust. vet. J.*, **53**: 17-28.
18. THEODORIDIS A., NEVILL E.M., ELS H.J., BOSHOFF S.T., 1979. Viruses isolated from *Culicoides* midges in South Africa during unsuccessful attempts to isolate bovine ephemeral fever virus. *Onderstepoort J. vet. Res.*, **46**: 191-198.
19. ZUMPT G.F., BRYSON R.W., ANDREOU S., 1978. Hydranencephaly in calves in Natal region (correspondence). *J. S. Afr. vet. Assoc.*, **49**: 32.

Reçu le 6.11.95, accepté le 23.4.97

Résumé

Mohamed M.E.H., Mellor P.S., Taylor W.P. Virus Akabane: enquête sérologique des anticorps chez les animaux d'élevage au Soudan

Cette étude porte sur une évaluation de la fréquence des anticorps antivirus Akabane chez les ruminants domestiques dans différentes zones écologiques au Soudan. Les anticorps neutralisants ont été détectés chez les moutons, les chèvres et les bovins. Les sérums de ces animaux ont été récoltés entre 1979 et 1980 à El Obeid, Nyala, Kassala, Sennar et Jonglei. C'est dans cette dernière région qu'ont été trouvés les plus forts taux de présence d'anticorps antivirus dans les sérums analysés : respectivement 27 p. 100, 36 p. 100 et 47 p. 100 chez les moutons (6), les chèvres (11) et les bovins (90). Bien que les anticorps aient été détectés chez 8 p. 100 des 79 vaches et chez 15 p. 100 des 70 vaches dans deux troupes sentinelles au Centre du Soudan, respectivement à Shambat et Um Benein, aucun des veaux suivis dans ces élevages entre 1981 et 1983 ne s'est révélé positif. Par la suite, des sérums d'échantillons aléatoires prélevés en 1985 sur des animaux âgés de 1 à 3 ans ont montré la présence d'anticorps chez 8 veaux sur 57 (14 p. 100) à Shambat et 5 veaux sur 40 (12 p. 100) à Um Benein. Les implications de ces résultats sont discutées.

Mots-clés : Bovin - Ovin - Caprin - Vache - Veau - Virus Akabane - Réaction de neutralisation - Sérum sanguin - Anticorps - Soudan.

Resumen

Mohamed M.E.H., Mellor P.S., Taylor W.P. Virus Akabane: encuesta serológica de los anticuerpos en los animales domésticos de Sudán

Se llevó a cabo una investigación para confirmar la prevalencia de anticuerpos del virus Akabane en los rumiantes domésticos de diferentes zonas ecológicas de Sudán. Los anticuerpos neutralizantes se encontraron en ovejas, cabras y bovinos, cuyas muestras se recolectaron entre 1979 y 1980 en El Obeid, Nyala, Kassala, Jonglei y Sennar. La prevalencia más elevada se encontró en Jonglei, donde 27 p. 100 de seis ovejas, 36 p. 100 de once cabras y 47 p. 100 de 90 bovinos presentaron anticuerpos al virus. A pesar de que los anticuerpos se encontraron en 8 p. 100 de las 79 hembras y 15 p. 100 de las 70 hembras pertenecientes a dos hatos control de bovinos, en el Sudán Central en Shambat y Um Benein, respectivamente, ninguno de los terneros control examinados entre 1981 y 1983 presentaron anticuerpos. Los anticuerpos fueron luego detectados en 8 (14 p. 100) de los 57 terneros de Shambat y 5 (12 p. 100) de los 40 de Um Benein, examinados en 1985, con edades de 1 a 3 años. Se discuten las implicaciones de estos resultados.

Palabras clave: Ganado bovino - Ovino - Caprino - Vaca - Ternero - Virus Akabane - Reacción de neutralización - Suero sanguíneo - Anticuerpo - Sudán.

Causes de mortalité des bovins de race N'Dama sur le plateau du Sankaran, Faranah, Guinée en 1993-1994

M. Mourad¹ B. Magassouba¹

Mots-clés

Bovin N'Dama - Veau - Mortalité - Groupe d'âge - Saison chaude - Saison humide - Parturition - Guinée.

Résumé

Les principales causes de mortalité de 280 bovins de race N'Dama, enregistrées sur le plateau de Sankaran, Faranah, Guinée en 1993-1994, ont été identifiées. Les diarrhées ont causé 40,81 p. 100 de mortalité chez les veaux de la naissance à 6 mois et 58,62 p. 100 chez ceux âgés de 6 à 18 mois, alors que la pasteurellose a entraîné la perte de 61,88 p. 100 des animaux de plus de 18 mois. La saison chaude et la saison humide ont clairement augmenté le taux de mortalité chez les veaux de la naissance à 6 mois, tandis que ce taux a augmenté notamment pendant la saison humide chez les bovins d'un âge supérieur à 18 mois. L'insuffisance des vaccinations, des soins vétérinaires et de l'hygiène de l'élevage ont également été à l'origine des mortalités.

■ INTRODUCTION

La productivité numérique et la rentabilité économique des élevages bovins en Afrique souffrent fortement des mortalités des jeunes animaux et des adultes. Une étude de la FAO (1) s'est intéressée au recensement des mortalités bovines dans la plupart des pays de l'Ouest et du Centre de l'Afrique.

En 1977, Gruvel et Gauch (2) en Côte d'Ivoire ont enregistré un taux de mortalité de 45 p. 100 dans les troupeaux de race Baoulé. Des résultats obtenus par le projet SATEC (4) en 1973, au Sénégal, ont montré que le taux de mortalité de la race N'Dama était de 30 p. 100 pour les animaux âgés de moins d'un an, 15 p. 100 pour les animaux âgés de 1 à 2 ans et 5 p. 100 chez les animaux âgés de 2 à 3 ans. Au Mali, la société SEDES (5) a trouvé que dans le secteur de Yanfolila le taux de mortalité était de 35 à 40 p. 100 dans les troupeaux N'Dama. Tyc et Legrand (7), au Burkina Faso, ont cité en 1972 un taux de mortalité dû à un parasitisme interne élevé, qui variait de 30 à 50 p. 100 chez des veaux Méré âgés de moins d'un an. En Guinée, la société Latinoconsult (3) a obtenu en 1977 des résultats indiquant que le taux de mortalité des animaux de race N'Dama était de 30 à 40 p. 100 chez les veaux de moins d'un an, 12 p. 100 chez les animaux âgés de 1 à 2 ans et 5 p. 100 chez les adultes.

Le Centre de Recherche Zootechnique de Faranah a mené une enquête en 1993-1994 sur le plateau de Sankaran afin d'identifier les principales causes de mortalité des bovins de race N'Dama par l'examen clinique, l'autopsie et l'analyse en laboratoire.

■ MATERIEL ET METHODES

De septembre 1993 à août 1994, 33 troupeaux choisis au hasard dans des élevages privés, représentant un effectif total de 1 598 animaux, ont été suivis. Trois groupes d'âge ont été constitués : 129 veaux de la naissance à 6 mois, 213 animaux de 6 à 18 mois et 1 256 de plus de 18 mois.

Des passages réguliers ont été effectués. Des examens cliniques et prélèvements de sang ont été également réalisés sur des animaux malades pour confirmation de la trypanosomose.

L'autopsie a été pratiquée dans les 24 h suivant la mort et a permis l'examen de certains organes : langue, poumons, coeur, estomac, gros intestin et intestin grêle.

Les démarches effectuées pour la confirmation du diagnostic des maladies infectieuses et parasitaires sont indiquées dans le tableau I.

Pour le calcul des taux de mortalité brut saisonnier, cinq périodes ont été considérées au cours de l'année : saison sèche froide (décembre, janvier et février), saison sèche chaude (mars et avril), début de la saison humide (mai et juin), saison humide (juillet, août et septembre) et début de la saison froide (octobre et novembre).

Le taux de mortalité brut annuel a été calculé séparément pour les trois groupes d'âge comme suit :

- Entre la naissance et 6 mois, en divisant le nombre annuel total de morts par l'effectif total des animaux de cette catégorie multiplié par 100. On considère l'effectif total comme dénominateur car il n'y a pas de sortie pendant cette période.

1. Centre de Recherche Zootechnique de Faranah (CRZF/IRAG), BP 1523, Conakry, République de Guinée

Tél. : (224) 44 42 62 ; Fax : (224) 41 57 58 ou 41 10 59

Tableau I

Méthodes de diagnostic des différentes maladies

Maladies	Echantillons prélevés	Méthodes de diagnostic	Confirmation de diagnostic
Charbon bactérien	1. Oreille de l'animal mort (du côté sur lequel le cadavre était couché). 2. Sang des vaisseaux superficiels (prélevé sur cadavre frais).	1. Frottis sur lame et coloration de Gram. 2. Réaction d'Ascoli. 3. Inoculation de cobayes.	1. Bactérioscopie : présence de bacilles Gram positif, épais, en «Canne de bambou». 2. Apparition d'un anneau de précipitation. 3. Mort des cobayes inoculés dans les 24 h qui suivent.
Charbon bactérien ou symptomatique	1. Sang du coeur. 2. Muscle du coeur. 3. Foie. 4. Lésions tumorales.	Frottis sur lame et coloration de Gram.	Bactérioscopie : Présence de bacilles Gram positif.
Trypanosomose	Sang frais prélevé à l'oreille des veaux suspects.	Examen direct d'une goutte de sang frais déposée sur une lame recouverte d'une lamelle.	Microscopie : présence de trypanosomes.
Pneumonie	Fragments de poumons. Sang du coeur.	Frottis sur lame et coloration de Gram.	Bactérioscopie : présence de bacilles Gram négatif.
Diarrhées	Matières fécales	Examen microscopique des selles par la technique de flottaison en liquide dense.	Microscopie : recherche d'éléments parasitaires.
Fasciolose	Foie	Recherche, <i>post mortem</i> , d'adolescarias de <i>Fasciola</i> dans un verre d'eau.	Présence de jeunes douves.

- Pour les deux autres catégories, entre 6 et 18 mois et plus de 18 mois, en divisant le nombre annuel de cas de mortalité par les effectifs moyens des animaux de ces catégories multiplié par 100.

Le taux de mortalité brut annuel global (tous âges confondus) a été obtenu en divisant le nombre total de cas de mortalité par an par la somme de l'effectif des animaux de la naissance à 6 mois et des effectifs moyens des catégories de 6 à 18 mois et de plus de 18 mois multiplié par 100.

Le taux brut saisonnier a été calculé séparément pour les trois groupes en divisant le nombre total d'animaux morts au cours d'une saison par l'effectif moyen d'animaux pendant cette saison multiplié par 100.

Toutes fautes imputables aux éleveurs (accidents, défaut de surveillance des jeunes et surdosage des produits vétérinaires) causant la perte d'un animal ont été groupées sous le terme «mauvaise gestion».

■ RESULTATS

Le tableau II montre que les 49 cas de mortalité enregistrés de la naissance à 6 mois entre septembre 1993 et août 1994 représentaient un taux de mortalité brut annuel de 37,98 p. 100. La morta-

lité brute saisonnière (figure 1) était plus élevée pendant la saison chaude et la saison humide (17,75 p. 100 et 11,23 p. 100). Les diarrhées étaient responsables de 40,81 p. 100 de mortalité de la naissance à 6 mois, suivies par la trypanosomose qui était responsable de 24,48 p. 100 de mortalité à cet âge. Le tableau III montre que les 29 cas de mortalité entre 6 et 18 mois représentaient un taux de mortalité brut annuel de 14,47 p. 100. Les diarrhées suivies par les pneumonies étaient les principales causes de mortalité à cet âge. Le taux de mortalité brut saisonnier (figure 2) était relativement faible. Les causes et fréquences de mortalité des bovins d'un âge supérieur à 18 mois sont présentées dans le tableau IV. Le taux de mortalité brut annuel était de 17,49 p. 100.

Les deux principales causes de mortalité à l'âge adulte étaient la pasteurellose bovine et le charbon symptomatique (61,88 p. 100 et 27,22 p. 100). La fasciolose a contribué à 2,47 p. 100 de mortalité. Le taux de mortalité brut saisonnier (figure 3) était plus élevé en saison humide (12,33 et 7,06 p. 100).

■ DISCUSSION

Le taux de mortalité brut annuel entre la naissance et 6 mois était de 37,98 p. 100. Ce résultat confirme ceux de Tyc et Legrand (7), des projets SATEC (4) au Sénégal, de Latinoconsult

Tableau II

Causes et fréquences de la mortalité des veaux de race N'Dama de la naissance à 6 mois, Faranah, Guinée, septembre 1993-août 1994

Causes	Nombre de cas de mortalité	% du total	Age* (mois)	Taux de mortalité (%)
Diarrhée	20	40,81	3,6 ± 0,4	15,50
Trypanosomose	12	24,48	2,3 ± 0,1	9,30
Pneumonie	8	16,32	2,8 ± 0,7	6,20
Mauvaise gestion	7	14,28	1,7 ± 0,5	5,43
Charbon symptomatique	2	4,08	4,7 ± 0,4	1,55
Total	49	100	2,9 ± 1,3	37,98

* moyennes et erreurs standards de l'âge des animaux à leur mort

Tableau III

Causes et fréquences de la mortalité des veaux de la race N'Dama à l'âge de 6 à 18 mois, Faranah, Guinée, septembre 1993-août 1994

Causes	Nombre de cas de mortalité	% du total	Age* (mois)	Taux de mortalité (%)
Diarrhées	17	58,62	11,2 ± 0,5	8,58
Pneumonie	7	24,13	11,7 ± 0,9	3,54
Mauvaise gestion	2	6,89	13,5 ± 0,5	1,01
Charbon symptomatique	1	3,44	9,0 ± 0,0	0,51
Charbon bactérien	1	3,44	12,0 ± 0,0	0,51
Fasciolose	1	3,44	8,0 ± 0,0	0,51
Total	29	100	11,3 ± 2,3	14,66

* moyennes et erreurs standards de l'âge des animaux à leur mort

Tableau IV

Causes et fréquences de la mortalité des bovins de la race N'Dama d'un âge supérieur à 18 mois, Faranah, Guinée, septembre 1993-août 1994

Causes	Nombre de cas de mortalité	% du total	Taux de mortalité (%)
Pasteurellose bovine	125	61,88	10,82
Charbon symptomatique	55	27,23	4,76
Fasciolose	5	2,48	0,43
Obstruction œsophagienne	3	1,49	0,26
Mauvaise gestion	2	0,99	0,17
Mammite	1	0,49	0,09
Autres (non identifiées)	11	5,44	0,95
Total	202	100	17,48

(3) en Guinée, cités par la FAO (1), qui indiquent respectivement 40,30 et 35 p. 100 comme taux de mortalité entre la naissance et un an chez les bovins de race N'Dama. Le fait qu'une partie des mises bas est faite pendant la saison humide peut être mis en relation avec des cas de mortalité par pneumonie. Ces pertes pourraient être réduites par l'organisation des saillies afin d'obtenir les mises bas hors saison humide.

Les diarrhées et la pneumonie causent 82,75 p. 100 des cas de mortalité entre 6 et 18 mois. Les résultats de cette étude sont légèrement supérieurs à ceux de Singh et Misra (6) en Inde qui indiquent que les diarrhées et la pneumonie causent 67,01 p. 100 des cas de mortalité. Le taux de mortalité brut saisonnier (figure 2) ne reflète pas l'effet de la saison sur la mortalité des veaux. Ceci est probablement dû à une résistance des veaux de cet âge aux changements climatiques.

A un âge supérieur à 18 mois, la pasteurellose bovine et le charbon symptomatique causent 89,1 p. 100 des cas de mortalité. Ces pertes peuvent être évitées par des campagnes annuelles de vaccination. Le taux de mortalité brut saisonnier (figure 3) s'élève au début et pendant la saison humide. Toutes les précautions sanitaires et zootechniques doivent être prises pendant cette période afin de diminuer le taux de mortalité chez les bovins.

Causes of N'Dama breed cattle mortality in Guinea

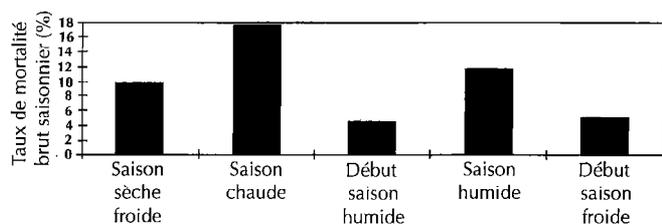


Figure 1 : taux de mortalité brut saisonnier des veaux de la naissance à 6 mois, Faranah, Guinée, septembre 1993-août 1994.

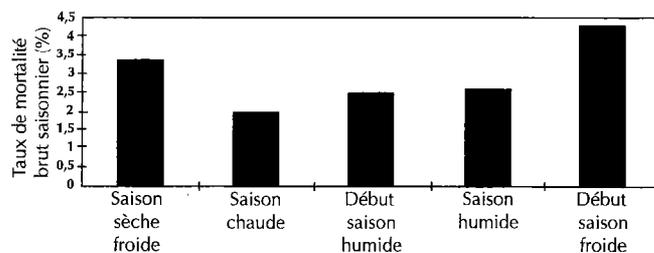


Figure 2 : taux de mortalité brut saisonnier des veaux à l'âge de 6 à 18 mois, Faranah, Guinée, septembre 1993-août 1994.

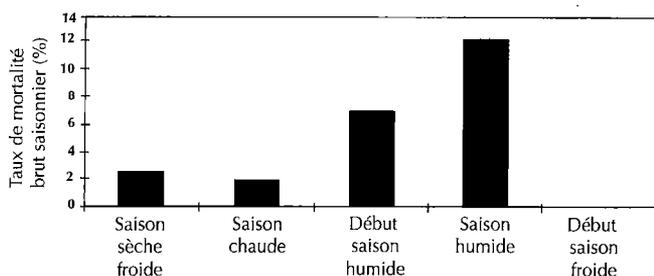


Figure 3 : taux de mortalité brut saisonnier des bovins d'un âge supérieur à 18 mois, Faranah, Guinée, septembre 1993-août 1994.

Le taux de mortalité brut annuel global (tous âges confondus) obtenu dans cette étude est inférieur à ceux obtenus par la société SEDES (5) chez la race N'Dama au Mali et par Gruvel et Gauch (2) chez la race Baoulé en Côte d'Ivoire (respectivement 18,89 contre 37,5 et 45 p. 100).

CONCLUSION

Le taux de mortalité chez les bovins de race N'Dama en Guinée peut être réduit par deux actions majeures : en évitant, par la vaccination, les principales maladies causant les grosses pertes, telles que la pasteurellose bovine, les charbons bactérien et symptomatique et en organisant la saillie pour des mises bas hors saison défavorable.

L'information des éleveurs sur les méthodes d'hygiène de l'élevage et la bonne pratique des soins vétérinaires peuvent aussi réduire la mortalité causée par les diarrhées.

Remerciements

Les auteurs remercient Dr Gnagna Gbanamou, Directeur du Centre pour son assistance morale et technique. Ils tiennent à remercier également M. Youness Chaloub, Coordinateur scientifique du Centre pour sa participation aux enquêtes.

BIBLIOGRAPHIE

1. FAO, 1980. Le bétail trypanotolérant en Afrique occidentale et centrale, étude par pays, Vol. 2. Rome, Italie, FAO, 311 p.
2. GRUVEL J., GAUCH J.G., 1977. Les trypanosomiasés animales en Côte d'Ivoire. Rome, Italie, FAO.
3. Latinoconsult S.A., 1977. Conakry, République de Guinée, Latinoconsult. (Projet de développement de l'élevage)
4. SATEC, 1973. Etude et définition d'un programme d'intervention en faveur de l'élevage en Casamance. Fond Européen de Développement de la Communauté Economique Européenne. Projet n°3122-135-15-02. Contrat d'étude n°901. Paris, France, SATEC.
5. SEDES, 1971. Création d'un berceau de la race N'Dama, région de Yanfolila (Mali). Paris, France, SEDES, 187 p.
6. SINGH R.B., MISRA R.R., 1989. Causes of mortality among halfbred cattle. *Indian J. Anim. Sci.*, 59: 486-488.
7. TYC J.M., LEGRAND M., 1972. Développement de l'élevage dans l'Ouest de la Haute-Volta. Paris, France, SEDES.

Reçu le 5.6.1996, accepté le 19.2.1997

Summary

Mourad M., Magassouba B. Causes of N'Dama breed cattle mortality in the plateau of Sankaran, Faranah, Guinea, in 1993-1994

The principal causes of mortality of 280 N'Dama breed cattle heads are presented with data obtained in the plateau of Sankaran, Faranah, Guinea in 1993-1994. Diarrhea caused 40.81 % and 58.62 % of calves' mortality between birth and six months and between six and 18 months, respectively. Pasteurellosis provoked 61.88 % of cattle mortality up to 18 months of age. Hot and rainy seasons clearly increased the mortality rate of calves between birth and six months, whereas that of cattle increased notably up to 18 months of age during the rainy season. The absence of vaccination, sufficient care and new methods of husbandry were also responsible for cattle mortality.

Key words: N'Dama cattle - Calf - Mortality - Age group - Warm season - Wet season - Parturition - Guinea.

Resumen

Mourad M., Magassouba B. Causas de mortalidad de los bovinos de raza N'Dama en la meseta de Sankaran, Faranah, Guinea, en 1993-1994

El presente artículo pretende identificar las principales causas de mortalidad de 280 bovinos de raza N'Dama, las cuales se presentaron en la meseta de Sankaran, Faranah, Guinea en 1993-1994. Las diarreas causaron 40,81 p. 100 de la mortalidad en los terneros del nacimiento a los 6 meses y 58,62 p. 100 en los animales de 6 a 18 meses de edad, mientras que la pasteurellosis causó pérdidas de 61,88 p. 100 de los animales de más de 18 meses. Las tasas de mortalidad aumentaron claramente durante la estación caliente y la estación húmeda en los terneros del nacimiento a 6 meses, mientras que estas tasas aumentaron principalmente durante la estación húmeda en los bovinos de más de 18 meses. Vacunaciones, cuidados veterinarios e higiene insuficientes se encuentran igualmente al origen de estas muertes.

Palabras clave: Ganado bovino N'Dama - Ternero - Mortalidad - Grupo de edad - Estación calida - Estación húmeda - Parto - Guinea.

Rapid diagnosis of African horse sickness

C.A.O. Adeyefa¹

Key words

Horse - African horse sickness virus - Diagnosis - ELISA - Antigen - Disease surveillance - Nigeria.

Summary

The rapid diagnosis of African horse sickness (AHS) during the incubation period using virus antigens in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and red blood cells (RBC) in a sandwich indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is reported. PBMC consistently gave higher positive ELISA results than RBC from blood collected during viraemia from clinically affected horses. The potential of the method described for wider application in rapid diagnosis and virus surveillance in susceptible equine populations, particularly in AHS-free and in enzootic areas, for effective control strategies is highlighted.

■ INTRODUCTION

African horse sickness (AHS) is an infectious arthropod-borne disease of equidae caused by an orbivirus which belongs to the Reoviridae family (8). There are nine antigenically distinct serotypes of the African horse sickness virus (AHSV) sharing common cross-reactive group viral proteins (6, 10) and all nine serotypes are enzootic in sub-Saharan regions of Africa, but only serotype 9 has been isolated in Nigeria (5). However, antibodies to both serotypes 4 and 9 have recently been reported in Nigerian horses (3). The disease is transmitted by arthropods notably *Culicoides* species, which are abundant in Nigeria. The abundance of *Culicoides* tends to maintain AHS epizootics in this country, where all the four forms of the disease are recognized (2, 9).

The virus replicates in selected endothelial cells following infection of a susceptible animal and diagnosis of AHS relies on detection of antibodies in sera of affected animals and possibly isolation of the virus. The techniques used are, however, labour intensive, time consuming and may sometimes prove negative. The work described here is an adjunct to the rapid group specific indirect sandwich ELISA method of Hamblin *et al.* (7) and was used to detect AHSV antigens in peripheral blood mononuclear cells during the incubation period before overt clinical signs of disease were manifested by infected animals. It has the potentials of virus surveillance and early warning to preclude the rapid spread of infection among susceptible equine populations.

■ MATERIALS AND METHODS

Test animals and samples

During a routine visit to the Ibadan Polo Club stables, Nigeria, two horses in adjacent boxes recently purchased from the

Northern part of the country were reported to be off feed and showing general malaise. Clinical examination revealed a pyrexia of 39.5-41.5°C, dullness and reluctance to move. No other abnormal clinical signs were noticed. Twenty milliliters of blood were collected from the jugular vein of each animal, 10 ml of which were placed in lithium heparin tubes and the other 10 ml into plain universal bottles for serum and immediately taken to the laboratory for investigation. As equine babesiosis is endemic in this region, blood smears stained with Giemsa stain were examined for *Babesia* organisms, other blood parasites and bacterial organisms. Only one or two *Babesia* parasites were observed, while no bacterial organisms were seen.

The harvested serum samples were tested by agar gel precipitation test (AGPT), counter current immunoelectrophoresis (CIEP) and haemagglutination inhibition test (HI) for antibodies against respiratory disease viruses (equine herpesvirus types 1 and 4, equine influenza virus, equine adenovirus and African horse sickness virus) and Nigerian equine encephalitis virus (NEEV). The sera were found to be negative for all the viruses. Since AHS is enzootic in Nigeria (3) and a lot of NEE cases have recently been encountered in Ibadan and Lagos Polo Club stables (4), it was decided to attempt virus isolation from the two blood samples.

Virus isolation

One milliliter of heparinized blood was washed twice in PBS and two-fold serial dilutions of each was made in PBS. Separate groups of three suckling mice were inoculated intracerebrally with each dilution in 20 µl volume. The mice were examined daily for 10-14 days. Dead or moribund mice were stored at -70°C until needed. Two hundred µl of whole blood were also inoculated into Hape 2 monolayer cells in medium containing penicillin and streptomycin and incubated at 37°C for 7 days. The cells were examined from the third day of incubation onwards for cytopathic effect (CPE).

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

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

PBMC were obtained from heparinized blood as previously described (1). Briefly, PMBC were collected from 8 ml heparinized blood by density gradient centrifugation on lymphocyte separating medium (Flow Laboratories, Scotland). The cells were washed three times in minimum essential medium (MEM) and pelleted. AHSV antigen was prepared by adding 1 ml of PBS and sonicating the cell pellets on ice for 1 min at an amplitude of 30 microns or by three cycles of freezing and thawing followed by vortexing.

Indirect sandwich ELISA

As virus isolation in tissue culture and animal inoculation was going to take some time, AHSV antigen detection in PMBC by indirect sandwich ELISA was carried out.

One milliliter of heparinized blood was washed three times with 5 ml sterile PBS and red blood cells (RBC) were lysed by sonication at an amplitude of 15 microns to obtain AHSV antigens. The ELISA was performed in flexible 96-well ELISA plates (Dynatech) by the method of Hamblin *et al.* (7) using AHSV antigens from PBMC and whole blood. The activities of the group specific rabbit and guinea-pig antisera used in the ELISA were determined by checkerboard titration and both were used in slight excess. The antisera were produced by standard method. The previously titrated rabbit antiserum was diluted 1 in 1000 in coating buffer (0.1 M carbonate/bicarbonate buffer pH 9.6) and passively adsorbed onto the ELISA plates, which were incubated overnight in a humidity chamber at room temperature (23°C) or overnight at 4 or 37°C for 1 h. The plates were then washed five times with PBS pH 7.6 by flooding and emptying the wells. Residual buffer was removed by blotting the plates. The test samples (sonicated PBMC and RBC) were diluted in single rows (100 µl/well) across the ELISA plates in a two-fold dilution series (undiluted to 1 in 128) in PBS containing 0.05 % between 20 (PBST) and neutral red indicator. The plates were then incubated at 37°C for 1 h on an orbital shaker at 150 rpm. This assay involves the capture of AHSV antigens in the test sample with rabbit anti-AHSV antibodies previously adsorbed onto ELISA

plates. Captured antigens are then detected by addition of specific guinea-pig antisera.

The plates were washed and 50 µl/well of previously titrated guinea-pig immune antiserum, diluted 1 in 1000 in PBST containing 5 % skimmed milk powder as blocking buffer, were added to each well. The plates were then incubated for 1 h at 37°C as above. Anti-guinea pig immunoglobulins conjugated to horseradish peroxidase enzyme were then used to measure the guinea-pig antibodies.

The plates were washed and 50 µl/well of previously titrated rabbit anti-guinea-pig immunoglobulins, conjugated to horseradish peroxidase and diluted 1 in 4000 in blocking buffer, were added to each well and the plates incubated as above. The plates were washed and colour was developed by adding 50 µl/well of an appropriate chromogen/substrate (diaminobenzidine or orthophenylene diamine/0.05 % H₂O₂, 30 % v/v) to each well.

The reaction was stopped after 10-15 min by adding 50 µl/well of 1.25 M H₂SO₄. The optical density (OD) values were measured spectrophotometrically at 492 nm wavelength where average values of 0.15 and above are positive, values of 0.1-0.15 are doubtful and should be confirmed by virus isolation and values below 0.1 are negative. Column 11 wells received in duplicate negative, positive and weakly positive control antigens while column 12 wells had PBS. The ELISA kit used, containing rabbit and guinea-pig antisera and AHSV serotype 4, was a gift from C. Hamblin, Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Pirbright, UK, where the reagents were developed.

Screening of in-contact and recently introduced horses

Heparinized blood was obtained from 10 other horses in the stable block, from three animals recently brought into the stables from Lagos and 3 recently born foals aged 1, 6 and 8 months. PBMC and AHSV antigens were obtained and tested as above to determine if these susceptible animals were incubating the virus.

■ RESULTS

A total of 20 animals were tested. The OD values are shown in table I.

Table I
Optical density readings of test samples from RBC and PBMC

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
RBC	A	-0.12	-0.13	-0.12	-0.13	-0.13	-0.13	-0.11	-0.13	-0.13	-0.13	-0.13 ^d	-0.12	
	B	-0.10	-0.10	-0.10	-0.09	-0.10	-0.10	-0.10	-0.10	-0.10	-0.10	-0.09 ^d	-0.10	
	C	-0.10	-0.10	-0.10	-0.09	-0.09	-0.10	-0.09	-0.09	-0.09	-0.09	-0.10	0.69 ^c	0.80
	D	-0.09	-0.09	-0.09	-0.09	-0.09	-0.09	-0.09	-0.09	-0.07	-0.09	-0.09	0.64 ^c	0.69
PBMC	E	0.06	0.05	0.06	0.11	0.06	0.10	0.09	0.10	0.08	0.15	0.52 ^b	0.62	
	F	0.08	0.08	0.09	0.11	0.08	0.09	0.10	0.08	0.09	0.25	0.42 ^b	0.28	
	G	0.12	0.74	0.60	0.81	0.03	0.11	0.12	0.04	0.08	0.12	0.08 ^a	0.37	
	H	0.13	0.84	0.20	0.74	0.09	0.17	0.16	0.16	0.13	0.12	0.10 ^a	0.42	

RBC = red blood cells

PBMC = peripheral blood mononuclear cells

a = negative control antigen

b and c = strongly positive control antigens (serotypes 4 and 9)

d = weakly positive control antigen serotype 4

High positive OD values of 0.15-0.84 were generally recorded with PBMC antigens while low positive OD values of 0.1-0.13 were recorded with lysed RBC. The original 2 horses showing pyrexia gave positive ELISA results with high OD duplicate values of 0.74, 0.84 and 0.60, 0.20 while the virus was recovered from suckling mouse brain and tissue culture inoculated with their blood. Six samples including those from the three foals gave negative OD values of 0.1. The virus was isolated from suckling mouse brain inoculated with blood from only two horses but no antibodies to AHS were detected in the horses' sera when tested by competition ELISA. The remaining 12 horses, including 10 in the same stable block and 2 from Lagos, gave positive OD values of 0.10-0.81. The virus was recovered from seven blood samples. All the viruses recovered were serotype 9 of AHS virus as indicated by antigenic cross-reactivity assay using sub-viral particles. No NEEV was isolated from the blood of any of the horses showing pyrexia.

Based on the initial positive ELISA results of these 2 horses, they were immediately removed and kept in fly-proof isolation boxes. The other 12 animals showing positive ELISA results were moved into loose boxes that had fly-proof wire netting to preclude spread of any infection by biting flies. The animals were withdrawn from any form of work for two weeks and monitored daily for signs of clinical infection. No overt clinical signs of AHS in all the horses stabled on the premises were observed.

■ DISCUSSION

The detection of AHSV antigens in horses showing only pyrexia and no overt clinical signs of the disease implies that virus antigens were detected during the viraemia and incubation period of the disease. Detection of the virus antigens at this stage is clinically significant as it will facilitate prompt isolation of affected animals and thus preclude spread of the disease. The virus was recovered from 9 out of 14 (64.3 %) animals showing positive ELISA results. It was thus possible to detect virus antigens from the field samples with the method described here although the amount of infectious virus in samples does not necessarily correlate with the total amount of antigens present in the samples as demonstrated in the present study.

Laboratory confirmation of clinical diagnosis of AHS has always relied on virus isolation and serological tests, which may take several days. The virulence of the infecting virus strain and the immunological status of the affected animals may influence the outcome of an infection. However, when atypical or mild signs are observed in horses, particularly in AHS-free areas, index case(s) may be missed and implementation of control measures may be delayed (8). In suspected cases of AHS, the choice of sample and test is very critical. The results of the present study indicate that the method described here may be useful in identifying index or suspect cases. Also, in the present study, the PBMC consistently gave higher positive ELISA results than RBC as was also observed by Hamblin *et al.* (8). This may imply that the virus replicates more in PBMC, where higher amounts of

infectious virus and virus antigens could be detected. Moreover, the virus present in or on RBC membranes may exist concurrently with serum antibodies (8), which may neutralize the virus and render it undetectable. The method described here using PBMC may be more applicable in diagnosis and virus surveillance, particularly in susceptible equine populations.

There is continued circulation of AHSV in Nigeria because of the constant presence of the epizootic determinants of the virus which thus makes the disease enzootic in the country (2, 3, 9). Consequently, AHSV has the potential for rapid global spread considering the increased international horse trade and quick transcontinental horse movement by air transport for competitions, sales and breeding. There is therefore the necessity for constant virus surveillance in endemic and AHS-free countries for which the method described here would be applicable.

REFERENCES

1. ADEYEFA C.A.O., 1989. The response of equine peripheral blood lymphocytes to *Strongylus vulgaris* arterial larval nitogen. *Trop. Vet.*, **7**: 58-64.
2. ADEYEFA C.A.O., DIPEOLU O.O., 1993. Studies on culicoides species (Latrielle, Diptera: Ceratopognidae) of Nigeria. XI. Species caught around horse stables. *Insect Sci. Appl.*, **14**: 211-214.
3. ADEYEFA C.A.O., HAMBLIN C., 1995. Continuing prevalence of African horse sickness in Nigeria. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **48**: 31-33.
4. ADEYEFA C.A.O., TOMORI O., AKPAVIE S.O., AWOSEYI A.O., 1996. Clinical and pathological features of Nigerian equine encephalitis. *Vet. Rec.*, **138**: 323-326.
5. BEST J.R., ABEGUNDE A., TAYLOR W.P., 1975. An outbreak of African horse sickness in Nigeria. *Vet. Rec.*, **97**: 394.
6. GORMAN B.M., RAYLOR J., WALKER J., 1983. Orbiviruses. In: Joklik W.K., Fraenkel-Courad H., Wagner R.R. eds., *The reoviridae*. London, United Kingdom, Plenum Press, p. 287-346.
7. HAMBLIN C., MERYENS P.P.C., MELLOR P.S., BURROUGHS J.N., CROWTHER J.R., 1991. A serogroup specific enzyme-linked immunosorbent assay for the detection and identification of African horse sickness viruses. *J. virol. Methods*, **31**: 285-292.
8. HAMBLIN C., ANDERSON E.C.C., MELLOR P.S., GRAHAM C.T., MERYENS P.P.C., BURROUGHS J.N., 1992. The detection of African horse sickness virus antigens and antibodies in young equidae. *Epidemiol. Infect.*, **108**: 193-201.
9. OLADOSU L.A., OLALEYE O.K., BABA S.S., OMILABU S.A., 1993. Isolation and identification of African horse sickness virus during an outbreak in Lagos, Nigeria. *Revue sci. tech. Off. int. Epizoot.*, **12**: 873-877.
10. MURPHY F.A., KINGBURY D.W., 1990. Virus taxonomy. In: Fields B.N., Knipe D.M. ed., *Virology*, 2nd edn. New York, USA, Raven Press, p. 9-35.

Reçu le 12.2.96, accepté le 3.4.97

Résumé

Adeyefa C.A.O. Diagnostic rapide de la peste équine

Dans le présent article est décrite une technique rapide de diagnostic de la peste équine dès la période d'incubation de la maladie. Il s'agit d'un test ELISA indirect en sandwich qui permet la détection des antigènes viraux liés aux lymphocytes circulants ou aux globules rouges. Sur les prélèvements sanguins récoltés durant la phase virémique des chevaux malades, les lymphocytes circulants ont donné de meilleurs résultats en comparaison avec les globules rouges. La possibilité d'application de cette technique comme technique de diagnostic rapide et d'épidémiosurveillance de la peste équine en zone non infectée comme en zone enzootique est discutée.

Mots-clés : Cheval - Virus peste équine africaine - Diagnostic - Test ELISA - Antigène - Surveillance épidémiologique - Nigeria.

Resumen

Adeyefa C.A.O. Diagnóstico rápido de la fiebre equina africana

Se describe el diagnóstico rápido de la fiebre equina africana (AHS) durante el período de incubación, gracias al uso de antígenos del virus en las células mononucleares en sangre periférica (PBMC) y en los eritrocitos (RBC), mediante un examen indirecto de inmunoabsorción de la unión enzimática (ELISA). Los resultados del ELISA con el PBMC fueron consistentemente más positivos que los del RBC de sangre recolectada durante la viremia de caballos clínicamente afectados. Se describe el potencial del método para una aplicación más amplia en el diagnóstico rápido y la vigilancia del virus en poblaciones equinas susceptibles, particularmente aquellas libres de AHS y en áreas enzooticas para estrategias de control efectivas.

Palabras clave: Caballo - Virus de la peste equina africana - Diagnóstico - ELISA - Antígeno - Vigilancia de enfermedades - Nigeria.

Occurrence of cowpox-like lesions in cattle in Israel

I. Yeruham^{1*} A. Nyska² A. Abraham³ R. Algazi⁴

Key words

Cattle - Orthopoxvirus - Herd - Epidemiology - Microscopy - Israel.

Summary

Two different clinical forms of cowpox infection, which occurred sporadically in one dairy herd and one beef herd, are described. The agent was identified by virologic test and by electron microscopy, when a characteristic orthopoxvirus was noted. No systemic illness was diagnosed with any of the two forms and recovery was observed in 3-4 weeks. The epizootiology of the infection is discussed.

■ INTRODUCTION

The Poxviridae are a large family of DNA viruses that share group-specific nucleo-protein antigens (8).

Cowpox is a mild, eruptive disease which affects the skin, particularly the teats and udders of cows. It is caused by an orthopoxvirus (6, 7). Cowpox affects a range of species, including wild and domestic Felidae, rodents and cattle (11). Cowpox is a classical zoonosis (2).

Cowpox is a rare disease, which has been reported mainly in Western Europe (6, 7), and there has been only one report outside the European continent (2).

The present study describes two clinical forms of cowpox in Israel.

Case history and clinical findings

Two sporadic and different forms of, apparently, cowpox were observed in one dairy herd and one beef herd.

First form

This form appeared in a herd comprising 90 dairy cows reared under good management, where yearly replacement of pregnant heifers is practised. The average yearly milk yield in this herd is 9,500 l per cow.

Skin lesions appeared in only three first-calving cows and were located only on the vulva. There, lesions consisted of multiple papules, nodules and thickening of the skin. The lesions were followed by necrosis and crater formation (figure 1). The illness occurred intermittently for different periods of time, with about six months passing between incidents.

Second form

This form was found in four out of 30 cows in a beef herd. Skin lesions were noted in the form of large papules (3-4 cm in diameter) covered with encrustations, on the entire skin surface, except for the udder and teats (figure 2). The disease in all animals occurred at the same time.

The infection did not spread within the herds in any of the two farms. None of the affected animals showed systemic illness, and recovery was observed in 3-4 weeks. The herd was located in different geographical regions and the dairy herd was kept under a zero-grazing management system.

■ MATERIALS AND METHODS

Histology

Biopsies were taken from affected animals in all herds. The skin samples were fixed in 10 % buffered formaldehyde for histology. Tissues were then embedded in paraffin, sectioned at 5 µm and stained with haematoxylin and eosin (H&E).

Virology

Pooled fresh and frozen (-70°C) skin samples from the affected cows were homogenized separately in sterile phosphate buffered saline, centrifuged at 1,500 x G for 10 min, and the supernatant was inoculated onto baby hamster kidney cells (BHK-21). Tissue

1. "Hachaklait" Gadera and the Koret School of Veterinary Medicine, The Hebrew University of Jerusalem, Bet Dagan 50250, Israel

2. The Kimron Veterinary Institute, Bet Dagan and the Koret School of Veterinary Medicine, The Hebrew University of Jerusalem, Bet Dagan 50250, Israel

3. The Kimron Veterinary Institute, PO Box 12, Bet Dagan 50250, Israel

4. Veterinary Services, Ministry of Agriculture, Nazareth, Israel

* Correspondence: 4, Hagoren St., Gadera 70700, Israel



Figure 1 : first form of cowpox. Note multiple papules, nodules and craters on the vulva.

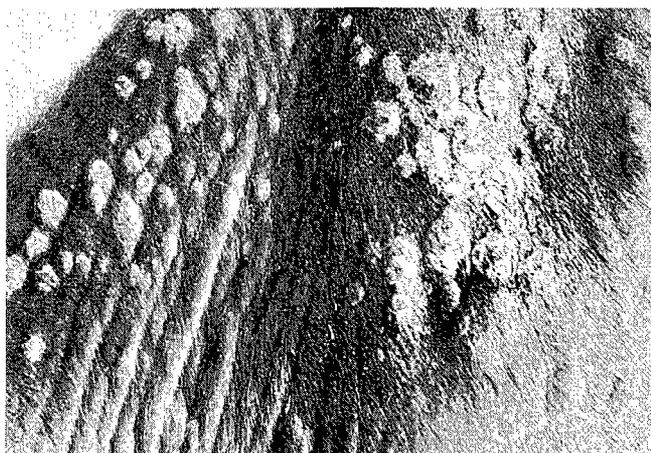


Figure 2 : second form of cowpox - large papules (3-4 cm in diameter) over the entire skin surface.

homogenates were inoculated onto cell culture and maintained at 37°C for a minimum of 10 days when they were frozen at -70°C. Up to seven blind passages were done on each inoculum.

Electron microscopy

Specimens from the affected animals were diluted 1:5 in PBS and centrifuged at 8,000 rpm. The supernatant was recentrifuged at 15,000 rpm for 1 h. The sediment was resuspended 1:5 in distilled

water and negatively stained for electron microscopic examination (adsorption to a grid, staining with 2 % phosphotungstic acid pH 6.5) and examined in a JEOL-GEM 100 CX type electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan).

■ RESULTS

Histological findings

All biopsies exhibited similar changes, including necrotic, ulcerated and inflamed areas with peripheral hyperplastic reactive epidermis. In these marginal regions, multiple vesicles filled with proteinaceous fluid and polymorphonuclear (PMNL) cells occupied the thickened hyperplastic epithelium (figure 3). At the perimeter of the lesions, the epidermis was markedly acanthotic with occasional noticeable intracytoplasmic eosinophilic inclusion bodies within the epidermal cells (figure 4).

Virological findings

Cytopathic effect appeared on the sixth day of the fifth blind passage, and was manifest as focal accumulations of shrunken, highly refractile cells with granular cytoplasm.

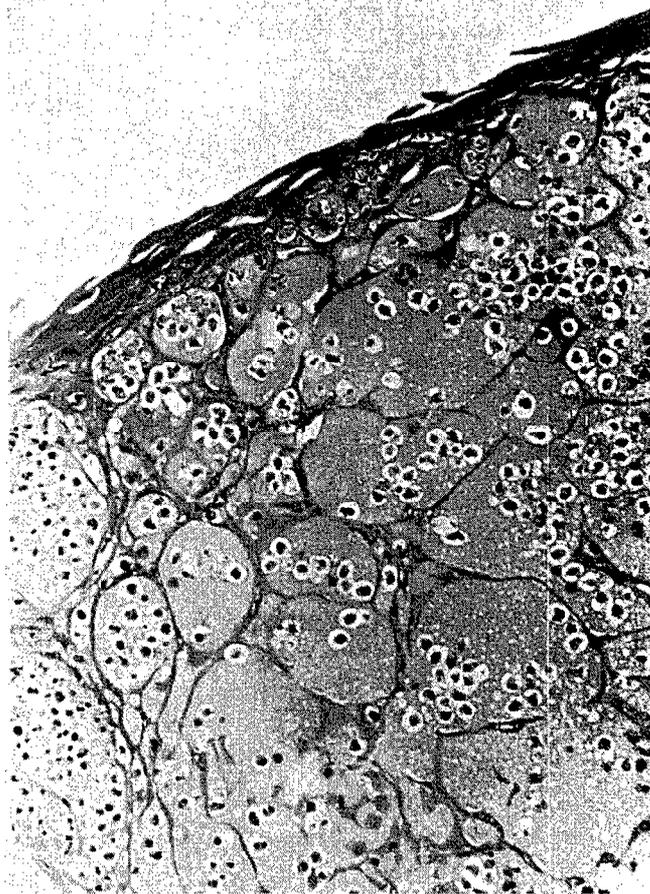


Figure 3 : histological section of a skin biopsy taken from a lesion of the first form. Note the intraepidermal vesicle formation (H&E X400).

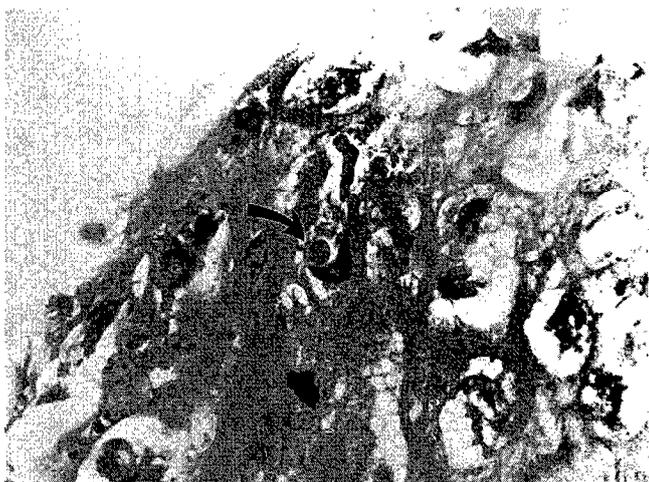


Figure 4 : histological section of a skin biopsy taken from a lesion of the second form. Note the presence of an intracytoplasmic eosinophilic inclusion body, associated with ballooning degeneration of the epidermal cells (H&E X1,000).

Electron microscopic findings

Examination of the affected tissue revealed virions characteristic of the genus orthopoxvirus in all specimens. In all cases examined, only incomplete viruses with capsule were observed (figure 5). The virus was round and ranged from 190 to 290 μm in diameter, morphology described by Doane and Anderson (4).

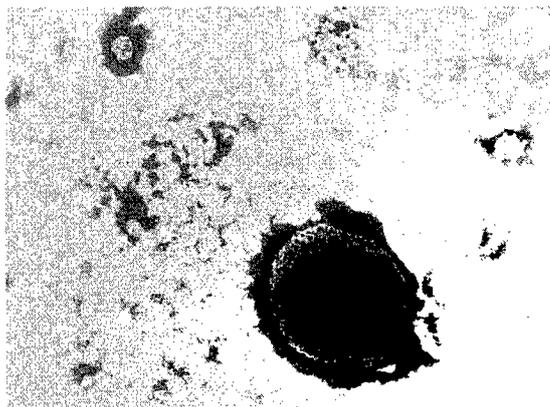


Figure 5 : characteristic virions of orthopoxvirus. Note rounded shape of incomplete virus with capsule (x 50,000).

DISCUSSION

The epizootiology of cowpox is complicated due to the existence of a number of stable biotypes of the virus (1). One possible explanation of its rarity and sporadic occurrence in cows is that this species is infected from a reservoir host. It has recently been stated that the cowpox virus is endemic to small wild mammals and cats, which serve as reservoir hosts (3). Cats are usually very abundant around cows especially those in dairy herds.

Infection is probably transmitted by direct contact or possibly by mechanical transmission *via* biting flies (5). The cattle in the herds sampled here were not vaccinated against any orthopoxvirus disease.

The disadvantage of electron microscopy is that it relies upon morphological characteristics, and cannot differentiate between closely related viruses such as cowpox and vaccinia (7). The vaccinia virus is in fact assumed to be a strain of the cowpox virus (9).

In typical cases of cowpox, lesions are confined to the teats and udder. In severe cases of cowpox, lesions may be seen on the medial thighs, perineum, vulva, scrotum of bulls, and mouth of nursing calves (10). The humans attending the animals in these herds were not obviously infected with cowpox.

In the present cases, the cowpox infection remained localized, with no systemic involvement. The clinical signs, epizootiological evidence, virologic, histologic and electron microscopic findings strongly suggest that all cows studied were infected with a poxvirus, apparently cowpox with atypical lesion localizations.

REFERENCES

1. BAXBY D., 1975. Epidemiology of cowpox. *Vet. Rec.*, **96**: 388.
2. BAXBY D., 1977. Is cowpox misnamed? A review of 10 human cases. *Br. med. J.*, **275**: 1379-1381.
3. BENNETT M., 1989. Cowpox in cats. *In Practice*, **November**: 244-247.
4. DOANE F.W., ANDERSON N., 1987. Electron microscopy in diagnostic virology. Cambridge, United Kingdom, Cambridge University Press, p. 87-90.
5. FENNER F., BURNET F.M., 1957. A short description of the poxvirus group (vaccinia and related viruses). *Virology*, **4**: 305-314.
6. GIBBS E.P.J., 1984. Viral diseases of the skin of bovine teat and udder. *Vet. Clin. North. Amer. large Anim. Pract.*, **6**: 187-202.
7. GIBBS E.P.J., JOHNSON R.H., OSBORNE A.D., 1970. The differential diagnosis of viral skin infections of the bovine teat. *Vet. Rec.*, **87**: 602-609.
8. MOHANTY S.B., DUTTA S.K., 1981. Veterinary virology. Philadelphia, USA, Lea & Febiger.
9. PALMIER J.E., 1979. Viral skin diseases in cattle. *Bovine Pract.*, **14**: 133-136.
10. SCOTT D.W., 1988. Large animal dermatology. Philadelphia, USA (and London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo), W.B. Saunders.
11. YAGER J.A., SCOTT D.W., 1993. The skin and appendages. In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C., Palmer N. eds., Pathology of domestic animals, 4th ed., Vol. 1. San-Diego, USA, Academic Press.

Reçu le 16.10.95, accepté le 4.2.97

Résumé

Yeruham I., Nyska A., Abraham A., Algazi R. Apparition de lésions proches de la variole bovine chez des bovins en Israël

Les auteurs décrivent deux formes cliniques différentes de variole bovine apparues sporadiquement dans un troupeau laitier et dans un troupeau à viande. Un orthopoxvirus caractéristique a été identifié par des tests virologiques et par microscopie électronique. Aucune maladie systémique n'a été identifiée pour ces deux formes cliniques et la guérison a été observée après 3 à 4 semaines. L'épizootologie de l'infection est discutée .

Mots-clés : Bovin - Orthopoxvirus - Troupeau - Epidémiologie - Microscopie - Israël.

Resumen

Yeruham I., Nyska A., Abraham A., Algazi R. Incidencia de lesiones similares a cowpox en Israel

Se describen dos formas clínicas diferentes de cowpox, las cuales se presentaron esporádicamente en un hato lechero y en un hato de carne. El agente se identificó mediante un test virológico y mediante microscopía electrónica, cuando se reconoció un ortopoxvirus. En ninguna de las dos formas se diagnosticó enfermedad sistémica y la recuperación se observó en 3-4 semanas. Se discute la epizootología de la infección.

Palabras clave: Ganado bovino - orthopoxvirus - Hato - Epidemiología - Microscopía - Israel.

Prevalence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica* and *Cryptosporidium* spp. in bulk milk, cows' faeces and effluents of dairy farms in Trinidad

A.A. Adesiyun ^{1*} L.A. Webb ¹ H. Romain ²
J.S. Kaminjolo ¹

Key words

Salmonella - *Listeria monocytogenes* -
Campylobacter - *Yersinia enterocolitica*
- *Cryptosporidium* - Dairy cow - Milk -
Faeces - Waste water - Dairy farm -
Contamination - Trinidad and Tobago.

Summary

The prevalence of *Listeria*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia* and *Cryptosporidium* species in bulk milk, faeces of dairy cows and effluents of milking parlours from dairy farms in Trinidad was investigated. Of the 177 bulk milk samples studied, 3 (1.7 %), 3 (1.7 %) and 2 (1.1 %) were positive for *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Y. enterocolitica*, respectively, but were all negative for *Campylobacter* and *Cryptosporidium* species. From 333 faecal samples tested, *L. monocytogenes*, *Campylobacter* spp. and *Cryptosporidium* spp. were detected in 11 (3.3 %), 19 (5.7 %) and 7 (2.1 %), respectively, which were significantly ($P < 0.05$; χ^2) higher than the detection rate (0 %) for *Yersinia* spp. *Salmonella* spp. were isolated from 3 (0.9 %) of the faecal samples. From 168 effluent samples cultured, *Campylobacter* spp. were isolated from 7 (4.2 %) samples while *Salmonella* was recovered from only 1 (0.6 %) sample with no sample positive for either *Yersinia* or *Listeria*. The difference was significant ($P < 0.05$; χ^2). A total of 19 (73.1 %) of 26 *Campylobacter* isolates exhibited resistance to one or more of the six antimicrobial agents tested. All 14 (100 %) isolates of *L. monocytogenes* were resistant to at least one agent while all *Salmonella* and *Yersinia enterocolitica* strains were susceptible to all antimicrobial agents used. It was concluded that the five enteropathogens tested were present on dairy farms in Trinidad and the potential for milk-borne diseases, due to these pathogens, exists for consumers, emphasizing the need for good sanitary practices.

■ INTRODUCTION

Milk from dairy animals, particularly cattle, has been responsible for several outbreaks of infections and intoxications in human

consumers worldwide (22, 26, 39). Most of these epidemics have been associated with the consumption of raw milk although pasteurized milk has also been implicated (20, 42).

Pathogens in milk may be aetiological agents for subclinical or clinical mastitis (1, 38), part of the normal flora of the skin of dairy animals or skin and anterior nares of their human handlers (35). Dairy cows are also carriers of several enteropathogens in their gut (41).

In Trinidad and Tobago, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Yersinia* and *Listeria* species have been isolated from livestock (5), raw meat

1. School of Veterinary Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of the West Indies, St. Augustine, Trinidad, West Indies

2. Veterinary Public Health Unit, Ministry of Health, Port of Spain, Trinidad, West Indies

* Correspondence: same as in 1. - E-mail: biodun@medsci.uwi.tt

(2) and ready-to-eat foods (4) while *Cryptosporidium* oocysts have been detected in diarrhoeic livestock (5). Also, verocytotoxigenic *Escherichia coli* and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* have been recovered from raw cows' milk sampled at the levels of the processing plant (3) and collection centres (8). To date, information is unavailable on the prevalence of enteropathogens in bulk milk and dairy cows at the farm level.

The study was conducted to determine the prevalence of *Campylobacter*, *Listeria*, *Yersinia*, *Salmonella* and *Cryptosporidium* species in bulk milk, faeces of dairy cows and effluents of milking parlours and to characterize the enteropathogens isolated.

■ MATERIALS AND METHODS

Study design

Dairy farms supplying bulk milk to the eight collection centres (IC, 5C, 5H, 2G, 2C, 2B, 6H and 3G), where the microbial quality of milk was earlier determined (8), were investigated. With the aid of a computer print out of the list of dairy farms in these milking areas, every other farm was randomly selected to be involved in the study. On every farm selected, 20 % of lactating cows was to be sampled.

Source, type and collection of samples

Bulk milk was pooled from the churns containing the morning's yield of each selected farm. Approximately, 100 ml of bulk milk samples were collected per dairy farm. In practice, a bulk milk sample originated from each dairy farm studied (table I). The median number of lactating dairy cows per farm in each milking centre during the visits is shown in brackets as follows: IC (9), 5C (4), 5H (2), 2G (5), 2C (2), 2B (12), 6H (2) and 3G (3). Overall, a total of 177 dairy farms across 8 milking centres were studied with a median number of lactating dairy cows per farm of 4. Faeces, or rectal swabs in cases where faeces could not be collected, were obtained from the rectum with the use of gloves and immediately

put into sterile wide-mouthed plastic containers. Effluents were collected, from the most distal point of the milking parlour or shed, into wide-mouthed sterile containers. Approximately, 100 ml of effluent were collected.

Isolation and identification of microorganisms

To detect *Listeria* spp. in 1 g of faeces or 25 ml of bulk milk or effluent, the faecal and milk or effluent samples were enriched in 9 ml and 225 ml, respectively, of nutrient broth (Difco, USA) at 4°C for 6 weeks. Subcultures were made onto *Listeria* selective media with Oxford supplement (Oxoid, UK) fortnightly. Inoculated plates were incubated at 37°C in 5 % CO₂ in a CO₂ incubator (Forma Scientific, USA) for 24-48 h. Typical black colonies were Gram-stained and tested for catalase and oxidase activities. Colonies that were Gram-positive short rods were inoculated into triple sugar iron (TSI) agar slants, urea slants and motility medium. Isolates with acid/acid, reaction without gas in TSI, urease-positive and typical umbrella-shaped motility were subjected to further biochemical tests (32).

Salmonella spp. were detected in either 1 g of faeces and 25 ml each of bulk milk or effluent which were inoculated into 9 ml of selenite cystine (SC) broth and 225 ml of lactose broth (LB), respectively, and incubated overnight at 42°C. Enriched faecal samples were inoculated onto xylose lysine desoxycholate (XLD) agar and incubated at 37°C for 24 h. One millilitre each of pre-enriched bulk milk and effluent in LB was inoculated into 10 ml each of selenite cystine and tetrathionate broth and incubated overnight at 37°C. Typical pink colonies with black centres on XLD and colonies with characteristic silvery appearance on BS plates were subjected to biochemical tests using standard methods (32). Serologic identification was initially carried out using the slide agglutination test with the polyvalent antiserum A-I α Vi. Confirmation of *Salmonella* isolates and complete serological typing was kindly done at the Caribbean Epidemiology Centre (CAREC), Port of Spain, Trinidad.

For the isolation of *Campylobacter* spp., a loopful of samples (faeces, bulk milk or effluent) was inoculated directly onto

Table I

Prevalence of species of *Listeria*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia* and *Cryptosporidium* in bulk milk

Milking Centre	Num. of bulk milk samples tested	Number (%) of samples positive				
		<i>Listeria</i> spp.*	<i>Salmonella</i> spp.**	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>Yersinia</i> spp.***	<i>Cryptosporidium</i>
IC	43	0 (0.0)	3 (7.0)	0 (0.0)	1 (2.3)	0 (0.0)
5C	35	1 (2.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
5H	33	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
2G	16	1 (6.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
2C	15	1 (6.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
2B	14	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (7.1)	0 (0.0)
6H	11	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
3G	10	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Total	177	3 (1.7)	3 (1.7)	0 (0.0)	2 (1.1)	0 (0.0)

* Made up of *L. monocytogenes*

** All isolates were *S. agona*

*** Both isolates were *Yersinia enterocolitica*, serotype 0:3, biotype 4

Campylobacter blood-free agar with CCDA supplement (Oxoid, UK). Inoculated plates were incubated in a CO₂ incubator (Forma Scientific Inc., USA) with 8-10 % CO₂ at 42°C for 24-48 h. Suspect colonies were Gram-stained. Gram-negative slender, seagull appearing microorganisms were subcultured onto blood agar and incubated at 42°C for 24 h in 8-10 % CO₂ and subsequently subjected to biochemical tests as suggested by Lior (31). Hippurate hydrolysis was used to distinguish between *C. jejuni* and *C. coli* (31).

To detect *Yersinia* spp., 25 ml of bulk milk or effluent were added to 225 ml of 0.067 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.6 while 1 g of faeces was enriched in 9 ml of 0.067 M PBS. Enrichment was done at 4°C for 3 weeks. Subcultures were made after 1 week and 3 weeks onto *Yersinia* agar containing *Yersinia* selective supplement (Oxoid, UK) and incubated at room temperature for 24-48 h. Typical colonies with "bull's eye" appearance demonstrated by a red or pink centre surrounded by a clear zone were subjected to biochemical tests (32). Serological identification of the isolates was kindly done at the Ontario Ministry of Health, Laboratory Services Branch, Ontario, Canada.

Cryptosporidium oocysts were detected in faeces and bulk milk processed within 2 h of collection by the formalin-ether concentration sedimentation technique (21). Ten millilitres of bulk milk samples were centrifuged to achieve sedimentation. The sediment was then added to formalin-ether as done for faecal samples. Smears were stained by the modified Ziehl-Neelsen method (21) and subjected to microscopic examination.

Determination of antibiograms of isolates

For the 26 isolates of *Campylobacter* spp., the following antimicrobial agents and concentrations were used: ampicillin (10 mcg), neomycin (30 mcg), streptomycin (10 mcg), kanamycin (30 mcg), chloramphenicol (30 mcg) and gentamycin (10 mcg). *Salmonella* isolates were tested for their sensitivity to: ampicillin (10 mcg), chloramphenicol (30 mcg), kanamycin (30 mcg), nalidixic acid (30 mcg), neomycin (30 mcg), streptomycin (10 mcg) and sulphamethoxazole/trimethoprim (30 mcg).

The susceptibility of *Listeria* spp. to the following antimicrobial agents and concentrations was determined using: penicillin (10 units), ampicillin (10 mcg), erythromycin (15 mcg), chloramphenicol (30 mcg), streptomycin (10 mcg), gentamycin (10 mcg) and sulphamethoxazole/trimethoprim (30 mcg). The antibiograms of *Yersinia* isolates were determined for streptomycin (10 mcg), gentamycin (10 units), chloramphenicol (30 mcg), sulphamethoxazole/trimethoprim (30 mcg), nalidixic acid (30 mcg) and kanamycin (30 mcg). The disc diffusion method (11) was used to determine the susceptibility of all the pathogens to the various antimicrobial agents.

Statistical analysis of data

The prevalences of enteropathogens in bulk milk, faeces and effluents and the antibiotic sensitivity of the isolates were compared amongst milking centres using the chi-square test for independence, with one degree of freedom.

RESULTS

The prevalence of selected enteropathogens in bulk milk samples is shown in table I. Of the 177 samples tested, 3 (1.7 %), 3 (1.7 %)

and 2 (1.1 %) were positive for *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Y. enterocolitica*, respectively. All the samples were negative for *Campylobacter* spp. and *Cryptosporidium* spp. Both isolates of *Y. enterocolitica* belonged to serogroup 0:3 and biotype 4. All *Salmonella* isolates belonged to serotype *agona*.

All bulk samples collected from centres 5H, 6H and 3G were free of all the enteropathogens tested. Centres IC and 5C, however, accounted for 1 of the 3 *Listeria* isolates, 3 of 3 of the *Salmonella* isolates and 50 % (1 of 2) of the *Y. enterocolitica* isolates recovered.

Table II shows the prevalence of enteropathogens in the faeces of dairy cows and effluents from the milking parlour or shed. Amongst the 333 dairy cows sampled, 11 (3.3 %), 3 (0.9 %), 19 (5.7 %) and 7 (2.1 %) were shedders of *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and *Cryptosporidium* spp., respectively. There were statistically significant differences in the carriage of *Campylobacter* spp. ($P < 0.001$; χ^2), *L. monocytogenes* ($P < 0.05$; χ^2), compared to that for *Y. enterocolitica*. All faecal samples collected from cows in centres 3G and 6H were negative for the enteric pathogens cultured. Centres IC and 5C, however, accounted for 54.5 % (6 of 11) of the *Listeria monocytogenes* isolates, 68.4 % (13 of 19) of the *Campylobacter* isolates and 100 % (7 of 7) of the *Cryptosporidium* - positive samples. Effluents from the milking parlours were negative for *L. monocytogenes* and *Yersinia* spp., but, of the 168 samples tested, 1 (0.6 %) and 7 (4.2 %) were positive for *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp., respectively. *Campylobacter* spp. were isolated at a statistically significantly ($P < 0.05$; χ^2) higher rate than other pathogens. All 7 isolates of *Campylobacter* spp. originated from milking centres IC and 5C.

The sensitivity of *Campylobacter* spp. to 6 antimicrobial agents is shown in table III. Of a total of 26 strains of *Campylobacter* spp. made up of 16 (61.5 %) strains of *C. jejuni* and 10 (38.5 %) of *C. coli*, 19 (73.1 %) exhibited resistance to one or more antimicrobial agents. Resistance varied from 66.7 % (Centres IC, 2G, 2B and 3G) to 100 % (Centre 5H). Resistance was highest to ampicillin with 19 (73.1 %) strains and lowest to gentamycin with 1 (3.8 %) strain and the difference was statistically significant ($P < 0.001$; χ^2). A total of 5 (19.2 %), 4 (15.4 %), 3 (11.5 %) and 2 (7.7 %) strains were resistant to neomycin, streptomycin, kanamycin and chloramphenicol, respectively, but the differences were not statistically significant ($P > 0.05$; χ^2). Both strains of *Y. enterocolitica* were sensitive to streptomycin, gentamycin, chloramphenicol, sulphamethaxazole/trimethoprim (SXT), nalidixic acid and kanamycin. All of 7 isolates of *Salmonella* from bulk milk, cow's faeces and effluents were sensitive to the seven antimicrobial agents used, namely ampicillin, chloramphenicol, kanamycin, nalidixic acid, neomycin, streptomycin and sulphamethaxazole/trimethoprim.

For the 14 strains of *L. monocytogenes* tested, 13 (92.9 %), 13 (92.9 %), 12 (85.7 %), 4 (28.6 %) and 2 (14.3 %) exhibited resistance to ampicillin, streptomycin, sulphamethoxazole/trimethoprim (SXT), erythromycin and penicillin, respectively. All strains were sensitive to chloramphenicol and gentamycin. Overall, 7 resistance patterns were observed amongst *L. monocytogenes* strains, but the prevalent patterns were ampicillin-sulphamethoxazole/trimethoprim-streptomycin, ampicillin-erythromycin-sulphamethoxazole/trimethoprim-streptomycin and ampicillin-streptomycin with 7 (50.0 %), 2 (14.3 %) and 1 (7.1 %) strains, respectively.

Table II
Prevalence of selected pathogens in faeces of dairy cows and effluents of farms

Milking Centre	Sources of samples cultured										
	Faeces of dairy farms					Effluents* of dairy farms					
	Num. of samples tested	Listeria	Salmonella**	Campylobacter	Yersinia	Num. (%) of faecal samples positive	Num. of samples tested	Listeria	Salmonella***	Campylobacter	Yersinia
IC	119	6 (5.0)	0 (0.0)	7 (5.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (3.4)	0 (0.0)	1 (2.3)	2 (4.5)	0 (0.0)
5C	56	0 (0.0)	1 (1.8)	6 (10.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (5.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (14.7)	0 (0.0)
5H	39	1 (2.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
2G	27	0 (0.0)	2 (7.4)	3 (11.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
2C	19	2 (10.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
2B	41	2 (4.9)	0 (0.0)	3 (7.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6H	11	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
3G	21	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Total	333	11 (3.3)	3 (0.9)	19 (5.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (2.1)	0 (0.0)	1 (0.6)	7 (4.2)	0 (0.0)

* Effluent samples were not processed for *Cryptosporidium* oocysts

** Isolates from centre 5C was group D untypable, from centre 2G was *S. typhimurium* and *S. javiana*, respectively

*** *Salmonella* isolated from centre IC was *S. agona*

Table III
Resistance of *Campylobacter* strains to antibiotics tested

Milking Centre*	Num. of <i>Campylobacter</i> ** strains tested	Num. (%) of strains*** resistant	Num. (%) of strains resistant to:					
			A****	N	S	K	C	CN
IC	9	6 (66.7)	6 (66.7)	1 (11.1)	2 (22.2)	1 (11.1)	0 (0.0)	1 (11.1)
5C	7	6 (85.7)	6 (85.7)	2 (28.6)	2 (28.6)	2 (28.6)	2 (28.6)	0 (0.0)
5H	1	1 (100.0)	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
2G	3	2 (66.7)	2 (66.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
2B	3	2 (66.7)	2 (66.7)	2 (66.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
3G	3	2 (66.7)	2 (66.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Total	26	19 (73.1)	19 (73.1)	5 (19.2)	4 (15.4)	3 (11.5)	2 (7.7)	1 (3.8)

* No *Campylobacter* isolate was recovered from milking centres 2C and 6H

** Consisting of 16 (61.5 %) strains of *C. jejuni* and 10 (38.5 %) strains of *C. coli*

*** Resistant to one or more of the antimicrobial agents tested

**** A - Ampicillin; N - Neomycin; S - Streptomycin; K - Kanamycin; C - Chloramphenicol; CN - Gentamycin

DISCUSSION

It was significant that all the five enteropathogens of importance to the dairy industry studied were detected either in the bulk milk, faeces of lactating cows or the effluent of milking parlours. This is important because these agents are of zoonotic significance and, in addition, could cause economic losses to the dairy industry (24, 29).

Failure to detect a correlation between detection of enteropathogens in bulk milk, faeces of cows and effluents was not unexpected since only 20 % of lactating cows contributing milk to the bulk supply and of the effluents on each farm were sampled. It is also known that all four bacterial enteropathogens studied could cause subclinical or clinical mastitis (15, 24) and therefore be present in milking without being detected in the faeces of affected animals or the effluents.

Centres IC and 5C were observed to have comparatively high prevalences of enteropathogens from the three sources studied, suggestive of high carriage rates of these pathogens or poor sanitary practices during milking. The potential for contamination of milk during the milking process on dairy farms visited was high since 95 % of these farms (Adesiyun and others, unpublished data) practised hand-milking. The risk of faecal materials splashing into milk in milking buckets from defaecating cows was therefore high. Various practices during milking have contributed to poor microbial quality of milk on dairy farms (35).

The prevalence of *Campylobacter* species (5.7 %) in cattle's faeces is considerably lower than the rates of 12.7 % to 46.7 % reported by others (10, 23). Adesiyun *et al.* (5) had earlier reported a prevalence of 12.9 % and 16.5 % in diarrhoeic and non-diarrhoeic cattle, respectively. Although *Campylobacter* was detected in 5.7 % of cows' faeces and in 4.2 % of 168 effluent samples, none of the bulk samples was positive for the microorganism. Cerqueira *et al.* (17) also failed to isolate *Campylobacter* from raw milk, while a prevalence as high as 12.3 % was reported by Rohrbach *et al.* (37). The peroxidase system, not inactivated in the bulk milk in the present study, may have been responsible for the non-isolation of *Campylobacter* (13).

The predominance of *C. jejuni* over *C. coli* amongst *Campylobacter* spp. agrees with earlier reports of studies in Trinidad (6) and elsewhere (36). Similarly, the antibiograms of the isolates of *Campylobacter* were comparable to the findings of others (6, 36).

L. monocytogenes has been reported to cause milk-borne listeriosis following consumption of raw or pasteurized milk and milk products (14, 20). The finding that 2 % of raw bulk milk in the present study contained *L. monocytogenes* is therefore of public health significance since over 30 % of dairy farmers and their families in Trinidad consume raw cows' milk (Adesiyun and others, unpublished data). The low rate of detection of *L. monocytogenes* in bulk milk (2 %) and faeces (3 %) of dairy cows agrees with published studies (25, 34).

Y. enterocolitica appeared to pose the least risk to consumption of milk from Trinidadian dairy farms with a failure to isolate the organism from faecal and effluent samples and only 1 % of bulk milk samples positive. *Y. enterocolitica* is known to be mostly harboured by pigs and the microorganism has been found on pork products (9) although other animals have been found to be carriers (5, 40). The isolation rate of *Y. enterocolitica* in bulk milk (1 %) is slightly lower than the 2.7 % reported by Davidson *et al.* (18).

Of epidemiological relevance was the finding that both *Y. enterocolitica* strains belonged to serotype 0:3 and biotype 4. All but one of the strains of *Y. enterocolitica* isolated from livestock (5) and slaughter pigs (7) in Trinidad were the same serotype 0:3 and biotype 4. *Y. enterocolitica* serotype 0:3 and biotype 4 may therefore be important as a cause of human yersiniosis in Trinidad, a prevalence presently unknown. Cryptosporidiosis, a disease not known to be associated with consumption of milk, has been associated with waterborne outbreaks (16, 33). The detection of *Cryptosporidium* oocysts in the faeces of cattle in milking parlours is therefore important from the viewpoint of environmental contamination. The faecal prevalence (2 %) of *Cryptosporidium* oocysts is however much lower than the 9.4 % and 7.6 % reported for diarrhoeic and non-diarrhoeic calves, respectively, in Trinidad (5). In addition to

Cryptosporidium being able to cause diarrhoea in dairy calves (12), parasitized dairy cows have been demonstrated to experience reduced milk yield, as much as 3.2 kg per day (19). The zoonotic significance of cryptosporidiosis was emphasized by reports that dairy farmers had significantly higher risk of contracting cryptosporidiosis compared to non-farmers (30).

The 1.7 % prevalence of *Salmonella* in bulk milk compares favourably with prevalences of 2 % for milk filters (27) and 0.25 % for milk of dairy cows with subclinical mastitis (28). Rohrbach *et al.* (37) reported a much higher prevalence of 8.9 % for *Salmonella* in bulk milk. Adesiyun *et al.* (5) reported finding 6.0 % and 2.5 % of diarrhoeic and non-diarrhoeic calves, respectively, positive for *Salmonella*.

Acknowledgements

The technical assistance rendered by Nestlé Trinidad and Tobago Limited is appreciated. We thank the staff of the Veterinary Public Health Unit of the Ministry of Health, Port of Spain, for sample collection. The laboratory support provided by Mr. Gerard Ramirez and Mrs. Theresa Niles-Pierre is acknowledged. We are grateful to Ms. Camille Timothy for typing the manuscript.

REFERENCES

1. AARESTRUP F.M., WEGNER H.C., ROSDAHL V.T., 1995. A comparative study of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis during 1952-1956 and 1992. *Acta vet. Scand.*, **36**: 237-243.
2. ADESIYUN A.A., 1993. Prevalence of *Listeria* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia* spp. and toxigenic *Escherichia coli* on meat and sea foods in Trinidad. *Food Microbiol.*, **10**: 395-403.
3. ADESIYUN A.A., 1994. Bacteriological quality and associated public health risk of pre-processed bovine milk in Trinidad. *Int. J. Food Microbiol.*, **21**: 253-261.
4. ADESIYUN A.A., 1995. Bacteriologic quality of some Trinidadian ready-to-consume foods and drinks and possible health risks to consumers. *J. Food Prot.*, **58**: 651-655.
5. ADESIYUN A.A., KAMINJOLO J.S., 1994. Prevalence and epidemiology of selected enteric infections of livestock in Trinidad. *Prev. vet. Med.*, **19**: 151-165.
6. ADESIYUN A.A., KAMINJOLO J.S., LOREGNARD R., KITSON-PIGGOTT W., 1992. *Campylobacter* infections in calves, piglets, lambs and kids in Trinidad. *Br. vet. J.*, **148**: 547-556.
7. ADESIYUN A.A., KRISHNAN C.A., 1995. Occurrence of *Yersinia enterocolitica* O:3, *Listeria monocytogenes* spp. in slaughter pigs and carcasses in Trinidad. *Food Microbiol.*, **12**: 99-107.
8. ADESIYUN A.A., WEBB L., RAHAMAN S., 1995. Microbiological quality of raw cow's milk at collection centres in Trinidad. *J. Food Prot.*, **58**: 139-146.
9. ASPLUND K., TUOVINEN V., VEIJALAINEN P., HIRN J., 1990. The prevalence of *Yersinia enterocolitica* O:3 in Finnish pigs and pork. *Acta vet. Scand.*, **31**: 39-43.
10. BAFFONE W., PIANETTI A., BRUSCOLINI F., BRANDI G., ALBANO M., CANTONI G., SALVAGGIO I., 1988. Presence of *Campylobacter*, and *Yersinia* in some species of domestic animals of the area of Urbino, Italy. *Ig. Mod.*, **89**: 55-64.
11. BAUER A.W., KIRBY W.M., SHERRIS J.C., TURCK M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am. J. clin. Path.*, **54**: 493-496.
12. BELLINZONI R.C., BLACKHALL J., TERZOLO H.R., MOREIRA A.R., ANZA N., MATTION N., MICHEO G.I., LA TORRE J.L., SCODELLER E.R., 1990. Microbiology of diarrhoea in young beef and dairy calves in Argentina. *Rev. Argent. Microb.*, **22**: 130-136.
13. BEUMER R.R., CRUYSEN J.J.M., BIRTANTIE I.R.K., 1988. The occurrence of *Campylobacter jejuni* in raw cows' milk. *J. appl. Bacteriol.*, **65**: 93-96.
14. BILLE J., GLAUSER M.P., 1988. Zur listeriose-situation in der Schweizbull. *Bundesamtes Gesundheitwe.*, **3**: 28-29
15. BOURRY A., POUTREL B., ROCOURT J., 1995. Bovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes*: Characteristics of natural and experimental infection. *J. med. Microbiol.*, **43**: 125-132.
16. BRIDGEMAN S.A., ROBERTSON R.M., SYED O., SPEED N., ANDREWS N., HUNTER P.R., 1995. Outbreak of cryptosporidiosis associated with a disinfected ground water supply. *Epid. Infect.*, **115**: 555-566.
17. CERQUEIRA M.O.P., SOUZA M.R., RODRIGUEZ R., FONSECA L.M., RUBINICH J., QUINTAES I.A.S., 1994. Microbiological characteristics of raw and pasteurized milk from Belo Horizonte, Brazil. *Arq. Bras. Med. vet. Zootec.*, **46**: 713-721.
18. DAVIDSON R.J., SPRUNG D.W., PARK C.E., RAYMAN M.K., 1989. Occurrence of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp. and *Yersinia enterocolitica* in Manitoba, Canada raw milk. *Can. Inst. Food Sci. Tech. J.*, **22**: 70-74.
19. ESTEBAN E., ANDERSON B.C., 1995. *Cryptosporidium muris*: prevention, persistence and detrimental effect on milk production in a dry lot dairy. *J. Dairy Sci.*, **78**: 1068-1072.
20. FLEMING D.W., COCHI S.L., MACDONALD K.L., BRONDUM J., HAYNES P.S., PLIKAYTIS B.O., HOLMES M.B., AUDURIER A., BROOM C.V., REINGOLD A.L., 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N. Eng. J. Med.*, **312**: 404-407.
21. GARCIA L.S., BRUCKNER D.A., BREWER T.C., SHIMIZU R.Y., 1983. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. *J. clin. Microbiol.*, **18**: 185-190.
22. GENIGEORGIS C.A., 1990. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. *Int. J. Food Microbiol.*, **9**: 327-360.
23. GIACOBONI G.I., ITOH K., HIRAYAMA K., TAKAHASHI E., MITSUOKA T., 1993. Comparison of faecal *Campylobacter* in calves and cattle of different ages and areas in Japan. *J. vet. Med. Sci.*, **55**: 555-559.
24. GROUNDSON J., CHIRINO TREJO J.M., 1993. A case of bovine mastitis caused by *Campylobacter jejuni*. *J. vet. Med., Series B*, **40**: 326-327.
25. IIDA T., KANZAKI M., MARUJAMA T., INOUE S., KANEUCHI C., 1991. *Listeria monocytogenes* in intestinal contents of healthy animals in Japan. *J. med. Sci.*, **53**: 873-875.
26. KARMALI M.A., 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, **2**: 15-38.
27. LANCE S.E., MILLER G.Y., HANCOCK D.D., BARTLETT P.C., HEIDER L.E., 1992. *Salmonella* infection in neonatal dairy calves. *JAVMA*, **201**: 864-868.
28. LANGONI H., PINTO M.P., DOMINGUES P.F., LISTONI F.J.P., 1991. Etiology and sensitivity test of bovine *Salmonella* enteritidis. *Arq. Braz. Med. vet. Zootec.*, **43**: 507-515.
29. LARKIN L.L., VASAVADA P.C., MARTH E.H., 1991. Incidence of *Campylobacter jejuni* in raw milk as related to its quality. *Milchwissenschaft*, **46**: 428-430.
30. LENQERICH E.J., ADDISS D.G., MARX J.J., UNGAR B.L., JURANEK D.D., 1993. Increased exposure to *Cryptosporidium* among dairy farmers in Wisconsin. *J. infect. Dis.*, **167**: 1252-1255.
31. LIOR H., 1984. New extended biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lariidis*. *J. clin. Microbiol.*, **20**: 636-640.
32. MACFADDIN J.F., 1974. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Baltimore, USA, Williams and Wilkins, p. 213-234.
33. MACKENZIE W.R., SCHELL W.L., BLAIR K.A., ADDISS D.G., PETERSON D.E., HOXIE N.J., KAZMIERCZAK J.J., DAVIS J.P., 1995. Massive outbreak of *Cryptosporidium* infection in Milwaukee, Wisconsin: recurrence of illness and risk of secondary transmission. *Clin. infect. Dis.*, **21**: 57-62.
34. MASSA S., CESARONI D., PODA G., TROVATELLI L.D., 1990. The incidence of *Listeria* spp. in soft cheese, butter and raw milk in the province of Bologna. *J. appl. Bacteriol.*, **68**: 153-156.
35. OMAHONY P.A., AUSTIN F.H., 1991. A study of on-farm factors affecting bacteriological quality of bulk farm milk. *Irish J. agric. Res.*, **30**: 113-119.

36. REINA J., BORRELL N., SERRA A., 1992. Emergence of resistance to erythromycin and fluoroquinolones in thermotolerant *Campylobacter* strains isolated from faeces, 1987-91. *Eur. J. clin. Microbiol. infect. Dis.*, **11**: 1163-1166.
37. ROHRBACH B.W., DRAUGHON F.A., DAVIDSON P.M., OLIVER S.P., 1992. Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Yersinia* and *Salmonella* in bulk tank milk, risk factors and human exposure. *J. Food Prot.*, **55**: 93-97.
38. SUDHARMA D., NAIR G.K., PILLAIR R.M., SULOCHONA S., 1985. Bacterial organisms associated with mastitis of cattle and goats in Kerala and their antibiograms. *Kerala J. vet. Sci.*, **16**: 99-108.
39. TODD E.C.D., 1992. Foodborne diseases in Canada - a 10 year summary from 1975 to 1984. *J. Food Prot.*, **55**: 123-132.
40. TURKSON P.K., LINDQUIST K.J., KAPPERUD G., 1988. Isolation of *Campylobacter* spp. and *Yersinia enterocolitica* from domestic animals and human patients in Kenya. *Acta Pathol. Mikrobiol. Infect. Scand.*, **96**: 141-146.
41. WANG J.J., HAN L.L., MA J.X., ZANG X.M., MA L.K., 1985. Survey of carriers of *Campylobacter* in domestic animals. *Chin. J. vet. Sci. Technol.*, **1**: 27-28.
42. WOOD R.C., MACDONALD K.L., OSTERHOLM M.T., 1992. *Campylobacter* enteritis outbreak associated with drinking raw milk during youth activities: a 10 year review of outbreaks in the United States. *JAMA*, **268**: 3228-3230.

Reçu le 29.8.96, accepté le 28.3.97

Résumé

Adesiyun A.A., Webb L.A., Romain H., Kaminjolo J.S. Prévalence de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica* et *Cryptosporidium* spp. dans du lait en vrac, des matières fécales de vaches et des effluents de fermes laitières à Trinidad

La prévalence de *Listeria*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia* et *Cryptosporidium* dans du lait en vrac, les matières fécales des vaches laitières et des effluents à lait des fermes laitières de l'île de la Trinité, a été évaluée. Des 177 échantillons de lait en vrac testés, 3 (1,7 p. 100), 3 (1,7 p. 100) et 2 (1,2 p. 100) étaient positifs respectivement pour *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. et *Yersinia enterocolitica* mais négatifs pour *Campylobacter* spp. et *Cryptosporidium* spp. Des 333 échantillons fécaux testés, *L. monocytogenes*, *Campylobacter* spp. et *Cryptosporidium* spp. étaient présents dans respectivement 11 (3,3 p. 100), 19 (5,7 p. 100) et 7 (2,1 p. 100) des cas. Ces taux étaient significativement ($P < 0,05$; χ^2) plus élevés, que le taux de détection (0 p. 100) pour *Yersinia* spp. *Salmonella* spp. a été détectée dans 3 (0,9 p. 100) échantillons fécaux. Des 168 échantillons prélevés des effluents à lait, *Campylobacter* spp. était présent dans 7 (4,2 p. 100) échantillons alors que *Salmonella* spp. l'était dans seulement 1 (0,6 p. 100) échantillon. Aucun échantillon n'était positif pour *Yersinia* spp. et *Listeria* spp. (différence significative, $P \leq 0,05$; χ^2). Sur 26 isolats de *Campylobacter* spp., 19 (73,1 p. 100) étaient résistants à au moins un des six agents antimicrobiens testés. Les 14 isolats (100 p. 100) de *L. monocytogenes* étaient résistants à au moins un agent antimicrobien alors que les souches de *Salmonella* spp. et *Y. enterocolitica* étaient sensibles à tous les agents utilisés. En conclusion, les cinq espèces entéro-pathogènes testées étaient présentes dans les fermes laitières de l'île de la Trinité. Les risques de maladie, dus à la présence de ces agents pathogènes dans le lait, existent pour le consommateur, renforçant ainsi la nécessité d'améliorer les pratiques sanitaires.

Mots-clés : *Salmonella* - *Listeria monocytogenes* - *Campylobacter* - *Yersinia enterocolitica* - *Cryptosporidium* - Vache laitière - Lait - Fèces - Eau usée - Exploitation laitière - Contamination - Trinité et Tobago.

Resumen

Adesiyun A.A., Webb L.A., Romain H., Kaminjolo J.S. Prevalencia de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica* y *Cryptosporidium*, en leche de tanque (no embalada), en heces de vacas lecheras y en efluentes de lecherías en Trinidad

Se investiga la prevalencia de *Listeria*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia* y *Cryptosporidium* spp. en leche de tanque (no embalada), en heces de vacas lecheras y en efluentes de lecherías en Trinidad. De las 177 muestras de tanque obtenidas, 3 (1,7 p. 100), 3 (1,7 p. 100) y 2 (1,2 p. 100) fueron positivas para *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Y. enterocolitica*, respectivamente, pero todas fueron negativas para *Campylobacter* y *Cryptosporidium* spp. De las 333 muestras fecales, *L. monocytogenes*, *Campylobacter* spp. y *Cryptosporidium* spp. se detectaron en 11 (3,3 p. 100), 19 (5,7 p. 100) y 7 (2,1 p. 100), respectivamente, resultados significativamente ($P < 0,05$; χ^2) mas elevados que la tasa de deteccion (0 p. 100) para *Yersinia* spp. *Salmonella* spp. se detectó en 3 (0,9 p. 100) de las muestras fecales. De las 168 muestras obtenidas de efluentes y sometidas a cultivos bacterianos, *Campylobacter* spp. se aisló en 7 (4,2 p. 100), mientras que *Salmonella* se encontro unicamente en 1 (0,6 p. 100) muestra, ninguna muestra fue positiva para *Yersinia* o *Listeria*. La diferencia fue estadísticamente significativa ($P < 0,05$; χ^2). Un total de 19 (73,1 p. 100) de los 26 aislamientos de *Campylobacter* presentaron resistencia a uno o más de los seis agentes antimicrobianos examinados. Los quatorce (100 p. 100) aislamientos de *L. monocytogenes* fueron resistentes al menos a un agente, mientras que todas las cepas de *Salmonella* y *Yersinia* fueron susceptibles a todos los agentes antimicrobianos utilizados. Se concluye que los cinco enteropatógenos examinados estaban presentes en las lecherías en Trinidad y que el posibilidad de enfermedades relacionadas con la leche, debido a estos patógenos, existe para los consumidores, haciendo énfasis en la necesidad de buenas practicas sanitarias.

Palabras clave: *Salmonella* - *Listeria monocytogenes* - *Campylobacter* - *Yersinia enterocolitica* - *Cryptosporidium* - Vaca lechera - Leche - Heces - Agua residual - Granja lechera - Contaminación - Trinidad y Tobago.

Influence of *Trypanosoma congolense* infection on some blood inorganic and protein constituents in sheep

E. Katunguka-Rwakishaya^{1*}

Key words

Sheep - Lamb - *Trypanosoma congolense* - Blood composition - Blood protein - Infection - Scotland.

Summary

The present study was designed to investigate the changes in plasma concentrations of zinc, copper, calcium, magnesium, inorganic phosphate, total protein, albumin, globulin, and serum iron and iron-binding capacity in sheep infected with *Trypanosoma congolense*. It was observed that infection did not have a significant effect on the plasma concentrations of zinc, copper, calcium, magnesium and inorganic phosphate. The serum iron concentrations in infected animals were higher, but not significantly so, than in control animals. Infected animals developed hypoalbuminaemia and hyperglobulinaemia while changes in total protein were not significant. The relevance of these changes to the pathogenesis of *Trypanosoma congolense* infection is discussed.

■ INTRODUCTION

Changes in the concentrations of inorganic constituents in small ruminants infected with trypanosomes have been investigated on few occasions. Most of the reports concern either *Trypanosoma vivax* or *T. brucei* infections in cattle. An increase in the concentrations of serum chloride and calcium in goats infected with *Trypanosoma vivax* (7) and a gradual fall in the concentration of inorganic phosphate in cattle infected with *T. congolense* have been recorded (5). Changes have also been recorded in levels of serum iron, total iron-binding capacity (12) and plasma proteins (7). However, the reports on these plasma constituents have been contradictory and in many cases have been measured at one time point during a course of infection. The present study was designed to follow the changes in the plasma concentrations of zinc, copper, calcium, magnesium, inorganic phosphate, serum iron, total iron-binding capacity, plasma total protein, albumin and globulin during a course of *T. congolense* infection in sheep.

■ MATERIALS AND METHODS

Experimental animals

Four month old male castrate Scottish Blackface lambs were used in the present study. They were purchased from a local hill farm in the West of Scotland and kept in flyproof isolation units at

Glasgow University Veterinary School. Wood shavings were used as bedding.

Experimental design

Twelve animals were randomly divided into two groups of six animals each. One group was infected with 1×10^5 trypanosomes (*Trypanosoma congolense* 1180) in 2 ml of phosphate buffered saline intravenously and the other group served as uninfected controls. *Trypanosoma congolense* 1180 is a cloned derivative of an isolate made in the Serengeti, Tanzania, as described by Nantulya *et al.* (10). The trypanosomes were raised in irradiated mice and harvested at the first peak of rising parasitaemia.

After infection, the animals were bled three times a week for estimation of parasitaemia by the buffy coat method as described by Murray *et al.* (9) and packed cell volume by the capillary tube centrifugation technique, and once a week for biochemical estimations. The animals were monitored for 10 weeks after infection.

Housing and feeding

Animals were kept together in one large pen in a flyproof isolation unit for four weeks before infection. Each lamb received 500 g of concentrate feed per day, hay and water were available *ad libitum*.

Collection of blood samples

Fifteen millilitres of blood were collected once a week from the jugular vein for biochemical analysis as follows: 5 ml of blood was drawn into lithium heparin tubes for measurement of plasma magnesium, inorganic phosphate, total protein, albumin, zinc and copper; 10 ml of blood was also drawn into iron-free tubes without

1. Glasgow Veterinary School, Bearsden, Glasgow G61 1QH, Scotland, United Kingdom

* Current address: Department of Veterinary Medicine, Makerere University, PO Box 7062, Kampala, Uganda

Fax /Phone: 256 41 554 685

anticoagulant. Serum was harvested 24 h later after centrifugation at 700 g for 20 min. Serum was stored in small aliquots at -20°C until required for measurement of serum iron and total iron-binding capacity (TIBC).

Analytical techniques

Plasma zinc, copper, magnesium and calcium were measured using an atomic absorption spectrophotometer (Perkin Ellmer, Beaconsfield, Bucks, England). Commercial kits were used for the assay of total plasma protein and plasma albumin by the Standard Technicon Autoanalyzer (Boehringer Mannheim GMBH, 680 Mannheim 31, Germany). Plasma globulin concentration was recorded as the difference between total plasma protein and albumin.

Inorganic phosphate, serum iron and TIBC were analyzed with commercial kits supplied by Roche Products Ltd (Welwyn Garden City, England), using spectrophotometric methods.

Statistical methods

Results are presented as group means \pm standard error of the mean (SEM). Comparisons between groups were achieved with one way analysis of variance. The statistical analyses were conducted using Minitab (Ryan, Penn State University, USA) and Animal Designs 1 Programme (Data International Services, Glasgow, Scotland) on an IBM computer (PS/2, Model 30). P values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Haematological, parasitological and clinical observations

Infection caused a significant decrease in mean packed cell volume (PCV) values between 0 and 70 days after infection (DAI). The mean values decreased from $32 \pm 1\%$ at day 0 to $24 \pm 1\%$ at 23 DAI. The values tended to increase but showed another decrease from $29 \pm 1\%$ at 47 DAI to $25 \pm 1\%$ at 63 DAI. The PCV values in control animals varied between $29 \pm 2\%$ and $32 \pm 1\%$ during the course of infection.

Mean corpuscular volumes (MCV) increased following infection from 31.0 ± 0.5 fl at 0 DAI to 37.2 ± 1.4 fl at 75 DAI. The values in control animals fluctuated between 30.4 ± 0.6 and 32.4 ± 0.7 fl. The anaemia was thus characterized as macrocytic and normochromic.

After a prepatent period of seven to nine days, the mean parasitaemia increased in the infected group to reach the first peak 16 DAI. It then fluctuated considerably but showed continually decreasing peaks after 49 days of infection.

Infection did not cause a significant effect on rate of weight gain when compared to control animals. Infected animals showed an increase in mean body temperature from 39.5°C at 0 DAI to 40.3°C by 7 DAI, after which it fluctuated considerably. In control animals, mean values fluctuated between 38.6 and 39.7°C .

Plasma zinc and copper

The concentration of plasma zinc fluctuated considerably in both infected and control animals. However, the concentration was within the ranges of 49.6-104.6 $\mu\text{g/l}$. The concentration of plasma copper tended to be higher in infected than in control animals but this difference was not significant. In infected animals, the values fluctuated between 0.51-1.0 mg/l, while in control animals the values were 0.39-0.81 mg/l.

Plasma calcium

Infection had no effect on the levels of plasma calcium between 0 and 10 weeks after infection. The values in infected and control animals fluctuated between 98.2 and 109.8 mg/l.

Plasma magnesium

The values of plasma magnesium in infected and control animals fluctuated between 17.0 ± 0.73 and 21.6 ± 0.73 mg/l. There was no influence of infection.

Plasma inorganic phosphate

The concentrations of plasma inorganic phosphate did not change with the course of infection. Values fluctuated between 65.4 ± 3.7 and 92.7 ± 3.1 mg/l in both infected and control animals.

Serum iron concentration

The concentrations of serum iron in infected animals decreased from 2.1 ± 0.1 mg/l at 0 DAI to 1.8 ± 0.1 mg/l at 16 DAI, after which it fluctuated. However, it showed a sharp increase between 21 and 35 DAI and between 42 and 56 DAI. The values of serum iron were moderately higher in infected animals than in control ones between 14 and 63 DAI. The mean concentration in control animals showed a downward trend between 21 and 65 DAI. The values in infected animals were not significantly different from those in control animals.

Serum total iron-binding capacity and percentage saturation of transferrin

The values of serum TIBC tended to decrease with progress of infection, but values were not significantly different from those in control animals. There were no significant differences in the levels of unsaturated iron binding capacity and percentage saturation of transferrin between infected and control animals throughout the course of infection.

Total plasma protein

Total plasma protein concentration in infected animals decreased from 64.7 ± 0.9 g/l at 0 DAI to 59.8 ± 2.2 g/l at 21 DAI (figure 1). It then increased steadily to 76.4 ± 3.1 g/l at 42 DAI and later showed a moderate decline. The values in control animals fluctuated between 60.4 ± 1.0 and 65.4 ± 1.3 g/l, and were not significantly different from those in infected animals.

Plasma albumin

Plasma albumin concentration in infected animals decreased significantly from 37.2 ± 0.6 g/l at 0 DAI to 33.0 ± 1.1 g/l at 21 DAI (figure 1). The mean albumin concentration then tended to increase, but dropped again to 32.0 ± 1.0 g/l at 63 DAI. The mean values in control animals fluctuated between 35.8 ± 0.8 and 38.4 ± 0.7 g/l, and were significantly higher than the values in infected animals.

Plasma globulin concentration

The mean plasma globulin concentration showed an upward trend from 27.5 ± 0.8 g/l at 0 DAI to 32.6 ± 2.3 g/l at 42 DAI. Thereafter, it declined to 29.0 ± 1.4 at 63 DAI. The values in control animals varied between 25.8 ± 0.9 and 28.8 ± 0.6 g/l. The values in infected animals were significantly higher than those in control animals between 35 and 70 DAI.

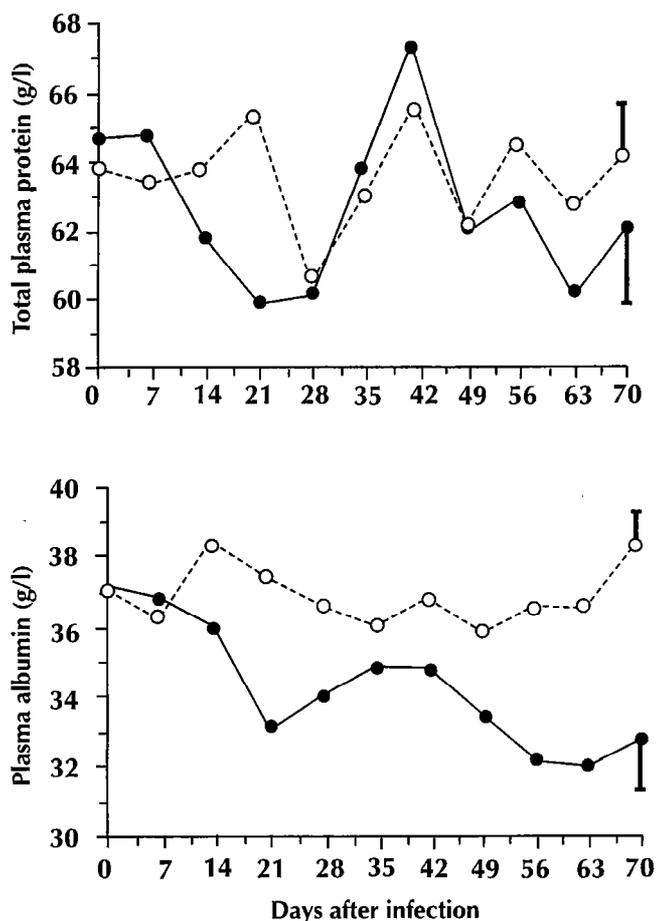


Figure 1: changes in plasma protein and albumin concentrations in sheep infected with *T. congolense*: (●) and in uninfected control sheep: (○)

DISCUSSION

The present study has shown that *Trypanosoma congolense* infection in sheep is not associated with significant changes in the concentrations of plasma zinc, copper, calcium, magnesium and inorganic phosphate. This is in contrast with previous reports, which indicated an increase in the concentration of plasma calcium in West African dwarf goats infected with *Trypanosoma vivax* (7). In goats infected with *T. brucei*, an increase in serum inorganic phosphate between 14 and 84 DAI was observed (6). However, the concentrations of serum copper and magnesium showed a downward trend between 28 and 84 DAI (8). Some authors have reported changes in the plasma concentrations of inorganic phosphate in cattle infected with trypanosomes (5) while others (4) did not. In another study of cattle infected with *T. brucei*, it was found that the concentration of serum magnesium dropped while the concentrations of serum phosphorus did not change with the progress of infection (14). It is possible that these contradictory reports could be related to differences in the trypanosome species or even differences in hosts.

In the present study, the concentrations of serum iron fluctuated considerably in infected animals but were higher than in control animals between 14 and 63 DAI. Serum iron concentrations displayed a sharp increase between 21 and 35 DAI and between 42 and 50 DAI. The sharp increases in serum iron concentrations observed in the present study corresponded with periods of marked decreases in packed cell volumes and red blood cell counts. It is possible that this increase in serum iron concentrations

was associated with intravascular haemolysis, which has been reported to occur particularly in the early stages of trypanosomiasis (3). The bulk of mammalian iron is in haemoglobin and in the liver with lesser amounts in muscles as myoglobin. Since all iron exchanges occur in the plasma, haemolysis would lead to an increase of serum iron.

The concentrations of serum TIBC in infected and control animals were similar in this study. This is in contrast with the observations made in cattle infected with *T. congolense* (12, 14). Serum TIBC is an indirect measure of transferrin concentration, which is the carrier of iron for haemoglobin synthesis (13). A drop in these values may suggest a degree of impaired bone marrow function, which may in turn contribute to the development of anaemia. Since values in infected and control animals were similar, this may suggest that infected animals, in this study, did not experience impairment of bone marrow function.

Infected animals developed a hypoalbuminaemia and hyperglobulinaemia and the changes in total plasma protein were not significant. These observations are in agreement with previous studies of ovine trypanosomiasis (8, 11). The cause of hypoalbuminaemia could be a result of haemodilution, trypanosomal uptake of albumin-bound fatty acids and lipoproteins or increased catabolism by the host (8). There is evidence to suggest that albumin is required by trypanosomes for growth and multiplication. It is therefore possible that development of high parasitaemia particularly in the early stages of infection may lead to increased utilization of albumin, and this coupled with haemodilution may lead to a reduction in plasma concentration of albumin.

An increase in plasma globulin concentration was observed after four weeks of infection. This has been observed in sheep infected with *T. vivax* (2), and in goats infected with *T. brucei* (6). This increase has been attributed mainly to an increase in IgM and, to a lesser extent, of IgG (2). The degree of hyperglobulinaemia observed in the present study is not as marked as that reported in West African goats infected with *T. brucei* (6). It is known that *T. brucei* and *T. vivax* are capable of invading tissues while *T. congolense* is predominantly to be found in the vascular system. It is therefore possible that trypanosomes, which invade tissues, are likely to elicit a greater immunologic reaction leading to production of more immunoglobulins than trypanosomes that are restricted to the vascular system.

CONCLUSION

The present study has revealed that *Trypanosoma congolense* infection in sheep results in changes in protein metabolism and iron metabolism, and has no major effects on the concentrations of plasma zinc, copper, calcium, magnesium and inorganic phosphate.

Acknowledgements

The author wishes to thank Mr. G. Jackson and Miss E. Dunlop for their technical support. The assistance of the staff of the Department of Veterinary Clinical Biochemistry is kindly acknowledged. The study was funded by the Association of Commonwealth Universities and carried out in Prof. P.H. Holmes' Laboratory, Department of Veterinary Physiology.

REFERENCES

1. BOUTEILLE B., DARDE M.L., PESTRE-ALEXANDRE M., DUMAS M., GATANZANO G., BRENTUN T.C., NICOLAS A., MUNOZ M., 1988. The sheep (*Ovis aries*) as an experimental model for African trypanosomiasis. II. Biological study. *Ann. trop. Med. Parasitol.*, **82**: 149-158.

2. CLARKSON M.J., 1976. Immunoglobulin M in trypanosomiasis. In: Soulsby E.J.L. ed., Pathophysiology of parasitic infections. London, United Kingdom, Academic Press, p. 171-182.
3. DARGIE, MURRAY P.K., MURRAY M., GRIMSHAW W.R., MCINTYRE W.I.M., 1979. Bovine trypanosomiasis: red cell kinetics of N'Dama and Zebu cattle infected with *Trypanosoma congolense*. *Parasitology*, **78**: 271-286.
4. FRENCH M.H., 1938. Studies in animal trypanosomiasis: IV. The effect of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* on some inorganic blood constituents. *J. comp. Path. Ther.*, **51**: 119-127.
5. HUDSON J.R., 1944. Acute and subacute trypanosomiasis in cattle caused by *T. vivax*. *J. comp. Path. Ther.*, **54**: 108-119.
6. IGBOKWE I.O., MOHAMMED A., 1992. Some plasma biochemical changes in experimental *Trypanosoma brucei* infection of Sokoto Red goats. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **45**: 287-290.
7. KALU A.U., IKWUEGBU O.A., OGBONNAH G.A., 1989. Serum protein and electrolyte levels during trypanosome infection and following treatment in the West African dwarf goat. *Bull. Anim. Health Prod. Afr.*, **37**: 41-45.
8. KATUNGUKA-RWAKISHAYA E., MURRAY M., HOLMEP H., 1992. Pathophysiology of ovine trypanosomiasis: ferrokinetics and erythrocyte survival studies. *Res. vet. Sci.*, **53**: 80.
9. 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.
10. NANTULYA V.M., MUSOKE A.J., RURANGIRWA F.R., MOLOO S.K., 1984. Resistance of cattle to tsetse-transmitted challenge with *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma congolense* after spontaneous recovery from syringe passaged infection. *Infect. Immun.*, **43**: 735-738.
11. OGUNSANMI A.O., AKPAVIE S.O., ANOSA V.O., 1994. Serum biochemical changes in West African Dwarf sheep experimentally infected with *Trypanosoma brucei*. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **47**: 195-200.
12. TARTOUR G., IDRIS O.F., 1973. Iron metabolism in *Trypanosoma congolense* infection in Zebu cattle: serum iron and serum iron-binding capacity. *Res. vet. Sci.*, **15**: 24-32.
13. UNDERWOOD E.J., 1971. Trace elements in human and animal nutrition. New York, USA, Academic Press, p. 13-55.
14. WELLDE B.T., REARDON M.J., KOVATCH R.M., CHUMO D.A., WILLIAMS J.S., BOYCE W.L., HOCKMEYER W.T., WYKOFF D.E., 1989. Experimental infection of cattle with *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Ann. trop. Med. Parasitol.*, **83**: 133-150.

Reçu le 18.1.96, accepté le 26.2.97

Résumé

Katunguka-Rwakishaya E. Influence de l'infection à *Trypanosoma congolense* sur quelques constituants protéiques et inorganiques du sang chez le mouton

Cette étude avait pour objet d'évaluer les variations des concentrations plasmatiques de zinc, cuivre, calcium, magnésium, phosphate inorganique, protéines totales, albumine et globuline, de la sidéremie, ainsi que la capacité de fixation du fer chez des moutons infectés par *Trypanosoma congolense*. Les résultats ont montré que l'infection n'avait pas d'effet significatif sur les concentrations plasmatiques de zinc, cuivre, calcium, magnésium et phosphate inorganique. Les sidéremies des animaux infectés étaient plus élevées que celles des animaux témoins, mais pas de manière significative. Les animaux infectés développèrent de l'hypoalbuminémie et de l'hyperglobulinémie, alors que les variations en protéines totales n'étaient pas significatives. La pertinence de ces variations quant au mécanisme pathogénique de l'infection à *Trypanosoma congolense* est discutée.

Mots-clés : Ovin - Agneau - *Trypanosoma congolense* - Composition du sang - Protéine sanguine - Infection - Ecosse.

Resumen

Katunguka-Rwakishaya E. Influencia de la infección por *Trypanosoma congolense* en algunos constituyentes inorgánicos y proteicos de la sangre en ovinos

El presente estudio se diseñó para investigar los cambios en las concentraciones plasmáticas de zinc, cobre, calcio, magnesio, fosfatos inorgánicos, proteína total, albúmina, globulina y hierro sérico, así como la capacidad de captar el hierro en las ovejas infectadas con *Trypanosoma congolense*. Se observó que la infección no tuvo efecto significativo en las concentraciones plasmáticas de zinc, cobre, calcio, magnesio y fosfatos inorgánicos. Las concentraciones séricas de hierro en los animales infectados fueron superiores, pero no en forma significativa, que en los animales control. Los animales infectados desarrollaron hipoalbuminemia e hiperglobulinemia, mientras que no se observaron cambios significativos en la proteína total. Se discute la importancia de estos cambios con respecto a la patogénesis la infección por *Trypanosoma congolense*.

Palabras clave: Ovino - Cordero - *Trypanosoma congolense* - Composición de la sangre - Proteína sanguínea - Infección - Escocia.

Evaluation de la sensibilité du test de Woo pour la détection de *Trypanosoma vivax*

M. Desquesnes^{1*} L. Tresse¹

Mots-clés

Trypanosoma vivax - Centrifugation - Hématocrite - Ovin - Plasma sanguin - Guyane française.

Résumé

La technique de centrifugation hématocrite (HCT), ou test de Woo, est la plus employée pour le diagnostic des trypanosomoses animales, mais sa sensibilité est mal connue. Selon les auteurs, pour la détection de *Trypanosoma vivax*, elle est supérieure, égale, ou inférieure à l'observation du *buffy coat* entre lame et lamelle au microscope à fond noir (*dark ground*, *buffy coat method*, DG/BCM), ou technique de Murray. La plupart des travaux antérieurs visaient à comparer les techniques parasitologiques entre elles plutôt que de chiffrer la sensibilité des tests par rapport à une référence fixe ; la comparaison des tests entre eux est une évaluation relative, car toutes les techniques utilisées n'ont pas la même sensibilité entre des mains différentes. L'objet du présent travail a été de chiffrer la sensibilité de la technique de Woo pour la détection de *Trypanosoma vivax* de Guyane, en l'éprouvant sur des échantillons sanguins de parasitémie déterminée, allant de 1 à 1 767 trypanosomes/ml, préparés par dilution de sang infecté dans du sang non infecté. L'expérience a été réalisée avec du sang de mouton. Une technique simple est décrite, pour le dénombrement des parasites dans le sang. Le seuil moyen de positivité du test de Woo chez le mouton a été d'environ 200 ± 110 *T. vivax*/ml. Le test a présenté une sensibilité de 100 p. 100 quand la parasitémie était supérieure à 700 parasites/ml, environ 80 p. 100 entre 300 et 700, 50 p. 100 entre 60 et 300, puis sa sensibilité a été quasi nulle en-deçà de 60 parasites/ml. Des indices sont fournis, permettant de quantifier la parasitémie en fonction du nombre de parasites observés entre lame et lamelle (parasitémie > 2 000), ou dénombrés dans le tube à hématocrite (parasitémie < 2 000). Il est proposé d'évaluer la sensibilité des techniques visant à mettre en évidence une infection active, par rapport à des références fixes, en l'occurrence, des parasitémies connues, créées artificiellement, comme il l'a été décrit.

■ INTRODUCTION

La technique de centrifugation hématocrite (HCT, en anglais), ou test de Woo (17, 18), est la plus employée pour le diagnostic des trypanosomoses animales, mais sa sensibilité est mal connue.

Selon les auteurs, pour le diagnostic de *T. vivax*, la sensibilité du test de Woo est inférieure (12, 13), égale (2), ou supérieure (1, 3, 7, 11, 15) à celle de la technique de Murray et coll. (12) qui consiste à examiner à l'état frais, entre lame et lamelle, le *buffy coat* issu du tube capillaire, au microscope à fond noir (*dark ground technique*, DG, ou *buffy coat method*, BCM). La plupart des auteurs ont davantage comparé les techniques parasitologiques entre elles plutôt que chiffré la sensibilité des tests par rapport à

une référence fixe. La comparaison des tests présente un inconvénient car toutes les techniques utilisées n'ont pas la même sensibilité entre des mains différentes.

L'objet du présent travail a été de chiffrer le seuil moyen de positivité de la détection de *Trypanosoma vivax* par la technique de Woo, d'évaluer la sensibilité du test en fonction de la parasitémie, et de quantifier la parasitémie en fonction du nombre de parasites observés dans un tube capillaire. Un mode de comptage des parasites dans le sang est proposé. L'expérience a été menée au CIRAD-EMVT-Guyane, avec une souche guyanaise de *T. vivax* chez le mouton.

■ MATERIEL ET METHODES

Sang parasité

Deux moutons croisés Black belly x Créole, âgés de 12 mois, issus d'un troupeau indemne de trypanosomose, et eux-même négatifs

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

* CIRAD-EMVT, Campus international de Baillarguet, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

aux tests de Woo et de recherche d'anticorps par ELISA (méthode voisine de celle de Ferenc et coll. (4)) ont été maintenus en bergerie étanche aux insectes.

L'un d'eux a été expérimentalement infecté avec la souche de *T. vivax* de Guyane française TVFG2, isolée en 1994 par Desquesnes et Demarty (non publié) ; il a été utilisé pour fournir du sang parasité.

L'autre animal a fourni du sang non infecté et ne réagissant pas spécifiquement avec *T. vivax* (absence d'anticorps dirigés contre *T. vivax*).

Une série de 22 échantillons sanguins de parasitémies allant de 1 à 1 767 trypanosomes/ml a été constitué par dilution de sang parasité dans du sang d'animal non infecté.

Collecte et pré-dilution

Les échantillons sanguins ont été récoltés sur héparinate de lithium en tubes vacutainers siliconés de 5 ml, puis déposés sur glace ; 5 ml du sang de l'animal infecté ont été collectés lors du quatrième pic parasitémique ; 140 ml de sang de l'animal non infecté ont été prélevés pour permettre la préparation des dilutions du sang infecté.

Après une estimation de la parasitémie lors du pic chez l'animal expérimentalement infecté, une pré-dilution du sang parasité a été réalisée avec le sang de l'animal non infecté, afin de ramener la parasitémie aux alentours de 10^5 trypanosomes/ml.

Le mélange des sangs a été assuré en retournant 10 fois le tube, puis en plaçant l'échantillon pendant 3 min sur un agitateur à plateau tournant. Cette opération a permis d'homogénéiser la répartition des parasites dans le sang de mélange.

Après agitation, la pré-dilution a été replacée sur glace.

Comptage des parasites

Un volume de 10 μ l de sang (= 10 mm³) a été déposé à la micropipette, entre lame et lamelle (22 x 22 mm). Lorsque la lamelle a été déposée sur le sang, les auteurs se sont assurés que la répartition du sang était homogène sur l'ensemble de sa surface. La lecture a été effectuée au grossissement x 400 en contraste de phase. Les variations éventuelles de répartition du sang ou des parasites ont été atténuées par la lecture de 2 fois 25 champs, soit un total de 50 champs, lus en croix, d'une extrémité à l'autre de la lamelle.

Une série de 9 comptages a été effectuée par deux techniciens (5 comptages par un premier technicien et 4 par un second), afin d'établir le nombre moyen de trypanosomes/champ de la pré-dilution, et amortir les variations individuelles des préparations.

L'intervalle de confiance de la moyenne a été calculé au risque de 5 p. 100, selon la formule donnée par Schwartz (14) :

$$\mu = m_0 \pm \frac{t S}{\sqrt{n}}, \text{ avec } n = 9, \text{ ddl} = 8 \text{ et } t = 2,3.$$

Détermination de la parasitémie de la pré-dilution

La hauteur moyenne de la cellule constituée par la lame et la lamelle est égale à :

$h = \text{volume de sang/surface de la lamelle}$, $h = 10 \text{ mm}^3 / (22 \text{ mm})^2$, soit 0,0207 mm.

Au grossissement microscopique utilisé (x 400), le rayon R d'un champ microscopique était de 0,239 mm.

Le volume de sang exploré dans un champ microscopique a été calculé selon la formule :

$$V = \Pi \cdot R^2 \cdot h \text{ soit } 3,7077 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^3.$$

Avec la technique de comptage utilisée, l'observation d'une moyenne d'un trypanosome par champ correspondait donc à une parasitémie de 269 711 trypanosomes/ml.

Dilutions

A partir de la parasitémie calculée sur la pré-dilution, par dilution dans du sang non infecté, une série de 22 échantillons de sang ont été préparés avec des parasitémies décroissantes, comme indiqué ci-dessous (en nombre de trypanosomes/ml) : 1 767, 1 325, 883, 707, 530, 442, 353, 265, 177, 88, 71, 57, 44, 35, 26, 18, 13, 9, 7, 4, 2 et 1.

Pour obtenir ces échantillons, le premier a été amené à 1 767 parasites/ml, à partir duquel un deuxième à 177 parasites/ml a été constitué. Par dilutions en séries du premier et du deuxième échantillon ont été préparées les dilutions allant respectivement de 1 767 à 265 parasites/ml et de 177 à 1 parasite/ml. L'homogénéisation des mélanges a été effectuée comme précédemment, puis les échantillons et leurs dilutions ont été placés sur glace afin de préserver la vitalité des parasites.

Test de Woo

Pour chacune de ces dilutions, six tubes capillaires à microhémocrite (volume 70 μ l) ont été préparés (132 au total) et centrifugés à 15 000 tours/min pendant 5 min. La lecture de ces tubes a été faite par observation directe de l'interface plasma/globules blancs (*buffy coat*) selon la technique décrite par Woo (17). Les tubes ont été lus en aveugle ; 3 séries par le premier technicien, les 3 autres par le second. Les tubes capillaires ont été remplis, centrifugés puis déposés verticalement sur glace par séries de 11, de telle sorte que l'intervalle de temps entre centrifugation et lecture n'a pas excédé 20 min.

La lecture a été effectuée au grossissement x 100 (microscope Leitz Biomed Laboratoire®), avec un objectif normal, mais en utilisant une source de lumière oblique afin d'augmenter le contraste de phase, ce qui a facilité la visualisation des parasites (condenseur Universel UKL 513558, Leitz Wetzlar Germany®, position n°3). Une rotation complète du tube capillaire sur son portoir a été réalisée par quarts de tour ; quatre points de vue du tube ont donc été explorés. En moyenne, l'examen a été réalisé en 2 min. Le nombre total de parasites observés dans chaque tube a été enregistré puis rapporté à sa dilution au terme des lectures en aveugle.

Interprétation des résultats

Le test de Woo est un examen fournissant à la fois une réponse qualitative (positif/négatif) et quantitative (nombre de trypanosomes observés dans la préparation).

- Interprétation de la réponse qualitative :

La sensibilité d'un test est la proportion d'examen positifs parmi des échantillons infectés.

Pour chaque dilution, la probabilité pour que le test de Woo soit positif est calculée en faisant le rapport du nombre de tubes positifs/nombre de tubes examinés ; cette probabilité représente la sensibilité du test de Woo ; elle est exprimée en fonction de la parasitémie.

- Interprétation de la réponse quantitative :

Afin de donner une estimation de la correspondance entre la parasitémie et le nombre de trypanosomes observés dans un tube à hé-

matocrite, les tubes capillaires pour lesquels un nombre «n» de trypanosomes a été observé sont regroupés, et la parasitémie moyenne correspondante, ou parasitémie pondérée, est calculée.

Pour cela, compte tenu de l'imprécision du dénombrement des parasites dans le tube capillaire, au-delà de 4 trypanosomes/tube, les résultats ont été regroupés de 5 à 9 et de 10 à 20 parasites/tube.

Un tableau de correspondances permet d'établir le seuil moyen de positivité du test, c'est-à-dire la parasitémie moyenne correspondant à l'observation d'un unique parasite.

■ RESULTATS

Comptage des parasites

Le jour de l'expérience, la parasitémie a été évaluée à 2.10^6 trypanosomes/ml. Une pré-dilution au vingtième a ramené la parasitémie aux environs de 10^5 trypanosomes/ml, puis les comptages ont été réalisés.

Le nombre de *T. vivax* observés dans les 50 champs est indiqué, pour les 9 lectures, au tableau I. La moyenne (m_0), l'écart type (S), et l'intervalle de confiance de la moyenne (μ), au risque de 5 p. 100 ont été établis.

Tableau I

Résultats des comptages et estimation de la parasitémie de la pré-dilution

Numéro du comptage	Nbre de t. observés /50 champs	Nbre moyen de t. par champ	Parasitémie en t./ml
1	17	0,34	91 702
2	16	0,32	86 308
3	17	0,34	91 702
4	25	0,50	134 856
5	25	0,50	134 856
6	23	0,46	124 067
7	17	0,34	917 02
8	19	0,38	102 490
9	20	0,40	107 884
Moyenne	19,89	0,40	$m_0 = 107\ 285$
Ecart type	3,38	0,07	$S = 18\ 238$
Intervalle de confiance du nombre moyen de parasites/ml dans la pré-dilution			$\mu = 107\ 000 \pm 14\ 000$

t. = trypanosomes

Les résultats indiquent que la parasitémie de la pré-dilution était de $107\ 000 \pm 14\ 000$ (soit 13 p. 100.) parasites/ml.

Les 22 dilutions ont été réalisées, comme indiqué précédemment, de 1 767 à 1 trypanosome/ml. L'incertitude portant sur ces dilutions a été considérée comme négligeable ; les nombres de trypanosomes/ml de ces échantillons ont donc été affectés d'un intervalle de confiance de ± 13 p. 100.

Interprétation de la réponse qualitative

Le nombre de trypanosomes observés dans chacun des 132 tubes capillaires est reporté dans le tableau II ; pour chaque dilution, la probabilité pour que le test soit positif a été calculée.

Le regroupement des parasitémies par classes de probabilités voisines permet d'exprimer la sensibilité du test de Woo en fonction de la parasitémie comme indiqué au tableau III.

Tableau II

Nombre de trypanosomes observés dans chaque tube capillaire, et probabilité de réponses positives au test selon la parasitémie

Parasitémie de t./ml *	Séries des tubes capillaires						Probabilité de positivité du test
	1	2	3	4	5	6	
1 767	20	15	14	8	15	10	1
1 325	9	10	10	8	6	12	1
883	5	3	7	4	4	7	1
707	4	4	3	3	2	4	1
530	1	0	1	4	3	2	0,83
442	2	0	2	4	2	4	0,83
353	3	0	4	0	3	1	0,67
265	1	0	1	1	2	2	0,83
177	1	1	0	0	1	0	0,50
88	0	0	0	1	2	2	0,50
71	0	0	0	0	1	1	0,33
57	1	0	0	1	2	0	0,50
44	0	0	0	0	0	0	0,00
35	0	0	0	1	0	0	0,17
26	0	0	1	0	0	0	0,17
18	0	0	0	0	0	0	0,00
13	0	0	0	0	0	0	0,00
9	0	0	0	0	0	0	0,00
7	0	0	0	0	0	0	0,00
4	0	0	0	0	0	0	0,00
2	0	0	0	0	0	0	0,00
1	0	0	0	0	0	0	0,00

t. = trypanosomes

* les parasitémies indiquées sont affectées d'une incertitude de 13 %

Tableau III

Sensibilité du test de Woo selon la parasitémie

Parasitémie (nbre de <i>T. vivax</i> /ml)*	Nombre d'échantillons positifs/ nombre total d'échantillons	Sensibilité
> 700 ± 90	24/24	100 %
de 300 ± 35 à 700 ± 90	19/24	79 %
de 60 ± 10 à 300 ± 35	11/24	46 %
< 60 ± 10	2/36	négligeable

* Chiffres arrondis à la dizaine

Estimation de la parasitémie à partir du résultat du test de Woo

La fréquence des tubes capillaires dans lesquels un nombre «n» de parasites a été observé est reportée dans un tableau à 6 classes (avec $n = 1, 2, 3, 4, 5-9$ et $10-20$), avec les parasitémies correspondantes. Le calcul des parasitémies moyennes pondérées a été effectué pour chaque classe en multipliant le nombre de tubes (« n_i ») par la parasitémie effective de l'échantillon (« x_i »); la somme des « $n_i x_i$ » d'une classe a été divisée par le nombre total d'échantillons dans la classe. Ces données ont été reportées au tableau IV, et ont permis d'établir une correspondance entre la parasitémie et le nombre de trypanosomes observés dans un tube capillaire. Ces estimations ont été reportées au tableau V, en tenant compte de l'incertitude de départ sur la parasitémie (± 13 p. 100).

Dans cette expérience, le seuil minimal de positivité a été de 26 ± 4 parasites/ml.

Le seuil moyen de positivité du test de Woo a été d'environ 200 ± 110 parasites/ml.

■ DISCUSSION

Méthode de préparation des échantillons

La séparation des parasites du sang sur colonne de DEAE 52 (9), ou par simple centrifugation du sang (16), puis leur adjonction à du sang non contaminé est une des possibilités de préparation d'échantillons de sang de parasitémie déterminée. Toutefois, les risques de réduction de vitalité dus au passage sur la colonne ou à la centrifugation et la plus grande difficulté à homogénéiser des mélanges dont un des composants possède un très grand nombre de parasites sous un très faible volume ont fait opter pour une technique différente, consistant à préparer des dilutions successives de sang contaminé dans du sang d'animal non infecté.

Comptage parasitaire

L'utilisation des techniques anciennes de fixation/coloration des trypanosomes pour le comptage en cellule n'a pas été retenue car, d'une part, la mobilité des parasites facilite leur observation et, d'autre part, les effets de leurs déplacements s'annulent statistiquement. Pour ces raisons, les comptages ont été effectués sur des parasites frais et non colorés.

Aucune cellule microscopique n'est adaptée au comptage direct des trypanosomes dans le sang, leur profondeur étant trop importante.

La technique utilisée pour le dénombrement des parasites dans le sang, consistant à placer à l'aide d'une micro-pipette, un volume connu de sang ($10 \mu\text{l}$) entre lame et lamelle (22×22 mm), présente l'avantage de permettre une bonne visualisation des parasites dans le sang brut car la profondeur de la «cellule» constituée par la lame et la lamelle est très faible ($h = 0,0207$ mm). En outre, contrairement à l'utilisation d'un hémocytomètre, elle permet de maintenir les parasites continûment dans du sang total.

En revanche, la répartition de l'échantillon est moins homogène que dans une cellule vraie, étant donnés les bords naturels de la «cellule capillaire», et la possible déformation de la lamelle par les forces capillaires; pour pallier à ces inconvénients, il est préconisé :

- d'utiliser des lamelles rigides, peu déformables sous l'effet des forces capillaires, ce qui évite une répartition hétérogène du sang sous la lamelle ;

Tableau IV

Fréquence des tubes capillaires ayant présenté un nombre «n» de trypanosomes à une parasitémie donnée, et calcul des parasitémies moyennes pondérées correspondantes

Parasitémies (t./ml) x_i	Nbre «n» de t. observés par tube capillaire (n_i)					
	1	2	3	4	5 à 9	10 à 20
1 767	0	0	0	0	1	5
1 325	0	0	0	0	3	3
883	0	0	1	2	3	0
707	0	1	2	3	0	0
530	2	1	1	1	0	0
442	0	3	0	2	0	0
353	1	0	2	1	0	0
265	3	2	0	0	0	0
177	3	0	0	0	0	0
88	1	2	0	0	0	0
71	2	0	0	0	0	0
57	2	1	0	0	0	0
44	0	0	0	0	0	0
35	1	0	0	0	0	0
26	1	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
Effectifs :	16	10	6	9	7	8
Somme des $n_i x_i$	3 144	3 326	3 533	5 654	8 391	12 810
Parasitémies moyennes pondérées* (t./ml)	197	333	589	628	1 199	1 601
et incertitude** \pm	± 87	± 154	± 225	± 150	± 309	± 191

t. = trypanosomes

* quotient de la somme des $n_i x_i$ / effectif de la classe

** l'incertitude indiquée est celle portant sur la distribution des $n_i x_i$, l'incertitude globale doit également inclure l'incertitude de départ de ± 13 %

Tableau V

Estimation de la parasitémie à partir du nombre de trypanosomes observés dans un tube capillaire

Nbre de <i>T. vivax</i> observés dans un tube à hémocrite	Parasitémie correspondante en parasites/ml*
1	200 \pm 110
2	330 \pm 200
3	590 \pm 300
4	630 \pm 230
5 à 9	1 200 \pm 460
10 à 20	1 600 \pm 400

* Chiffres arrondis à la dizaine

- de respecter une hauteur d'environ 0,02 mm ; si l'on utilise des lamelles de surface (S) différente de celle indiquée, le volume de sang est choisi tel que $V = S \cdot 0,02$;

- de s'assurer visuellement de la répartition homogène de l'échantillon sous la lamelle et de rejeter les préparations contenant des bulles d'air ;

- d'effectuer une lecture en croix de la préparation, allant d'une extrémité à l'autre de la lamelle ;

- de compter les parasites sur un nombre important de champs, afin de fournir une moyenne représentative de l'échantillon (50 champs dans la présente expérience) ;

- de lire plusieurs échantillons différents de la même dilution (9 dans la présente expérience) ;

- d'avoir recours à au moins deux techniciens différents.

Enfin, une cellule vraie de profondeur 0,02 mm permettrait d'affiner cette technique de dénombrement parasitaire.

Application aux suivis de parasitémie

Pour réaliser des suivis de parasitémie, pour lesquels la précision n'est pas aussi cruciale, cette technique de comptage peut être allégée à la lecture de 40 champs sur un seul échantillon, et devient alors très rapide.

Aux grossissements 100, 400 et 1 000, avec le matériel utilisé, la parasitémie est respectivement égale à environ 17 000, 270 000 et $1,7 \cdot 10^6$ fois le nombre moyen de parasites/champ. D'autres coefficients doivent être calculés avec des grossissements, des lamelles et/ou des appareils optiques différents. Dans les conditions décrites, la technique permet l'estimation de la parasitémie depuis $1,7 \cdot 10^3$ (1 parasite/10 champs au grossissement x 100) jusqu'à $2 \cdot 10^7$ parasites/ml (12 parasites/champ au grossissement x 1 000).

Sensibilité du test de Woo

La sensibilité relative de l'HCT et du BCM/DG est variable selon les auteurs et selon les espèces parasitaires étudiées, comme le soulignent quelques rappels de résultats publiés antérieurement.

Murray et coll. (12), montrent que sur 100 N'Dama de Gambie, la technique du DG donne 39 positifs alors que celle de l'HCT n'en donne que 15, mais la proportion des espèces de trypanosomes rencontrés dans leur étude n'est pas précisée.

De même, Paris et coll. (13) indiquent que, pour *T. vivax*, la sensibilité du DG est meilleure (500 parasites/ml) que l'HCT (1 250/ml). Les résultats sont différents avec les autres espèces ; pour *T. brucei*, ils observent que l'HCT est meilleure (500/ml) que le DG (5 000/ml) et, pour *T. congolense*, le DG est plus sensible (250/ml) que l'HCT (6 250/ml). Il faut mettre en relation ces variations entre espèces avec la forme et la taille des parasites qui se comportent différemment lors de la centrifugation différentielle.

Camus (2) estime que les techniques ont la même sensibilité pour le diagnostic de *T. vivax* et *T. brucei*.

En revanche, Kalu et coll. (7) montrent que l'HCT est plus sensible que le DG pour le diagnostic de *T. vivax* et *T. brucei* sur des chèvres au Nigeria. Pour *T. congolense*, ils s'accordent sur le fait que la méthode du DG est plus sensible que l'HCT. De même, en Amérique du Sud, pour *T. vivax*, Betancourt et coll. (1), Monzon et coll. (11), Van Vlaenderen (15) et Desquesnes (3) trouvent que

l'HCT est plus sensible que le DG, mais ils ne chiffrent pas leurs résultats.

L'origine de l'ensemble de ces variations tient probablement à plusieurs facteurs :

- la variabilité intrinsèque de la technique du DG est assez importante ; l'extrusion et l'étalement du *buffy coat* à partir du tube capillaire est une étape délicate qui peut être à l'origine de grandes variations d'un technicien à l'autre ;

- la fatigue oculaire due à l'examen exhaustif des préparations peut être à l'origine d'une perte de sensibilité avec la technique de Murray lorsqu'un grand nombre d'échantillons sont traités ;

- la force centrifuge réellement exercée, qui dépend de la vitesse de rotation, de la taille des tubes, de la tension électrique et de la durée de centrifugation. Ainsi, Leeftang et coll. (10) ont observé qu'une centrifugation de 3 min au lieu de 5 donnait des résultats plus sensibles pour la détection de *T. vivax*, en particulier quand la parasitémie était basse ;

- les performances des microscopes modernes, en particulier leurs qualités optiques, et celle des condenseurs de lumière, ont considérablement amélioré les conditions de l'examen direct du *buffy coat* dans le tube capillaire ;

- l'utilisation d'objectifs normaux au grossissement x 100, ou d'objectifs à longue distance frontale aux grossissements x 250 ou x 320 peuvent également être à l'origine de variations importantes ;

- les multiples espèces parasitaires présentes en Afrique, parfois dans le même échantillon, ont pu interférer lors des estimations menées sur le terrain ;

- les performances individuelles et les habitudes des microscopistes doivent être prises en compte ;

- des variations morphologiques au sein d'une espèce, concernant en particulier la taille des parasites qui retentit sur l'effet différentiel de la centrifugation, ont été décrites chez *T. vivax* par Floch (5, 6) ; elles peuvent être à l'origine de certains écarts observés entre les auteurs utilisant des souches d'origine différente ;

- enfin, la sensibilité du test dépend étroitement de la vitalité des parasites, conditionnée notamment par : l'espèce-hôte utilisée, l'état immunitaire du sujet, mais surtout la fraîcheur et les conditions de conservation des échantillons, etc.

Dans l'expérience de Véry et coll. (16), pour *T. vivax*, le test de Woo n'est toujours positif qu'à partir de 10^4 parasites/ml de sang ; leur technique de préparation des échantillons de parasitémie déterminée passe par la séparation des parasites par centrifugation, puis la dilution du plasma riche en parasites dans du sang non infecté. En appliquant la technique de double centrifugation décrite par Kratzer et Ondiek (8), les auteurs observent que le test est toujours positif quand la parasitémie est supérieure à 10^3 , mais cette technique est plus lourde que l'HCT.

Paris et coll. (13) indiquent que, pour *T. vivax*, la sensibilité du test de Woo est de $12,5 \cdot 10^2$ parasites/ml, mais leur technique de comptage repose sur le dénombrement de parasites tués, qui peut être considérablement moins sensible que celui de parasites à l'état frais, mobiles et donc plus facilement observés.

Les résultats de cette étude indiquent une sensibilité supérieure à celles précédemment publiées, le seuil moyen de positivité a été d'environ 200 ± 110 parasites/ml, et le test a toujours été positif quand la parasitémie était supérieure à 700 parasites/ml.

■ CONCLUSION

Une technique simple a été décrite pour le comptage des parasites directement dans le sang, entre lame et lamelle ; cette technique est applicable dès que la parasitémie est supérieure à 2 000 parasites/ml (comptage au grossissement x 100).

Une correspondance entre la parasitémie et le nombre de trypanosomes observés dans un tube capillaire a été établie ; cette technique est applicable quand la parasitémie est inférieure à 2 000 parasites/ml.

L'ensemble de ces indices permet l'estimation rapide de la parasitémie pour des suivis parasitaires.

L'expérience a permis de chiffrer les données suivantes :

- le seuil moyen de positivité du test de Woo pour la détection de *T. vivax* chez le mouton a été d'environ 200 ± 110 *T. vivax*/ml ;

- le test de Woo a présenté une sensibilité de 100 p. 100 quand la parasitémie était supérieure à 700 parasites/ml ; environ 80 p. 100 quand elle était comprise entre 300 et 700 ; 50 p. 100 entre 60 et 300, puis sa sensibilité a été quasi nulle quand la parasitémie était inférieure à 60 trypanosomes/ml.

La divergence des résultats publiés antérieurement sur la sensibilité comparée des tests de Woo et de Murray doit inciter à comparer les techniques en faisant référence à une valeur fixe, qui est celle de la parasitémie, plutôt que de comparer entre elles des techniques ayant une grande variabilité intrinsèque. Le point crucial de la référence fixe sera le dénombrement des parasites dans la pré-dilution ; cette étape devra être réalisée avec la plus grande attention.

Les techniques visant à mettre en évidence une infection active, par l'observation du parasite, ou la mise en évidence de l'ADN parasitaire, doivent être comparées à des valeurs déterminées de la parasitémie.

BIBLIOGRAPHIE

1. BETANCOURT A.E., RAMIREZ L.E., WELLS E.A., BAZALAR H., 1979. La tecnica de centrifugacion en tubo capilar en el diagnostico de tripanosomiasis experimental. *Rev. ICA Bogota (Colombia)*, **14**: 97-104.
2. CAMUS E., 1983. Diagnostic de la trypanosomose bovine sur le terrain par la méthode de centrifugation hématocrite. *Revue sci. tech. Off. int. Epiz.*, **2**: 751-769.

3. DESQUESNES M., 1996. Evaluation of a simple PCR technique for the diagnosis of *Trypanosoma vivax* in the serum of cattle in comparison to parasitological techniques and antigen-enzyme linked immunosorbent assay (Ag-ELISA). *Acta Tropica* (in press).

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 in the Eastern Caribbean Basin. *Int. J. Parasitol.*, **20**: 51-56.

5. FLOCH H., 1943. Trypanosomes des bovidés en Guyane française. *Arch. Inst. Pasteur Guyane fr.*, **59** : 1-5.

6. FLOCH H., 1954. Sur la pathologie vétérinaire en Guyane française. Les affections des bovidés (I) : Généralités. Trypanosomiasis. *Arch. Inst. Pasteur Guyane fr.*, **329** : 1-8.

7. KALU A.U., EDEGHERE H.U., LAWANI F.A., 1986. Comparison of diagnostic techniques during subclinical single infections of trypanosomiasis in goats. *Vet. Parasitol.*, **22**: 37-47.

8. KRATZER R.D., ONDIEK F.O., 1989. The *buffy coat* double centrifugation technique, an improved method for the diagnosis of African trypanosomiasis. In: 20^e réunion CSIRTC, Mombasa, Kenya, 10-14 avril 1989.

9. LANHAM S.M., GODFREY D.G., 1970. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp. Parasitol.*, **28**: 521-534.

10. LEEFLANG P., BUYS J., BLOTKAMP C., 1978. Studies on *Trypanosoma vivax* : comparison of parasitological diagnostic methods. *Int. J. Parasitol.*, **8**: 15-18.

11. MONZON C.M., MANCEBO O.A., ROUX, J.P., 1990. Comparison between six parasitological methods for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in the subtropical area of Argentina. *Vet. Parasitol.*, **36**: 141-146.

12. 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.

13. PARIS J., MURRAY M., McODIMBA F., 1982. A comparative evaluation of the parasitological techniques currently available for the diagnosis of African trypanosomiasis in cattle. *Acta trop.*, **39**: 307-316.

14. SCHWARTZ D., 1963. Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. Paris, France, Éditions médicales Flammarion, p. 306.

15. VAN VLAENDEREN G., 1996. In search of cattle trypanosomiasis in Suriname. M. Sci. Thesis, Prince Leopold Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium. (Santé animale n°46)

16. VERY P., BOCQUENTIN R., DUVALLET G., 1990. Sensibilité de la double microcentrifugation pour la recherche des trypanosomes. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **43** : 325-329.

17. WOO P.T.K., 1969. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. *Can. J. Zool.*, **47**: 921-923.

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

Reçu le 9.9.96, accepté le 19.2.97

Summary

Desquesnes M., Tresse L. Evaluation of the sensitivity of Woo test for detection of *Trypanosoma vivax*

The haematocrit centrifuge technique (HCT), or Woo test, is the technique most commonly used for diagnosis of animal trypanosomiasis, but its sensitivity is not well defined. Depending on the authors, the sensitivity of the Murray technique (dark ground buffy coat method, or DG/BCM) is higher, equal or lower than that of the Woo test for the detection of *Trypanosoma vivax*. Most authors have compared particular techniques relatively to other techniques, rather than attempting to measure the sensitivity of the tests in relation to a fixed reference. The relative sensitivity of particular tests appears to vary between technicians. The aim of the present study was to measure the sensitivity of the Woo test for French Guiana *T. vivax* detection, using blood samples with pre-determined levels of parasitaemia, ranging from 1 to 1767 parasites/ml, that were prepared by mixing infected ovine blood with non infected ovine blood. A simple technique is described for the enumeration of parasites in blood. The mean positivity level of the Woo test in sheep was about 200 ± 110 *T. vivax*/ml. The sensitivity of the test was 100 % above 700 parasites/ml, about 80 % between 300 and 700, 50 % between 60 and 300, and was negligible below 60 parasites/ml. Parameters are provided to estimate parasitaemia based on the number of parasites observed between slide and cover slip (parasitaemia > 2000) or in the capillary tube (parasitaemia < 2000). Sensitivity of the techniques for detection of active infection could be evaluated in comparison with fixed values such as known parasitaemias, artificially created, as described here.

Key words: *Trypanosoma vivax* - Centrifuging - Haematocrit - Sheep - Blood plasma - French Guiana.

Resumen

Desquesnes M., Tresse L. Evaluación de la sensibilidad del test de Woo para la detección del *Trypanosoma vivax*

La técnica de centrifugación del hematocrito (HTC), o test de Woo, es la más utilizada para el diagnóstico de las tripanosomiasis animales, pero su sensibilidad es poco conocida. Según los autores, en el caso de la detección del *Trypanosoma vivax*, esta es superior, igual o inferior que en el caso de la observación del *buffy coat* entre lámina porta objetos y la lámina cubre objetos del microscopio a fondo oscuro (*dark ground, buffy coat* method, DG/BCM) o técnica de Murray. La mayoría de los trabajos anteriores se orientan hacia una comparación de las técnicas parasitológicas entre ellas, más que a descifrar la sensibilidad de los tests con respecto a una referencia fija. La comparación de los tests entre ellos es una evaluación relativa, debido a que todas las técnicas utilizadas no tienen la misma sensibilidad en manos diferentes. El objetivo del presente trabajo es el de cuantificar la sensibilidad de la técnica de Woo para la detección de *Trypanosoma vivax* en Guyana, mediante pruebas realizadas en muestras sanguíneas con parasitemia determinada, en un rango de 1 a 1767 tripanosomas/ml, preparados mediante dilución de sangre infectada en sangre no infectada. La experiencia se realizó con sangre ovina. Se describe una técnica simple para el conteo de parásitos en la sangre. El límite promedio de positividad del test de Woo en el ovino fue de alrededor de 200 ± 110 *T. vivax*/ml. El test presentó una sensibilidad de 100 p. 100 cuando la parasitemia fue superior a 700 parásitos/ml, alrededor de 80 p. 100 entre 300 y 700, 50 p. 100 entre 60 y 300 y la sensibilidad fue casi nula bajo la barra de 60 parásitos/ml. Se dan los índices que permiten cuantificar la parasitemia en función del número de parásitos observados entre lámina porta objetos y la lámina cubre objetos (parasitemia > 2000) o bien contados en el tubo de hematocrito (parasitemia < 2000). Se propone una evaluación de la sensibilidad de las técnicas destinadas a demostrar una infección activa, con respecto a referencias fijas, es decir parasitemias conocidas, creadas artificialmente, tal y como se describió.

Palabras clave : *Trypanosoma vivax* - Centrifugación - Hematocrito - Ovino - Plasma sanguíneo - Guayana francesa.

Evaluation de la sensibilité de la PCR pour la détection de l'ADN de *Trypanosoma vivax* selon divers modes de préparation des échantillons sanguins

M. Desquesnes^{1*} L. Tresse¹

Mots-clés

Trypanosoma vivax - Amplification chaîne polymérase - Ovin - Bétail - Centrifugation - Plasma sanguin - Diagnostic - Guyane Française.

Résumé

Pour le diagnostic des infections actives du bétail par les trypanosomes, les techniques parasitologiques sont peu sensibles, en particulier lors de la phase chronique des infections. La détection des antigènes de *Trypanosoma vivax* par méthode antigène-ELISA, mise au point par Nantulya et Lindqvist (1989), s'est avérée peu sensible et peu spécifique. La technique de détection de l'ADN de *T. vivax* par *polymerase chain reaction* (PCR), à l'aide des oligonucléotides décrits par Masiga et coll. (1992), est une alternative pour un diagnostic spécifique des infections actives du bétail. Vingt deux échantillons sanguins contenant des nombres déterminés de trypanosomes/ml, allant de 1 à 1 767, ont été constitués à partir de sang de mouton infecté par *T. vivax*, dilué dans du sang d'animal non infecté. La sensibilité de la réaction de PCR a été évaluée sur plusieurs types de préparation du sang : sang total hépariné, plasma, interface globules blancs/plasma de tubes à hématocrite (*buffy coat*), sang lysé, culot de centrifugation de plasma, et ADN purifié à l'aide d'un kit commercial à base de résine échangeuse d'ions. Le sang total inhibe presque toujours la PCR. La réaction sur plasma et sang lysé possède une faible sensibilité, de l'ordre de 450 parasites/ml. La PCR sur *buffy coat* a une meilleure sensibilité, les produits de la réaction sont parfois peu visibles. Le culot de centrifugation de plasma est une préparation originale, rapide et économique, dont les produits de PCR sont bien visibles, et qui a présenté une bonne sensibilité : 100 p. 100 des échantillons étaient positifs au-delà de 9 parasites/ml. La purification de l'ADN est une technique un peu plus longue et coûteuse, puisqu'elle procède de plusieurs manipulations et de l'utilisation d'un kit commercial, mais elle apparaît comme la plus sensible des techniques éprouvées : 100 p. 100 des échantillons étaient positifs au-delà de 2 parasites/ml ; toutefois, la lecture des résultats est parfois délicate. Ces deux techniques permettent de réaliser un diagnostic sensible et spécifique des infections actives du bétail par *T. vivax*. Leur évaluation devra être faite pour les autres espèces de trypanosomes pathogènes du bétail.

■ INTRODUCTION

Pour le diagnostic des infections actives par les trypanosomes, les techniques parasitologiques sont peu sensibles lorsque les parasitemies sont basses, ce qui est la règle lors de la phase chronique des infections (6).

Les techniques de diagnostic mises au point par Nantulya et Lindqvist pour la détection des antigènes par ELISA immunocapture (10) se sont avérées peu sensibles et peu spécifiques (2, 3) ;

elles sont en particulier inutilisables avec IL4007, une souche sud-américaine de *Trypanosoma vivax* (3).

Les techniques de PCR sont une alternative permettant la détection de l'ADN parasitaire. La rémanence de l'ADN de *T. vivax* dans le sang après destruction du parasite est très brève (1) ; en conséquence, une réponse positive à la PCR indique que l'animal est activement infecté.

Des travaux antérieurs ont montré la possibilité d'effectuer un diagnostic spécifique d'espèce (9) des infections actives du bétail par les trypanosomes, par PCR à partir de sang lysé (4), du *buffy coat* de tubes à hématocrite (8), de sérum (1), et d'ADN purifié (11).

L'objet du présent travail est de chiffrer le seuil de détection et la sensibilité de la PCR selon divers modes de préparation des échan-

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

* Adresse actuelle : CIRAD-EMVT, Campus international de Baillarguet, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex, France

tillons sanguins. Le travail a été réalisé au CIRAD-EMVT-Guyane, avec une souche Guyanaise de *T. vivax* cultivée sur mouton.

■ MATERIEL ET METHODES

Sang parasité

Deux moutons croisés Black belly x Créole, âgés de 12 mois, issus d'un troupeau indemne de trypanosomose, et eux-même négatifs aux tests de Woo et de recherche d'anticorps par ELISA à l'aide d'une méthode voisine de celle de Ferenc et coll. (5), ont été maintenus en bergerie sous moustiquaire.

L'un d'eux a été expérimentalement infecté par voie intraveineuse avec une souche de *T. vivax* de Guyane Française TVFG2, isolée en 1994 par Desquesnes et Demarty (non publié) ; il a été utilisé pour fournir du sang parasité. L'autre animal a fourni du sang non infecté et ne réagissant pas spécifiquement avec *T. vivax* (absence d'anticorps dirigés contre *T. vivax*).

Un volume de 5 ml de sang de l'animal infecté a été collecté lors du quatrième pic parasitémique suivant l'infection. Un volume de 150 ml de sang non infecté a été récolté au même moment sur l'autre animal.

Les échantillons sanguins ont été collectés sur héparinate de lithium, en tubes vacutainers siliconés de 5ml, puis déposés sur glace.

Comptage des parasites

Après une estimation de la parasitémie, une pré-dilution du sang parasité a été réalisée avec le sang de l'animal non infecté, afin de ramener la parasitémie aux alentours de 10^5 trypanosomes/ml. Après homogénéisation du mélange de sangs, le dénombrement des parasites dans la pré-dilution a été effectué comme suit :

Un volume de 10 μ l de sang a été déposé, à l'aide d'une micro-pipette, entre lame et lamelle (22 x 22 mm) ; lorsque la lamelle a été déposée, les auteurs se sont assurés que la répartition du sang était homogène sur l'ensemble de sa surface. Au grossissement x 400, 2 fois 25 champs de microscope ont été explorés, par une lecture en croix partant et aboutissant aux extrémités de la lamelle, soit un total de 50 champs par préparation. Le nombre total de parasites observés a été enregistré au cours de l'exploration.

En supposant une répartition homogène du sang, la hauteur moyenne de la «cellule» constituée par la lame et la lamelle était $h = 0,0207$ mm (10 μ l/484 mm²). Au grossissement microscopique utilisé (x 400), l'arête de la lamelle (22 mm) représentait 46 diamètres du champ microscopique ; le rayon d'un champ microscopique était donc de 0,239 mm, et le volume de sang exploré dans un champ microscopique de $3,707 \cdot 10^{-3}$ mm³ (selon l'équation $V = h \times \pi R^2$). L'observation d'une moyenne d'un trypanosome par champ correspondait donc à une parasitémie de 269 711 trypanosomes/ml.

Les comptages ont été effectués sur neuf préparations différentes de la pré-dilution, afin d'établir la parasitémie de cette pré-dilution, avec un risque d'erreur limité.

L'intervalle de confiance de la moyenne au risque de 5 p. 100 a été établi selon la formule donnée par Schwartz (12) :

$$\mu = m_0 \pm \frac{t S}{\sqrt{n}}, \quad \text{avec } n = 9, \text{ ddl} = 8 \text{ et } t = 2,3.$$

Préparation des dilutions de sang

A partir de la parasitémie calculée sur la pré-dilution, 22 dilutions mathématiques successives du sang parasité dans le sang non parasité ont été préparées, avec des volumes finaux de 5 ml pour chaque dilution. Avant et après homogénéisation des mélanges de sangs les échantillons ont été placés sur glace afin de préserver la vitalité des parasites. Les dilutions ont été réalisées comme suit (en nombre de trypanosomes/ml) : 1 767, 1 325, 883, 707, 530, 442, 353, 265, 177, 88, 71, 57, 44, 35, 26, 18, 13, 9, 7, 4, 2 et 1.

Préparation des échantillons pour la PCR

Partant de 22 dilutions, chacune sous un volume de 5 ml, six modes de préparation des échantillons ont été appliqués.

n°1 - Sang total : un volume de 50 μ l de sang a été placé en cryotube à -20°C. Il a été décongelé et pipeté directement pour la PCR.

n°2 - Plasma : après centrifugation de 3,5 ml de sang hépariné à 304 g (1 300 t/min), à 4°C, pendant 10 min, le plasma a été récolté ; 0,5 ml a été placé dans un microtube à centrifugation et destiné à la préparation du «culot de centrifugation de plasma» (voir n°4), et 50 μ l ont été conservés en cryotube à -20°C. Ce plasma a été décongelé et pipeté directement pour la PCR.

n°3 - Buffy coat : un tube capillaire (70 μ l) a été préparé et centrifugé selon la technique de Woo (13) pendant 5 min à 15 000 t/min, puis, à l'aide d'une pointe de diamant, le tube a été coupé à environ 1 mm au-dessus de l'interface globules blancs/plasma ; 3 μ l de *buffy coat* ont été recueillis à l'aide d'une micro-pipette, placés dans un microtube et conservés à -20°C. Le *buffy coat* a été décongelé et pipeté directement pour la PCR. Le volume de matériel biologique étant très faible, dans l'expérience, six tubes ont ainsi été préparés afin de pouvoir réaliser plusieurs réactions de PCR sur la même dilution.

n°4 - Culot de centrifugation de plasma : c'est une préparation originale qui consiste à séparer les cellules sanguines du plasma par une première centrifugation du sang hépariné à basse vitesse (1 300 t/min), puis à sédimenter les parasites par une centrifugation du plasma à haute vitesse. Une quantité de 0,5 ml de plasma, précédemment obtenu (n°2), a été centrifugé à l'état frais, à 17 530 g (14 000 t/min), à 4°C, pendant 15 min. Le surnageant a été délicatement éliminé à la pipette, le culot a été placé à -20°C. L'échantillon a été décongelé et pipeté directement pour la PCR.

n°5 - Sang lysé : le protocole de lyse à la saponine décrit par Diall (4) a été utilisé. En bref, un volume de 50 μ l de sang hépariné a été ajouté à 500 μ l de tampon de lyse et centrifugé pendant 15 min à 17 530 g. Le surnageant a été éliminé, et le culot repris dans 500 μ l de tampon de lyse pour un deuxième lavage dans les mêmes conditions. Le culot a été repris dans 500 μ l de tampon de PCR, et centrifugé pendant 15 min à 17 530 g. Le culot a été repris dans 25 μ l d'eau distillée, incubé pendant 20 min à 100°C, puis conservé à -20°C. Il a été décongelé et pipeté directement pour la PCR.

n°6 - ADN purifié : la méthode décrite par Penchenier et coll. (11) a été utilisée pour la préparation des échantillons à l'aide du kit «ReadyAmp® Genomic DNA Purification System» (Promega®), à partir d'un volume de 0,8 ml de sang. Succinctement, 0,8 ml de sang hépariné et 0,8 ml d'eau stérile ont été incubés et agités 10 min à température ambiante, puis centrifugés pendant 2 min à 17 530 g. Le surnageant a été éliminé. Le culot a été resuspendu dans 100 μ l de résine et incubé pendant 20 min à 56°C, passé au vortex, incubé 10 min à 100°C, puis centrifugé pendant 2 min à 17 530 g. Le surnageant a été récolté et

Sample preparation for PCR diagnosis of *T. vivax* infections

stocké à -20°C en microtube. Il a été décongelé et pipeté directement pour la PCR.

Technique de PCR

Le protocole de PCR a été celui décrit pour la détection de l'ADN de *T. vivax* par Masiga et coll. (9), mis à part que le volume du milieu réactionnel n'était que de 20 μl (contre 50 μl dans la publication originale).

Les séquences des oligonucléotides sont rappelées ci-après :

TVW1 : 5'-CTG AGT GCT CCA TGT GCC AC-3' et

TVW2 : 5'-CCA CCA GAA CAC CAA CCT GA-3'

Le produit de PCR attendu est d'environ 150 pb.

Les concentrations finales des réactifs dans le milieu de PCR étaient les suivantes : 10 mM Tris-HCl, pH 8,3 ; 50 mM KCl ; 1,5 mM MgCl₂ ; 200 μM de chaque nucléotide (Nucleotide solutions, Biolabs®) ; 0,83 μM de chaque oligonucléotide, et 0,25 unité de Taq DNA polymérase (Taq DNA polymérase 5 000 U/ml, Promega®). Les réactions ont été menées en microtube de 0,5 ml ; le milieu réactionnel a été couvert à l'aide d'une goutte d'huile minérale (Mineral oil, Sigma®).

Le témoin positif était constitué de plasma du mouton infecté récolté au quatrième pic parasitémique (2.10^6 parasites/ml). Le témoin négatif était constitué d'eau bidistillée. Les témoins et les échantillons ont été agités vigoureusement au vortex avant d'être pipetés et déposés à travers l'huile, à la micropipette, sous un volume de 1 μl .

Les 30 cycles thermiques de 30 sec ($94^{\circ}\text{C}/55^{\circ}\text{C}/72^{\circ}\text{C}$) ont été effectués à l'aide d'un thermocycleur programmable (Thermojet V2.0®) ; une étape de dénaturation à 94°C pendant 5 min a précédé les cycles, une étape d'élongation terminale de 10 min à 72°C a été réalisée à l'issue des 30 cycles, puis les échantillons ont été ramenés à 4°C jusqu'à leur dépôt sur le gel d'agarose.

Pour la révélation des réactions, 10 μl d'échantillon mélangé à 1 ml de tampon de dépôt (tampon Tris, glycérol et bleu de bromophénol) ont été déposés dans un gel à 2,5 p. 100 d'agarose, en tampon Tris-borate EDTA/bromure d'éthidium. Le marqueur moléculaire pBR 322 DNA- *Msp* I Digest (Biolabs®) a été utilisé pour estimer le poids moléculaire des produits de PCR. L'électrophorèse a été réalisée à 85 V, 30-40 mA pendant 50 min. La lecture visuelle des résultats a été faite sur une table UV de longueur d'onde 312 nm. Le résultat était positif lorsqu'une bande fluorescente était visible à hauteur des marqueurs moléculaires spécifiques (doublet 160-147 bp du marqueur utilisé). Un cliché photographique (film Polaroid® 667 ISO 3000/36° et filtre gélatine Wratten® orange n°22) a permis d'archiver les résultats. Si l'un des témoins ne donnait pas satisfaction, l'ensemble des résultats de la réaction était rejeté.

Pour s'assurer de la reproductibilité des réactions, chaque échantillon a été traité trois fois. Au total 396 réactions ont été pratiquées (22 dilutions x 6 préparations x 3 répétitions).

Interprétation des résultats

Le seuil de positivité observé pour chaque technique de préparation des échantillons a été défini à la dilution pour laquelle des réactions négatives ont apparu en relation avec la décroissance de la parasitémie.

La sensibilité (Se) de la PCR a été calculée à partir de la définition de la sensibilité d'un test :

$$Se = \frac{\text{nombre de positifs}}{\text{vrais positifs} + \text{faux négatifs}}$$

Dans cette expérience, tous les échantillons étant infectés, la sensibilité du test s'est exprimée comme suit :

$$Se = \frac{\text{nombre d'échantillons positifs}}{\text{nombre d'échantillons testés}}$$

Elle a été calculée pour chaque type de préparation, aux divers seuils de positivité définis ci-dessus.

RESULTATS

Le jour de l'expérience, la parasitémie a été estimée à 2.10^6 trypanosomes/ml. Une pré-dilution au 1/20^e a ramené la parasitémie aux environs de 10^5 trypanosomes/ml, puis les 9 comptages ont été réalisés. Le nombre moyen de *T. vivax* observés en 9 lectures de 50 champs a été de $107\,000 \pm 14\,000$ (soit 13 p. 100) trypanosomes/ml. Les incertitudes sur les dilutions mathématiques réalisées à partir de cet échantillon étant considérées comme négligeables, les intervalles de confiance des 22 dilutions ont donc également été de 13 p. 100.

La figure 1 illustre le type de tracés obtenus sur les gels d'électrophorèse.

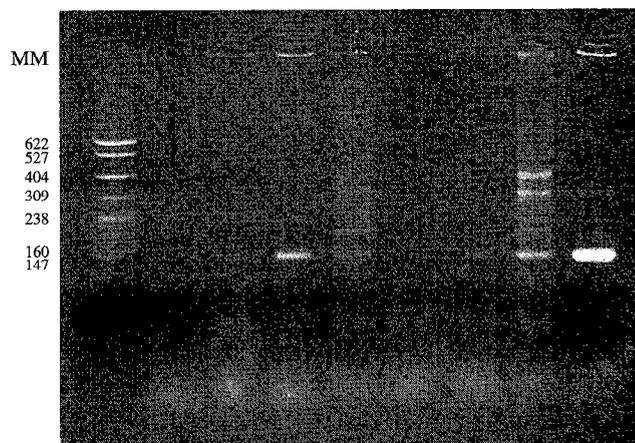


Figure 1 : tracés de migration des échantillons de PCR selon divers modes de préparation, pour une parasitémie de $530 T. vivax/ml$. De gauche à droite : marqueur moléculaire (MM), témoin négatif, plasma, culot de centrifugation de plasma, sang lysé, sang hépariné, buffy coat, ADN purifié, témoin positif (plasma à 2.10^6 parasites/ml).

Quand la réaction était positive, avec les échantillons de plasma, de buffy coat et les culots de centrifugation de plasma, une bande unique de 150 pb était généralement observée ; lorsque la parasitémie était très élevée, une bande de double poids (300 pb) était également visible (témoins positifs, plasma à 2.10^6 parasites/ml). Le sang lysé et l'ADN purifié ont fait apparaître une fluorescence diffuse sur les trajets de migration des échantillons, ainsi que de multiples bandes de poids moléculaire non spécifiques qui pouvaient gêner la lecture du test, et dont l'intensité était parfois égale, voire supérieure à celle du signal spécifique de 150 pb.

Tableau I

Résultats des PCR avec les diverses préparations, selon la parasitémie

Parasitémie en t./ml*	Mode de préparation des échantillons sanguins					
	Plasma	Culot de plasma	Lyse du sang	Sang hépariné	Buffy coat	ADN purifié
1 767	3	3	3	0	3	3
1 325	2	3	3	0	3	3
883	3	3	3	0	3	3
707	3	3	3	0	3	3
530	3	3	3	0	3	3
442	3	3	3	0	3	3
353	0	3	0	0	3	3
265	1	3	2	0	3	3
177	1	3	0	1	3	3
88	2	3	1	0	3	3
71	1	3	2	2	3	3
57	2	3	1	2	3	3
44	1	3	2	0	3	3
35	2	3	1	0	2	3
26	0	2	0	0	1	3
18	1	3	0	0	2	3
13	1	3	0	0	0	3
9	2	3	0	0	2	3
7	0	2	0	0	0	3
4	0	1	0	0	0	3
2	0	1	0	0	0	3
1	0	0	0	0	0	0
Total positifs	31	57	27	5	46	63
Pourcentage de positifs	47 %	86 %	41 %	8 %	70 %	95 %

t. = trypanosomes

* les nombres de trypanosomes/ml indiqués sont affectés d'une incertitude de 13 %

Les résultats des PCR ont été reportés au tableau I, où figure le nombre de réactions positives observées (sur un total de trois réactions par échantillon), selon la dilution, pour chaque technique de préparation des échantillons. Le pourcentage total d'échantillons positifs est indiqué au bas du tableau (sensibilité globale de chaque test vis-à-vis de l'échantillonnage utilisé).

La réaction de PCR a presque toujours été nulle dans le sang total hépariné ; sur les 66 échantillons testés (3 x 22 dilutions) seulement 8 p. 100 ont été positifs.

Les autres échantillons ont présenté des résultats régulièrement, ou presque régulièrement, positifs au-dessus des seuils de positivité moyens indiqués ci-après :

- plasma et lyse du sang : $\geq 442 \pm 60$ trypanosomes/ml ;

- buffy coat : $\geq 44 \pm 6$ trypanosomes/ml ;

- culot de centrifugation de plasma : $\geq 9 \pm 1,2$ trypanosomes/ml ;

- ADN purifié : $\geq 2 \pm 0,25$ trypanosomes/ml.

Pour chaque mode de préparation des échantillons, la sensibilité de la PCR a été exprimée en fonction de la parasitémie, pour les 4 principaux seuils observés ; ces résultats ont été reportés au tableau II.

DISCUSSION

Choix du mode de préparation des échantillons

Les résultats font apparaître que le sang total est un très mauvais échantillon pour la PCR ; les inhibiteurs de la réaction, comme les substances porphyriques dérivées de l'hème, sont connus et justifient la purification de l'ADN réalisée pour la plupart des réactions de PCR sur échantillons sanguins (7).

Le plasma et le sang lysé ont présenté des sensibilités voisines, de l'ordre de 450 parasites/ml ; en-deçà de cette valeur, plusieurs résultats intermédiaires faussement négatifs ont été observés. D'autre part, avec la lyse du sang, le tracé de migration des échantillons a présenté une fluorescence forte, ainsi que de nombreuses bandes de poids moléculaire non spécifiques ; de plus, la bande de poids moléculaire spécifique ne possédait qu'une faible fluorescence (figure 1). Ces éléments rendent délicate la lecture du produit de PCR sur lyse du sang.

Tableau II

Sensibilité de la PCR selon quatre principaux seuils de positivité, coût et temps de préparation des échantillons

Sensibilité au seuil de (t./ml)	Plasma	Culot de plasma	Sang lysé	Buffy coat	ADN purifié
442 \pm 60	94 %	100 %	100 %	100 %	100 %
44 \pm 6	64 %	100 %	67 %	100 %	100 %
9 \pm 1,3	57 %	98 %	50 %	85 %	100 %
2 \pm 0,3	49 %	90 %	43 %	73 %	100 %
Coût de la préparation*	0,75 FF	0,90 FF	1,85 FF	1,75 FF	6,35 FF
Temps de manipulation :	1 min	3 min	6 min	3 min	4 min
Temps d'attente cumulés :	10 min	25 min	75 min	5 min	44 min

t. = trypanosomes

* ce coût n'inclut que la préparation des échantillons, pour calculer le coût total du diagnostic il faut ajouter celui de la PCR, soit environ 3 FF.

Le seuil de positivité obtenu sur plasma était inférieur à celui précédemment décrit sur sérum qui était de l'ordre de 1 000 à 1 500 parasites/ml (1). Cette différence est probablement due au fait que la séparation du plasma a été réalisée par centrifugation du sang hépariné à basse vitesse, ce qui, par effet différentiel, a permis de préserver au maximum la présence des trypanosomes dans le plasma, tout en éliminant les cellules sanguines dans le culot de centrifugation.

Le *buffy coat* a présenté une meilleure sensibilité, l'extinction des signaux de PCR survenant quand la parasitémie était inférieure à 44 ± 6 parasites/ml. La PCR sur *buffy coat* est de lecture facile (une seule bande de fluorescence) bien que la fluorescence soit parfois de faible intensité. Le passage des échantillons au vortex avant l'introduction dans le milieu de PCR est apparu comme une étape déterminante pour des résultats reproductibles. En-deçà de 44 trypanosomes/ml, les résultats étaient irréguliers, probablement du fait que le prélèvement du *buffy coat* est une opération délicate sujette à variations entre techniciens.

Il est à noter que pour pouvoir réitérer la réaction il est nécessaire de préparer plusieurs tubes à hématocrite ou de réaliser la centrifugation à haute vitesse en microtube, avec l'échantillon sanguin de départ, afin de collecter un volume de *buffy coat* suffisant.

La séparation du plasma par centrifugation du sang hépariné à basse vitesse (1 300 t/min) permet d'éliminer les cellules sanguines par sédimentation, sans trop appauvrir l'échantillon en parasites. Par la suite, la centrifugation du plasma à haute vitesse permet d'enrichir l'échantillon en récoltant les parasites dans le culot.

La PCR sur culot de centrifugation de plasma a donné des résultats régulièrement positifs jusqu'au seuil de 9 trypanosomes/ml. Le produit spécifique de PCR est généralement bien visible, et le tracé de migration ne présente aucune fluorescence non spécifique (figure 1).

La purification de l'ADN fournit les meilleurs résultats, avec un seuil de positivité de 2 trypanosomes/ml, et l'absence de résultats intermédiaires faussement négatifs ; c'est donc la préparation la plus sensible. Le seul inconvénient est la forte fluorescence du tracé de migration des échantillons, et la présence de bandes de poids moléculaire non spécifiques qui rendent parfois la lecture du test délicate (figure 1).

Sensibilité et coût

Avec cette technique de purification de l'ADN, et les oligonucléotides TBR1 et TBR2 décrits par Masiga et coll. (9), Penchenier et coll. (11) ont obtenu la détection d'1 *T. brucei*/ml de sang chez l'homme. Ce seuil de positivité est très voisin de celui obtenu ici dans des conditions similaires, avec *T. vivax* chez le mouton. La technique de purification de l'ADN décrite par Penchenier et coll. semble donc parfaitement adaptée à ces deux espèces ; toutefois, le temps de préparation et le coût des réactifs en font un mode de préparation onéreux, peu adapté au traitement d'un grand nombre d'échantillons.

Le tableau II résume, pour chaque type de préparation, la sensibilité du test pour quelques seuils de positivité, les durées de préparation des échantillons (manipulation et temps d'attente) et le coût des préparations. Pour les calculs de coût, seul le matériel et les réactifs nécessaires à la préparation des échantillons sont pris en compte au tarif de base des catalogues des fournisseurs. Avec un volume réactionnel fixé à 20 μ l, le coût de la PCR est d'environ 3 FF, ce qui porte le coût total des diagnostics à environ 4 FF (culot de centrifugation de plasma) et 10 FF (purification de l'ADN) ; soit, respectivement, 0,8 et 2 \$US.

Spécificité

Avec les oligonucléotides spécifiques d'espèce, décrits par Masiga et coll. (9) pour *T. vivax*, *T. brucei* et *T. congolense*, il n'a jusqu'à présent jamais été décrit de réactions croisées, ni entre *Trypanosoma* sp. ni avec d'autres genres ; leur spécificité est totale.

Alors qu'avec la technique parasitologique, lorsque les parasites observés dans les tubes capillaires sont peu nombreux ou résultent d'un mélange de plusieurs espèces, il n'est pas toujours possible d'identifier la ou les espèces présentes ; la technique de PCR est, quant à elle, parfaitement spécifique d'espèce.

Comparaison au test de Woo

Les deux techniques préconisées à l'issue de cette expérience montrent, pour la détection de *T. vivax*, une sensibilité bien supérieure à celle du test de Woo dont le seuil de positivité, dans cette même expérience, a été évalué à 700 *T. vivax*/ml pour une sensibilité de 100 p. 100 (voir article précédent).

■ CONCLUSION

Economiquement, à sensibilités voisines, la préparation du culot de plasma est plus rapide et plus avantageuse que la purification de l'ADN. On préconisera donc l'usage du culot de centrifugation de plasma pour la préparation des échantillons à la PCR dans le cadre des études épidémiologiques, et la purification de l'ADN pour le diagnostic individuel.

L'étude de la sensibilité et du seuil de positivité de la technique de culot de centrifugation de plasma devrait être faite avec les autres *Trypanosoma* sp. et les oligonucléotides correspondants. Compte tenu de la faible taille de *T. congolense* et des conséquences sur son positionnement après la centrifugation du sang, il est probable que, pour cette espèce, seule la technique de purification de l'ADN soit adaptée ; en revanche, la large membrane ondulante de *T. brucei* permettra, avec un rendement au moins égal à celui de *T. vivax*, d'enrichir en parasites les échantillons de culot de centrifugation de plasma. La technique du culot de centrifugation de plasma devrait donc être adaptée à ces deux espèces, tandis que la purification de l'ADN pourrait être appliquée à la détection de *T. congolense*. L'évaluation de cette technique pour le diagnostic des infections actives du bétail par *T. brucei* devra être faite.

Remerciements

Nous remercions vivement L. Penchenier et ses collaborateurs pour nous avoir adressé leur manuscrit avant publication et nous avoir autorisé à le citer en référence.

BIBLIOGRAPHIE

- DESQUESNES M. Application of a PCR technique on serum for diagnosis of the infection with *T. vivax* in cattle, comparison of the sensitivity to antigen detection test (trapping-ELISA) and parasitological techniques. *Acta Tropica* (sous presse).
- DESQUESNES M., 1996. Evaluation of three antigen detection tests (monoclonal trapping ELISA) for African trypanosomes, with an isolate of *T. vivax* from French Guyana. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **791**: 172-185.
- DESQUESNES M., LA ROCQUE S. de, 1995. 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 Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **48** : 247-253.

4. DIALL O., 1993. Camel trypanosomiasis in Mali; Contribution to the diagnosis and the epidemiology. Thèse Doct. Sci., Institut voor moleculaire biologie, Vrije Universiteit, Bruxelles, Belgique, 92 p.
5. 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 in the Eastern Caribbean basin. *Int. J. Parasitol.*, **20**: 51-56.
6. GARDINER P.R., 1989. Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. *Adv. Parasitol.*, **28**: 229-317.
7. HIGUCHI R., 1989. Principles and applications for DNA amplification. In: H.A. Erlich ed., PCR technology. Stockton, England, Stockton Press, p. 31-37.
8. MAJIWA P.A.O., THATTHI R., MOLOO S.K., NYEKO J.P.H., OTIENO L.H., MALOO S., 1994. Detection of trypanosome infections in the saliva of tsetse flies and buffy coat samples from antigenaemic but aparasi-taemic cattle. *Parasitology*, **108**: 1-10.
9. 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. Parasitol.*, **22**: 909-918.
10. NANTULYA V.M., LINDQVIST K.J., 1989. Antigen-detection enzyme immunoassays for diagnosis of *Trypanosoma vivax*, *T. congolense* and *T. brucei* infections in cattle. *Trop. Med. Parasitol.*, **40**: 267-272.
11. PENCHENIER L., DUMAS, V., GREBAUT P., REIFENBERG J.M., CUNY G., 1996. Improvement of blood and fly gut processing for PCR diagnosis of trypanosomosis. *Parasite*, **3**: 387-389.
12. SCHWARTZ D., 1963. Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. Paris, France, Editions médicales Flammarion, p. 306.
13. WOO P.T.K., 1970. The haematocrit centrifuge technique for diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta trop.*, **27**: 384-386.

Reçu le 16.10.96, accepté le 17.2.97

Summary

Desquesnes M., Tresse L. PCR sensitivity for *Trypanosoma vivax* detection with several methods of blood sample preparation

Parasitological techniques show a low sensitivity for diagnosis of active infections with *Trypanosoma* sp. in livestock, particularly in the case of chronic infections. *T. vivax* antigen detection through antigen-ELISA developed by Nantulya and Lindqvist (1989) is not sensitive and specific enough for infection diagnosis. *T. vivax* DNA detection through polymerase chain reaction (PCR) using the oligonucleotides developed by MASIGA et coll. (1992) appears to be an alternative for a specific diagnosis of *T. vivax* active infections in livestock. Twenty-two blood samples containing known numbers of *T. vivax*/ml, ranging from 1 to 1767, were prepared by dilution of *T. vivax* infected sheep blood into blood from a non infected sheep. PCR sensitivity was evaluated in several types of blood sample preparations: crude heparinized blood, plasma, lysed blood, buffy coat from haematocrit capillary tubes, pellet from plasma centrifugation, and DNA purified with an ion exchange resin commercial kit. Crude heparinized blood almost always inhibited PCR. Sensitivity of PCR with plasma and lysed blood was low, around 450 parasites/ml. PCR on buffy coat was more sensitive, but PCR products were sometimes little visible. Pellet of plasma centrifugation is an original, fast and economic preparation, whose PCR products are highly visible and which presents a high sensitivity: one hundred percent of the samples were positive when the parasitaemia was over 9 parasites/ml. DNA purification is slightly more time consuming and expensive, since it requires several manipulations and the use of a commercial kit, but it appears to be the most sensitive technique among those investigated: one hundred percent of the samples were positive when the parasitaemia was over 2 parasites/ml; however, PCR products were sometimes difficult to interpret. These last two techniques are recommended for a sensitive and species-specific diagnosis of active infections of livestock with *T. vivax*. These techniques should be evaluated for other pathogenic trypanosome species of livestock.

Key words: *Trypanosoma vivax* - Polymerase chain reaction - Sheep - Livestock - Centrifuging - Blood plasma - Diagnosis - French Guiana.

Resumen

Desquesnes M., Tresse L. Evaluación de la sensibilidad de la PCR para la detección del ADN del *Trypanosoma vivax* según diversos métodos de preparación de las muestras sanguíneas

Para el diagnóstico de las infecciones activas de tripanosomas en el ganado, las técnicas parasitológicas son poco sensibles, en particular durante la fase crónica de las infecciones. La detección de antígenos de *Trypanosoma vivax*, mediante el método antígenos-ELISA, desarrollado por Nantulya y Lindqvist (1989), se ha revelado poco sensible y poco específica. La técnica de detección del ADN de *T. vivax* mediante una reacción en cadena de polimerasas (PCR), gracias a oligonucleótidos descritos por Masiga *et al.* (1992), es una alternativa para un diagnóstico específico de las infecciones activas del ganado. Se prepararon veintidós muestras sanguíneas, conteniendo cantidades determinadas de tripanosomas/ml, de 1 a 1767, a partir de sangre de ovino infectado con *T. vivax*, diluido en sangre animal no infectada. La sensibilidad de la reacción de PCR fue evaluada sobre diferentes tipos de preparación sanguínea: sangre entera heparinizada, plasma, interfase glóbulos blancos/plasma de los tubos de hematocrito (*buffy coat*), sangre hemolisada, fondo de centrifugación de plasma y ADN purificado mediante un kit comercial a base de resina para intercambio de iones. La sangre total inhibe casi siempre la PCR. La reacción sobre plasma y sangre hemolisada presentan una sensibilidad baja, de alrededor de 450 parásitos/ml. La PCR sobre *buffy coat* presenta una mejor sensibilidad, los productos de la reacción son ocasionalmente poco visibles. El fondo de centrifugación de plasma es una preparación original, rápida y económica, cuyos productos de PCR son bien visibles y que presenta una buena sensibilidad: 100 p. 100 de las muestras fueron positivas a partir de 9 parásitos/ml. La purificación del ADN es una técnica un poco más larga y costosa, ya que proviene de diversas manipulaciones y de la utilización de un kit comercial, pero parece ser la más sensible de las técnicas examinadas: 100 p. 100 de las muestras fueron positivas a partir de 2 parásitos/ml. Sin embargo, la lectura de los resultados puede ser delicada. Estas dos técnicas permiten realizar un diagnóstico sensible y específico de las infecciones activas del ganado por *T. vivax*. La evaluación deberá llevarse a cabo para las otras especies de tripanosomas patógenos del ganado.

Palabras clave: *Trypanosoma vivax* - Reacción de cadenas de polimerasa - Ovino - Ganado - Centrifugación - Plasma sanguíneo - Diagnóstico - Guyana francesa.

Présentation de thèse :

Etude des relations parasites-hôtes dans l'épidémiologie moléculaire des trypanosomoses bovines au Burkina Faso

□ Les trypanosomoses animales représentent encore une contrainte majeure au développement de l'élevage dans les zones tropicales, en particulier en Afrique subsaharienne où elles sont transmises par les glossines. Progresser dans la lutte contre ces hémoprotozooses implique une connaissance approfondie de l'épidémiologie de ces maladies et des caractéristiques biologiques des espèces impliquées.

Les parasitologistes connaissent une trentaine d'espèces différentes de glossines et quatre espèces principales de trypanosomes pathogènes (*T. congolense*, *T. vivax*, *T. brucei*, *T. simiae*). Or les techniques de la biologie moléculaire, comme l'indique J.-M. Reifenberg dès l'introduction de sa thèse, ont entièrement renouvelé la classification et l'identification des trypanosomes. L'auteur a donc choisi comme sujet de recherches le groupe de trypanosomes considérés comme les plus pathogènes pour le bétail africain et celui pour lequel la biologie moléculaire a apporté les outils les plus diversifiés : le complexe *T. congolense*.

Après une très bonne revue des connaissances actuelles sur la transmission des trypanosomes africains, J.-M. Reifenberg présente les techniques de PCR (*polymerase chain reaction*) et d'hybridation moléculaire qu'il a utilisées pour la détection et l'identification des trypanosomes chez leurs hôtes vertébrés et invertébrés, en conditions expérimentales et naturelles. Les deux objectifs principaux de l'auteur sont :

1. Simplifier les protocoles existants pour une utilisation dans les conditions «du terrain» des techniques moléculaires de caractérisation des trypanosomes chez les glossines et leurs hôtes vertébrés ;
2. Evaluer précisément le domaine d'utilisation de ces biotechnologies.

Les résultats obtenus montrent que la PCR constitue un moyen très efficace pour détecter les infections mixtes et les pauci-infections dans les organes des vecteurs et chez l'hôte vertébré. Cependant, l'auteur garde un esprit très critique et souligne que cet outil doit être utilisé avec prudence sur le terrain car il nécessite de multiples précautions. La princi-

pale limitation est la non reconnaissance par les marqueurs moléculaires connus de certains trypanosomes, détectable par la parasitologie classique.

Au laboratoire, la technique PCR a permis d'étudier en particulier :

- Les relations d'affinité parasites-vecteurs suggérées par certaines observations sur le terrain. L'affinité entre les glossines du groupe *morsitans* et le *T. congolense* de type «savane» a été confirmée : les espèces savaniques de glossines sont significativement plus infectées (en nombre d'individus), et plus massivement (en nombre de parasites), que les espèces riveraines. En revanche, bien que *Glossina palpalis gambiensis* montre le plus fort taux d'infection intestinale, l'hypothétique affinité entre les glossines riveraines et le type «forêt» apparaît de manière beaucoup moins forte. L'auteur est tout à fait conscient que d'autres facteurs (type d'hôte vertébré, disponibilité en nourriture, diversité des parasites ingérés au cours des différents repas sanguins, température, etc.) peuvent influencer la spécificité vectorielle et engage une discussion critique sur ce point.

- L'émission parasitaire de *Glossina tachinoides* expérimentalement infectée par *T. congolense* (type «savane»), pour mieux définir le rôle de cette espèce dans l'épizootologie des trypanosomoses animales. Dans l'expérience de J.-M. Reifenberg, la technique PCR appliquée sur les proboscis a confirmé dans tous les cas les résultats parasitologiques. Elle n'a pas apporté d'information supplémentaire permettant d'étayer l'hypothèse du manque de fiabilité des examens parasitologiques classiques. En revanche, d'autres auteurs ont montré la plus grande sensibilité de la PCR dans le cas de l'examen de l'intestin moyen. J.-M. Reifenberg a observé une grande variabilité intra et inter-individuelle dans l'émission parasitaire. Il insiste sur le fait qu'il s'agit là de résultats obtenus au laboratoire dans des conditions artificielles. Dans les conditions naturelles, d'autres facteurs très nombreux, liés à la glossine, aux hôtes et au milieu, interviennent.

Le dernier chapitre avant la conclusion, intitulé «Applications à l'épidémiologie», rapporte l'analyse par PCR d'une série d'isolats (stabilats), en provenance de zones d'enzootie du Burkina Faso. Les résultats montrent clairement l'intérêt de la PCR, par rapport aux techniques parasitologiques classiques, en caractérisant les trypanosomes au niveau «subspécifique» (taxons morphologiquement identiques) et en mettant en évidence les infections mixtes. La présence de *T. congolense* type «forêt» avait été rarement signalée chez des bovins avant ce travail. J.-M. Reifenberg utilise ensuite les techniques moléculaires à l'occasion d'une vaste enquête épidémiologique menée par le CIRDES¹

dans la Province de la Sissili (zone pastorale de Yallé) au Burkina Faso. Parmi les résultats principaux obtenus, on peut noter les faits suivants :

- Près de 40 p. 100 des trypanosomes observés au microscope ne sont pas caractérisés par les sondes actuellement disponibles ;

- J.-M. Reifenberg a pu ébaucher deux cycles présumés de transmission des trypanosomes chez *G. tachinoides* et les animaux de la zone pastorale de Yallé : un cycle sauvage avec *T. congolense* types «forêt» et «savane», *T. simiae*, *T. vivax* et des trypanosomes inconnus avec le phacochère et/ou le guib comme réservoirs, un cycle domestique chez les bovins avec *T. congolense* type «savane» et *T. vivax*.

Dans sa conclusion générale, J.-M. Reifenberg a synthétisé l'ensemble de ses résultats dans un schéma précisant les relations d'affinité entre les taxons «savane» et «forêt» de *T. congolense* et les espèces de glossines en fonction de leur habitat. Ce schéma, reliant l'écologie des vecteurs et l'écologie des parasites, devrait rester dans les annales de la Parasitologie.

L'importance des résultats scientifiques obtenus, la présentation remarquable du mémoire et les perspectives nouvelles ouvertes par ce travail pionnier en «**épidémiologie moléculaire**» des trypanosomoses, ont valu à Jean-Marc Reifenberg la mention très honorable avec les félicitations du jury.

Notons enfin que ce travail est le fruit d'une collaboration active entre le CIRAD-EMVT, le CIRDES à Bobo-Dioulasso et le département Santé de l'ORSTOM² à Montpellier. Dominique Cuisance du CIRAD-EMVT, Gérard Cuny de l'ORSTOM à Montpellier et Saydil M. Touré, Directeur du CIRDES ont apporté leurs connaissances et leur soutien au travail de Jean-Marc Reifenberg. Une collaboration s'est également instituée dans le cadre de ce travail, avec l'ILRI³ (P.A.O. Majiwa) et l'Université de Bristol⁴ (W. Gibson). Qu'ils en soient tous ici remerciés.

Gérard DUVALLET
CIRAD-EMVT

1. CIRDES : Centre international de recherche-développement sur l'élevage en zone sub-humide, 01 BP 454, Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

2. ORSTOM : Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France

3. International Livestock Research Institute, PO Box 30709, Nairobi, Kenya

4. Département de Pathologie et Microbiologie, Université de Bristol, Royaume Uni

Reifenberg J.-M., 1996. Etude des relations parasites-hôtes dans l'épidémiologie moléculaire des trypanosomoses bovines au Burkina Faso. Thèse doct. en Biologie des systèmes intégrés, agronomie, environnement, Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France, 172 p.

Laboratory bioassays of deltamethrin, topically applied, during the hunger cycle of male *Glossina tachinoides*

P. Van den Bossche^{1*}

Key words

Glossina tachinoides - Deltamethrin - Nutrition - Pest control method - Topical application - Laboratory experimentation - Insecticide.

Summary

The susceptibility of mature and immature male *Glossina tachinoides* to topically applied deltamethrin was tested on successive days of their hunger cycle. Both in mature and immature flies, significant changes in tolerance were observed correlated to the digestion of the bloodmeal. In mature tsetse, the fly's fat level is also correlated to its susceptibility.

■ INTRODUCTION

The majority of tsetse control measures rely on the use of insecticides. The success of such control campaigns partly depends upon the tsetse's susceptibility to the insecticide used. One well known factor, affecting the susceptibility of female tsetse to insecticides, is associated with pregnancy (2, 17).

In male and female *Glossina palpalis palpalis*, the presence of undigested blood in the abdomen also affects their tolerance to several insecticides (18). Moreover, other studies (22) have indicated that replete male *G. tachinoides*, when brought into contact with a deltamethrin dipped guinea-pig, were also more susceptible than hungry ones. Similar observations were made in mosquitoes (10). Although the mechanism is not well understood, these findings suggest that susceptibility to deltamethrin is influenced by the feeding status of the insect.

Tsetse flies feed, at regular intervals, on the blood of vertebrates. The period between two consecutive blood meals, during which the blood meal is metabolized, is called the hunger cycle (5, 12). Clear differences, however, exist between blood meal metabolism in mature and immature male tsetse flies. In young or immature tsetse, the energy obtained from each blood meal is used for growth or maturation. This early growth phase is associated with the maturation of the flight system, the incorporation of new material in the cuticle and the gradual accumulation of a body fat reserve. In mature male tsetse, on the other hand, the body fat reserve undergoes significant changes during each hunger cycle. The net gain of fat from each blood meal is spent for resting metabolism, flight activity or spermatophore production (19).

This paper reports the toxicity of topically applied deltamethrin, a synthetic pyrethroid widely used in tsetse control, to mature and immature male *G. tachinoides* and tries to relate changes in the susceptibility to physiological changes during the male tsetse fly hunger cycle.

■ MATERIALS AND METHODS

Tsetse flies

Immature male *G. tachinoides* (at most 24 hours old) and mature male *G. tachinoides* (20 days old) were used in the experiments. They were maintained in the routine, guinea-pig fed, colony at the Veterinary Department of the Institute of Tropical Medicine in Antwerp, Belgium. They were kept in standard oblong cages (160 x 70 x 80 mm) at a maximum density of 30 flies per cage at $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and $76 \pm 5\%$ RH (21).

Mature male *G. tachinoides* were fed daily (except during weekends) on guinea-pigs, and received a last blood meal on day 20. Only fully engorged flies were retained and used for testing.

Immature flies had a feeding chance 24 h after emergence. Here also, only the fully engorged flies were used for testing.

An artificial hunger cycle was created by starving both mature and immature flies for 1 to maximum 5 days following the last blood meal.

Insecticide treatment

Technical deltamethrin (Roussel Uclaf) dissolved in 2-ethoxyethanol (Cellosolve®, BDH Ltd.) was administered to the flies, after immobilization with nitrogen gas, by topical application to the dorsal surface of the thorax. Each fly received $0.5 \mu\text{l}$ 2-ethoxyethanol containing 0.08 ng of deltamethrin by means of an Arnold Hand Applicator (Burkard Manufacturing Co.

1. Institute of Tropical Medicine, Veterinary Department, Nationalestraat 155, 2000 Antwerpen, Belgium

* Current address: Regional Tsetse and Trypanosomosis Control Programme, PO Box A560, Avondale, Harare, Zimbabwe

Ltd.). Different batches of 40 mature male *G. tachinoides* were topically treated once on one of the successive days of their hunger cycle: day 0, 1, 2, 3, 4 or 5. Day 0 being the day of the last blood meal. Treatment on day 0 was done immediately after the blood meal uptake. Groups of at least 54 immature males *G. tachinoides* were also topically treated on one of the days of their hunger cycle (day 0, 1, 2, 3 or 4). The test was repeated for immature flies, starved during 1 or 4 days but fed just before treatment.

Batches of mature and immature male control flies were handled similarly as described above receiving the solvent only. Mortality was recorded 24 and 48 h after treatment. During this period flies were not fed. Mortality among treated flies was corrected in comparison with the mortality observed in the control group according to the formula of Abbott (1).

Determination of changes in fat level during the hunger cycle

The technique described by Bursell (3) was used. Fat was extracted from dry flies using chloroform. Groups of 40 mature and immature male *G. tachinoides* were offered a blood meal on a guinea-pig. The fully engorged flies were retained and starved as described above. Their fat level was determined on the successive days of the hunger cycle.

■ RESULTS

Mortality of immature flies

The mortality and corrected mortality of immature male *G. tachinoides* treated topically with deltamethrin (0.08 ng/fly) on day 0, 1, 2, 3 or 4 of the hunger cycle is presented in table I.

Mortality when immature male *G. tachinoides*, starved as described above, were fed just before topical treatment with deltamethrin (0.08 ng/fly) on day 1 or 4 of their hunger cycle is shown in table II.

Table I clearly shows that mortality of immature flies increased with increasing starvation. If, however, flies were fed just before treatment mortality was significantly lower (table II).

Mortality of mature flies

The mortality and corrected mortality of mature male *G. tachinoides*, treated topically with deltamethrin (0.08 ng/fly), on one of the days of the hunger cycle are presented in table III.

Similarly to immature male flies, mortality in mature male flies increased when treatment was done later in the hunger cycle. For each of the days of the hunger cycle mortality of mature flies was lower than mortality of immature flies.

Fat level of mature and immature male *G. tachinoides* during the hunger cycle

The fat level of mature male *G. tachinoides* on successive days of the hunger cycle is presented in table IV.

The fat level of immature male *G. tachinoides* changed little during the first hunger cycle and had an average value of 0.48 ± 0.12 mg.

The fat level of mature male *G. tachinoides* on consecutive days of the hunger cycle, expressed as a percentage of the body weight, is presented in figure 1.

Fat level dynamics during the hunger cycle (figure 1) consisted of a short phase of lipogenesis, followed by a phase of lipolysis. A similar pattern was observed by Bursell *et al.* (5).

Table I
Mortality and corrected mortality of immature male *G. tachinoides* after a single treatment with deltamethrin (0.08 ng/fly) on one of the days of their hunger cycle

Day of hunger cycle	Flies		Mortality after 24 h (%)		Total mortality after 48 h (%)		%Corrected mortality	
	Control	Treated	Control	Treated	Control	Treated	24 h	48 h
0	60	60	0 (0)	12 (20.0)	4 (6.7)	16 (26.7)	20.0	21.4
1	54	54	0 (0)	0 (0)	0 (0)	9 (16.7)	0	16.7
2	54	60	6 (11.1)	8 (13.3)	6 (11.1)	16 (26.7)	2.5	17.4
3	60	60	0 (0)	36 (60.0)	0 (0)	40 (66.7)	60.0	66.7
4	70	60	20 (28.6)	56 (93.3)	20 (28.6)	60 (100)	90.6	100

Table II
Mortality and corrected mortality of immature male *G. tachinoides* starved as described above and fed just before topical treatment with deltamethrin (0.08 ng/fly)

Day of hunger cycle	Flies		Mortality after 24 h (%)		Total mortality after 48 h (%)		%Corrected mortality	
	Control	Treated	Control	Treated	Control	Treated	24 h	48 h
1	45	53	0 (0)	4 (7.5)	0 (0)	4 (7.5)	7.5	7.5
4	60	51	0 (0)	24 (47.0)	0 (0)	27 (52.9)	47.0	52.9

Table III

Mortality and corrected mortality of mature male *G. tachinoides* after a single treatment with deltamethrin (0.08 ng/fly) on one of the days of their hunger cycle

Day of hunger cycle	Flies		Mortality after 24 h (%)		Total mortality after 48 h (%)		% -Corrected mortality	
	Control	Treated	Control	Treated	Control	Treated	24 h	48 h
0	40	40	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0	0
1	40	40	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0	0
2	40	40	0 (0)	4 (10.0)	2 (5.0)	8 (20.0)	10.0	15.8
3	40	40	0 (0)	8 (20.0)	0 (0)	12 (30.0)	20.0	30.0
4	40	40	0 (0)	10 (25.0)	0 (0)	16 (40.0)	25.0	40.0
5	40	40	4 (10.0)	10 (25.0)	8 (20.0)	30 (75.0)	16.7	68.7

Table IV

Mean body weight, mean dry weight, mean residual dry weight and mean fat level of mature male *G. tachinoides* on successive days of the hunger cycle

Day of hunger cycle	Number of flies	Mean body weight (mg)	Mean dry weight (mg)	Mean residual dry weight (mg)	Mean fat level (mg)
0	40	19.20 ± 2.34	6.84 ± 1.52	3.67 ± 0.58	2.64 ± 0.59
1	40	15.60 ± 2.10	6.15 ± 1.14	3.61 ± 0.55	2.44 ± 0.87
2	40	13.95 ± 1.85	5.27 ± 1.06	3.56 ± 0.45	1.71 ± 1.04
3	40	11.38 ± 1.63	4.88 ± 0.96	3.56 ± 0.34	1.32 ± 0.78
4	40	12.11 ± 1.84	4.30 ± 0.97	3.31 ± 0.49	0.99 ± 0.72
5	40	12.03 ± 2.16	4.21 ± 1.34	3.15 ± 0.54	0.84 ± 1.03

DISCUSSION

Mortality of immature male *G. tachinoides* (table I) shows the high level of tolerance to topically applied deltamethrin when treatment is done shortly after feeding. Once the blood meal is being digested and excreted, 4 days after the blood meal uptake (12), mortality increases up to 100 % (table I). Moreover, independently of the degree of starvation, the uptake of a blood meal prior to treatment decreases mortality by about 50 % (table II). These observations clearly show the protective role of the blood meal which is attributed to the high amount of non-target tissue diverting the insecticide to sites of 'non lethal action' (18).

Increasing susceptibility to deltamethrin, on successive days of the hunger cycle, in mature male *G. tachinoides* (table III) could partly be explained in a similar way. Mortality is significantly negatively correlated to the average corrected residual dry weight, reflecting the gradual excretion of the bloodmeal on the successive days of the hunger cycle. However, this correlation cannot explain the general lower susceptibility of mature flies compared to immature flies. The latter is attributed to a supplementary non-target tissue in mature male tsetse, i.e. the body fat reserve. Compared to immature tsetse flies, fat level in mature flies

Figure 1: Changes in the fat reserve during the hunger cycle of mature male *G. tachinoides*.

The correlation between fat level and mature male mortality, 48 h after the application of deltamethrin (table III), was highly significant ($r = -0.95$, $p < 0.01$). A similar negative correlation ($r = -0.995$, $p < 0.01$) was obtained between mature male mortality, 48 h after the application of deltamethrin (0.08 ng/fly) and their average residual dry weight on the corresponding days.

undergoes considerable changes during the hunger cycle (figure I) and is significantly negatively correlated to the mature male fly susceptibility to topically applied deltamethrin on the respective days. This observation gives supportive evidence of the supplementary role of the fat body in the mature male tsetse fly susceptibility to topically applied deltamethrin. It is assumed that the high tolerance of flies with a higher fat body level is due to the accumulation of deltamethrin in the fat. Equally in the cockroach, *Periplaneta americana*, the progressive accumulation of pyrethroids in the fat body with simultaneous decreasing efficacy of the insecticide has been observed (6). Whether this observation is applicable to other insecticides is not yet known and merits further investigation. Although, it will probably be restricted to highly liposoluble insecticides such as deltamethrin.

These observations might have practical implications.

Both Golder (8, 9) and Nitcheman (15, 16) observed that male and female *G. morsitans morsitans* harboring metacyclic trypanosomes were more susceptible to topically applied endosulfan, pyrethrum and deltamethrin than non-infected flies. This could be related to our observations. It is known that metacyclic trypanosomes interfere with the normal function of the labial mechanoreceptors (11, 13, 14) causing a higher probing frequency without increase in feeding frequency. Moreover, an infected tsetse may experience a significant daily energy loss as a result of the competition between parasites and vectors for metabolic substrates (4). The infected tsetse impaired feeding ability and the high energy requirements of the trypanosomes may result in a poor nutritional status and thus lower fat body level. This was observed by Ryan (20) in *G. longipalpis* and could be the reason for the increased susceptibility to deltamethrin of infected tsetse. Deltamethrin is extensively used in tsetse control. According to the results in this study the efficacy of such control operations could be largely affected by the average fat level of the tsetse population or the fat level of the flies attracted to the deltamethrin-treated baits. Moreover, since the fat level in tsetse changes seasonally (7), mortality caused by deltamethrin application could be significantly higher in seasons when fat level is lowest.

Acknowledgements

The author wishes to thank Drs. R. De Deken and A. Van der Vloedt for their helpful discussion and comments on the manuscript. Professor J. Mortelmans is thanked for his help in various ways.

REFERENCES

1. ABBOTT W.B., 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, **18**: 265
2. BURNETT G.F., 1962. The susceptibility of tsetse flies to topical application of insecticides - III. The effects of age and pregnancy on the susceptibility of adults of *Glossina morsitans* Westwood. *Bull. entomol. Res.*, **53**: 337-345.
3. BURSELL E., 1966. The nutritional state of tsetse flies from different vegetation types in Rhodesia. *Bull. entomol. Res.*, **57**: 171-180.
4. BURSELL E., 1981. Energetics of haematophagous arthropods: influence of parasites. *Parasitology*, **82**: 107-108.
5. BURSELL E., BILLING K.C., HARGROVE J.W., MCCABE C.T., SLACK E., 1974. Metabolism of the bloodmeal in tsetse flies. *Acta Trop.*, **31**: 297-320.
6. CARLE P.R., 1987. Mode d'action et utilisation des pyrèthrinoides. In : Insectes, insecticides, santé. Angers, France, Groupe Roussel Uclaf, p. 225-245.
7. GLASGOW J.P., BURSELL E., 1960. Seasonal variations in the fat content and size of *Glossina swynnertoni* Austen. *Bull. entomol. Res.*, **51**: 705-713.
8. GOLDER T.K., OTIENO L.H., PATEL N.Y., ONYANGO P., 1982. Increased sensitivity to endosulfan of *Trypanosoma*-infected *Glossina morsitans*. *Ann. trop. Med. Parasitol.*, **76**: 483-484.
9. GOLDER T.K., OTIENO L.H., PATEL N.Y., ONYANGO P., 1984. Increased sensitivity to a natural pyrethrum extract of *Trypanosoma*-infected *Glossina morsitans*. *Parasitology*, **41**: 77-79.
10. HADAWAY A.B., BARLOW F., 1956. Effects of age, sex and feeding on the susceptibility of mosquitoes to insecticides. *Ann. trop. Med. Parasitol.*, **50**: 438-443.
11. JENNI L., MOLYNEUX D.H., LIVESEY J.L., GALUN R., 1980. Feeding behaviour of tsetse flies infected with salivarian trypanosomes. *Nature*, **283**: 383-385.
12. LANGLEY P.A., 1966. The effect of environment and host type on the rate of digestion in the tsetse fly *Glossina morsitans* Westwood. *Bull. entomol. Res.*, **57**: 39-48.
13. MOLYNEUX D.H., 1991. Influence of parasites on acquisition of blood meals by haematophagous arthropods: possible effects on spread of disease. *Parasitology*, **82**: 104
14. MOLYNEUX D.H., JEFFERIES D., 1986. Feeding behaviour of pathogen-infected vectors. *Parasitology*, **92**: 721-726.
15. NITCHEMAN S., 1990. Comparison of the susceptibility to deltamethrin of female *Glossina morsitans morsitans* Westwood, 1850 (Diptera: Glossinidae) uninfected and infected with *Trypanosoma congolense* Broden, 1904 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). *Ann. trop. Med. Parasitol.*, **5**: 483-491.
16. NITCHEMAN S., CHALLIER A., CARLE P.R., CLAIR M., 1988. Effects of sublethal doses of deltamethrin on the pair: *Glossina morsitans morsitans* - *Trypanosoma congolense*. *C. R. Acad. Sci., Ser. III Sci. Vie*, **307**: 423-426.
17. RIORDAN E.K., 1987. Insecticide tolerance of pregnant females of *Glossina palpalis palpalis* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Glossinidae). *Bull. entomol. Res.*, **77**: 213-226.
18. RIORDAN E.K., GREGORY G., 1985. Toxicity of insecticides to the tsetse fly, *Glossina palpalis palpalis*, in Nigeria and comparison of tolerance in 1974-1975 and 1979-1982. *Trop. Pest Manage.*, **31** (4): 264-272.
19. ROGERS D.J., RANDOLPH S.E., 1978. Metabolic strategies of male and female tsetse (Diptera: Glossinidae) in the field. *Bull. entomol. Res.*, **68**: 639-654.
20. RYAN L., 1984. The effect of trypanosome infection on a natural population of *Glossina longipalpis* in Ivory Coast. *Acta Trop.*, **41**: 355-359.
21. VAN DEN BOSSCHE P., VAN HEES J., 1989. A simple and cheap method for breeding of tsetse flies. *Tropicicultura*, **7** (2): 60-62.
22. VAN DEN BOSSCHE P., VAN HEES J., MORTELMANS J., 1987. Observations of the remnant effect of deltamethrin acaricide liquid on tsetse flies under laboratory conditions. In: Proc. 19th meeting ISCTRC, Lome, Togo, Nairobi, Kenya, OAU/STRC., p. 422-424.

Reçu le 18.9.96, accepté le 25.2.97

Résumé

Van den Bossche P. Etude en laboratoire de l'application topique de la deltaméthrine pendant le cycle nutritionnel des mâles de *Glossina tachinoides*

La sensibilité des mâles matures et immatures de *Glossina tachinoides* aux applications topiques de deltaméthrine a été testée sur plusieurs jours successifs de leur cycle nutritionnel. Des variations significatives à la tolérance de la deltaméthrine chez les mâles matures et immatures ont été observées en corrélation avec la digestion du repas sanguin. Chez les mouches tsé-tsé matures, le pourcentage de graisse est également corrélé à cette sensibilité.

Mots-clés : *Glossina tachinoides* - Deltaméthrine - Nutrition - Méthode de lutte antiparasite - Application locale - Expérimentation en laboratoire - Insecticide.

Resumen

Van den Bossche P. Bioanálisis de laboratorio de la deltametrina, aplicada en forma tópica, durante el «ciclo de hambre» del macho de la *Glossina tachinoides*

Se analizó la susceptibilidad de machos maduros e inmaduros de *Glossina tachinoides*, a la deltametrina aplicada en forma tópica, en días sucesivos del «ciclo de hambre». En el caso de ambas moscas, maduras e inmaduras, se observaron cambios significativos en la tolerancia, correlacionados con la digestión de la sangre utilizada para la alimentación. En las tsetse maduras, el nivel de materias grasas de la mosca se encuentra igualmente correlacionado con la susceptibilidad.

Palabras clave : *Glossina tachinoides* - Deltametrina - Nutrición - Método de control de plagas - Aplicación local - Experimentación en laboratorio - Insecticida.

Note de lecture :

***Brachiaria:* Biology, Agronomy, and Improvement**

□ Cet excellent ouvrage de référence en langue anglaise reproduit les actes de l'atelier international qui s'est tenu du 3 au 7 octobre 1994 au CIAT de Colombie, et fait le bilan des connaissances actuelles sur la graminée *Brachiaria*. Une étude morphologique permet de regrouper 97 espèces du genre *Brachiaria* (originaires d'Afrique, d'Asie, d'Amérique, d'Australie et des Indes) en 9 groupes, bien que 14 espèces restent isolées. La morphologie de l'inflorescence, et plus particulièrement celle de l'épillet qui a été examinée en détail, a permis d'observer une grande variation au sein du genre. La proximité du genre *Brachiaria* avec d'autres genres comme *Urochloa* et *Panicum* est aussi discutée. L'histoire des cultivars commercialisés, *B. erecta*, *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. humidicola*, *B. mutica* et *B. ruziziensis*, est décrite en même temps que leurs caractères principaux. Cette description, où l'origine biogéographique des principales espèces est reprise ainsi que la variation des caractères morphologiques et des isoenzymes, est complétée par celle des plus grandes collections *ex situ* existantes.

La deuxième partie de l'ouvrage est plutôt agronomique et rassemble toutes les informations disponibles sur les caractères physiologiques et agronomiques des différentes espèces du genre comme l'adaptation à l'ombre, à la sécheresse, à l'inondation, à l'association avec des légumineuses.... Une des caractéristiques des espèces du genre *Brachiaria* est leur tolérance aux sols peu fertiles des tropiques. Cette tolérance est expliquée à travers la capacité des espèces à maintenir un fort développement racinaire, à pouvoir utiliser l'azote à la fois sous forme de nitrates et sous forme am-

moniacale, à profiter de l'azote fixé par les légumineuses et à valoriser au mieux le phosphore et le calcium. L'effet des carences minérales y est étudié sur *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk.

Depuis 1960, 50 à 70 millions d'hectares de savanes naturelles ont été plantées en *Brachiaria* sp. en Amérique tropicale. Si la production de biomasse était élevée au départ, elle tend à baisser maintenant. La principale cause de cette baisse est attribuée au piégeage de l'azote dans la litière que forme le paillage au sol, ce qui rend la fumure minérale moins rentable et nécessite l'introduction de légumineuses. Toutefois l'impact sur l'environnement est toujours considéré comme positif du fait de la couverture au sol qui facilite l'infiltration des eaux de pluies, limite l'érosion et le lessivage. La fixation de l'azote atmosphérique dans les associations *Brachiaria*-légumineuses est considérée comme un facteur de pérennité du pâturage.

L'aspect maladies et insectes nuisibles des *Brachiaria* est aussi traité. Les maladies virales, surtout mosaïque du *Panicum maximum*, et cryptogamiques, principalement l'ergot, sont essentiellement présentes en Afrique. Parmi les insectes prédateurs on trouve principalement ceux du genre *Scaptocoris* (Brésil, Colombie), des fourmis coupeuses de feuilles, des termites ou encore *Spodoptera frugiperda*, *Mocis latipes*, *Antonina graminis*, *Blissus leucopterus*.

Du point de vue de la valeur alimentaire, on remarque de très bonnes digestibilités *in vitro*, de 73 p. 100 (MS) à 3 semaines de repousse, à 55 p. 100 (MS) à 12 semaines, sur des pâturages bien fertilisés. Toutefois la variation de la valeur alimentaire semble être influencée par l'espèce. On note aussi des phénomènes de photosensibilisation des animaux qui pâturent uniquement du *Brachiaria* sp. La présence de saponines pourrait être une explication. Une toxicité aux nitrates aurait été observée.

Une troisième partie traite de la production de semences qui, du fait de l'influence de la photopériode sur l'induction florale, se fait plus facilement aux latitudes élevées des tropiques. Les méthodes de multiplication de semences décrites insistent sur

l'importance des rendements semenciers car, selon qu'elles sont plus ou moins bien maîtrisées, les rendements peuvent chuter de 1 000 kg/ha à 100 kg/ha. Du point de vue physiologique, la qualité des semences dépend beaucoup de la maturité (qui détermine la vitalité), mais une forte dormance touche toutes les espèces du genre. Les travaux génétiques et cytogénétiques menés depuis dix ans sur *Brachiaria* ont permis la création de *B. ruziziensis* tétraploïdes sexués, et des recombinaisons génétiques sont maintenant possibles entre *B. ruziziensis*, *B. brizantha* et *B. decumbens*. Des essais sont menés pour l'obtention de lignées apomictiques. Depuis 15 à 20 ans l'industrie semencière brésilienne s'est développée et produit des semences de *Brachiaria*. L'ouvrage aborde l'histoire de ce développement et les perspectives d'avenir de cette industrie semencière brésilienne avec tous les problèmes que cela entraîne.

Une dernière partie évalue les possibilités que représentent les biotechnologies pour les multiplicateurs. Les manipulations génétiques sont envisagées comme la source future de la variation à l'intérieur du taxon. Enfin l'ouvrage se termine sur des exemples d'utilisation des *Brachiaria* à travers le monde.

Gilles MANDRET
CIRAD-EMVT

Miles J.W., Maass B.L., do Valle C.B., 1996. *Brachiaria* : Biology, Agronomy, and Improvement. Cali, Colombie, CIAT et Campo Grande, Brésil, EMBRAPA, 288 p.

ERRATA

Revue Elev. Méd. vét. Pays trop., 1996, 49 (1), p. 38 : le nom du 3^e auteur est A. Gitego.

Revue Elev. Méd. vét. Pays trop., 1996, 49 (3), p. 245 : the formula under "Milk" in "Costs and returns of the crop-cattle system in the Western Province of Zambia" should read:

Nbr. of adult cows present x calving rate x (1-0.5) abortion rate x price x 167.

Intérêt fourrager de *Calliandra calothyrsus* en altitude à la Réunion

G. Mandret ^{1*} J. Tassin ²

Mots-clés

Calliandra calothyrsus - Plante d'abrouissement - Caprin - Valeur nutritive - Ingestion de substances nutritives - Tannins - Espacement - Provenance - Polyculture-élevage - Réunion.

Résumé

L'étude consiste à évaluer l'intérêt fourrager et alimentaire d'une haie de *Calliandra calothyrsus* dans le cadre de systèmes diversifiés polyculture-élevage dans les «Hauts» de la Réunion. Le comportement agronomique de la haie met en évidence l'intérêt d'un écartement à 0,70 m et d'une fumure phosphopotassique ainsi que la supériorité de la provenance San Ramon (Costa Rica). La valorisation par les caprins est intéressante pour des repousses âgées de trois mois du fait de teneurs en tannins faibles et d'un bon rapport feuilles/tiges. Dans le cadre des systèmes diversifiés et notamment dans le remodelage de l'agriculture des Hauts de l'Ouest de la Réunion, l'agroforesterie fourragère a sa place. L'installation de haies fourragères de *Calliandra calothyrsus* présente de nombreux avantages dont notamment celui d'une meilleure infiltrabilité de l'eau sous la haie (+ 400 p. 100).

■ INTRODUCTION

A la Réunion les systèmes de production sont divers, surtout en zone d'altitude dite des «Hauts». L'enclavement et les conditions naturelles difficiles (sols à caractère andique, pluviométrie annuelle mal répartie, pente, érosion...) aggravées par des pratiques culturales érosives sont des contraintes majeures pour le développement.

Dans les Hauts de l'Ouest, entre 700 m et 1 000 m d'altitude, le déclin de la culture du géranium rosat a rompu un équilibre. L'apparition de nouveaux systèmes de culture bouleverse le paysage et les habitudes de cette partie de l'île, d'autant qu'ils nécessitent souvent une plus grande technicité. Le développement des Hauts de l'Ouest étant dépendant des contraintes du milieu (hiver froid et sec, risques érosifs accentués par les fortes pentes, superficies des parcelles très réduites), un remodelage de l'activité agricole ne peut se concevoir que par la mise au point de modes de gestion des exploitations qui favorisent la protection et le maintien d'un équilibre durable entre le sol, la plante et l'activité économique.

Les travaux menés par le CIRAD en collaboration avec l'ONF ont démontré l'intérêt des haies fourragères arbustives pour la protection contre l'érosion (10). Il convenait d'évaluer l'intérêt fourrager de ces haies dans des systèmes où l'animal peut être une des clés de la valorisation : consommateur indispensable du fourrage produit, producteur de fumier pour les cultures et source de trésorerie.

L'étude a porté sur *Calliandra calothyrsus*, espèce fourragère dont l'intérêt s'est accru avec la destruction des haies de *Leucaena leucocephala* par un psylle (*Heteropsylla cubana*), dès 1992. Originaire d'Amérique centrale, cet arbuste s'acclimate en outre parfaitement aux conditions pédo-climatiques des hauts de la Réunion.

■ MATERIEL ET METHODES

Production fourragère

Choix des provenances

Trois provenances de *Calliandra calothyrsus* (Piedades, Costa Rica ; San Ramon, Costa Rica ; Kanyosha, Burundi) ont été testées en haies (écartement pied-à-pied : 50 cm), puis coupées au bout d'un an à une hauteur de 50 cm. Les relevés ont porté pour chacune de ces provenances sur l'importance de la ramification d'une part (nombre de tiges par pied, nombre de bourgeons par tige) et la production de matière sèche foliaire d'autre part.

Les pesées et les observations ont porté, pour chaque provenance, sur un ensemble de 25 pieds contigus dans une même haie.

Choix de l'écartement en banque fourragère

Un essai en banque fourragère a été conduit sur trois provenances de *Calliandra calothyrsus* (Suchitepequez, Guatemala ; Kanyosha, Burundi ; Moroni, Comores) en vue d'obtenir des références sur l'écartement à préconiser pour ce type d'aménagement. Le dispositif utilisé est un plan factoriel pour lequel deux écartements sont testés : 70 et 100 cm. Pour des raisons d'accessibilité à l'intérieur de la banque fourragère, il n'a pas été envisagé de travailler sur des écartements inférieurs à 70 cm.

1. CIRAD-EMVT, Ligne Paradis, 97410 Saint-Pierre, Réunion

2. CIRAD-FORET, Ligne Paradis, 97410 Saint-Pierre, Réunion

* CIRAD-EMVT, Campus international de Baillarguet, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

Fertilisation

Plusieurs doses d'engrais ont été testées à la plantation sur 250 m² répartis en 9 parcelles de 28 plants chacune :

- chaux magnésienne (CaO 57 p. 100, MgO 37 p. 100) à deux niveaux : 0 et 50 g/plant ;
- superphosphate (P₂O₅ 27 p. 100) à deux niveaux : 0 et 74 g/plant ;
- sulfate de potasse (K₂O 50 p. 100) à deux niveaux : 0 et 43,5 g/plant ;
- compost de géranium à deux niveaux : 0 et 460 g/plant.

Calliandra calothyrsus étant une mimosacée à *Rhizobium* (6) et fixant donc l'azote atmosphérique, aucun traitement n'envisage d'apport azoté.

L'élongation des rameaux (identifiés individuellement) a été mesurée sur chaque pied deux mois après la plantation.

Hauteur de coupe

Trois hauteurs de coupe (30, 50 et 70 cm) ont été testées sur deux provenances de *Calliandra calothyrsus* (Piedades, Costa Rica ; San Ramon, Costa Rica). Une première coupe a été réalisée 14 mois après la plantation, la seconde a été pratiquée 8 mois plus tard. Chaque hauteur de coupe a été effectuée sur 27 pieds et la biomasse produite pesée et séchée afin d'évaluer la production par pied et par mètre linéaire.

Valorisation par les caprins

Dans les systèmes diversifiés d'agriculture-élevage des Hauts de la Réunion, l'utilisation des caprins est presque générale. Ce type d'élevage présente l'avantage d'être plus facile à gérer pour un cultivateur qu'un troupeau de bovins et il permet une source de trésorerie plus facile à débloquent. Dans ces conditions et afin d'estimer les niveaux d'ingestion de la légumineuse *Calliandra calothyrsus* par des caprins, plusieurs rations à base de cette légumineuse ont été testées.

L'exploitation a été choisie en fonction de sa représentativité en zone traditionnelle de culture du géranium, c'est-à-dire une exploitation de polyculture-élevage possédant des cultures maraîchères, vivrières et fruitières ainsi qu'un troupeau caprin d'une centaine de têtes (croisés Boer/Pays).

La vocation de l'élevage sur cette exploitation est avant tout la production de fumier qui atteint 70 tonnes par an pour 10,5 ha de surface agricole utile dont 6,5 ha en prairies. Les essais se sont déroulés sur une période de deux mois consécutifs (juin-juillet 1993)

et trois types de ration ont été suivis successivement sur un lot homogène de cinq mâles adultes d'un poids vif moyen de 40 kg (tableau I).

Les rations testées comprenaient, comme dans la plupart des exploitations, du *Pennisetum purpureum* de provenances différentes (ce qui explique la variation en teneur sèche - tableau I) auquel du *Calliandra calothyrsus* a été rajouté en proportions variables (de 50 à 70 p. 100 des quantités de fourrage offertes). Quels que soient les régimes alimentaires, les éleveurs ont l'habitude de distribuer la même quantité de concentrés, ce qui a été reproduit dans l'essai. Les auteurs sont donc restés le plus près possible des pratiques paysannes.

Les observations ont porté sur les quantités d'aliments offertes, les quantités consommées par organe de plante (feuilles, tiges, écorce), le diamètre des tiges consommables. Les cendres, les matières azotées, la cellulose brute, les tannins précipitants (3) du *Calliandra calothyrsus* ont été dosées au laboratoire de nutrition du CIRAD EMVT. La dégradabilité enzymatique de la matière organique (2) y fut également mesurée.

RESULTATS ET DISCUSSION**Production fourragère****Choix des provenances**

Les résultats de l'essai «provenances» font apparaître que la provenance San Ramon (Costa Rica) assure une production de matière foliaire significativement plus élevée (au seuil de 5 p. 100) que les deux autres (tableau II).

Choix de l'écartement en banque fourragère

L'essai montre, pour les trois provenances utilisées (8), qu'il n'est pas opportun de préconiser un écartement supérieur à 0,70 m entre les pieds du point de vue de la production foliaire (tableau III). S'agissant ici de banques fourragères se présentant sous la forme de peuplements non linéaires, la production de matière sèche est exprimée en g/m².

Fertilisation

Sur andosol, à pH acide 5,5 et avec une légère déficience en phosphore assimilable, il semble qu'une fumure phosphopotassique (sans fumure azotée) accélère la croissance des plants :

- on observe un effet positif et significatif (P < 0,01) de l'application de phosphore sur l'élongation des tiges : les longueurs sont 25 p. 100 plus grandes avec la fumure phosphatée ;

Tableau I

Rations testées par bouc

Composition de la ration	Ration 1		Ration 2		Ration 3	
	kg MS	% MS	kg MS	% MS	kg MS	% MS
<i>Calliandra calothyrsus</i>	1,36	34	1,8	33	2,38	37
Canne fourragère (<i>Pennisetum purpureum</i>)	1,02	30**	0,7	22**	0,58	25**
Concentré C20*	0,38	86	0,38	86	0,38	86

* Aliment concentré pour chevreau à base de maïs, soja, coques de tournesol, mélasse et composé minéral vitaminé (UFL 0,95 ; PDIN 112 g/kgMS ; PDIE 111 g/kgMS ; PDIA 60 g/kgMS)

** Valeurs constatées résultant des pratiques de récolte du fourrage par l'éleveur sur des parcelles différentes

Tableau II

Ramification et production d'une haie de *Calliandra calothyrsus* âgée d'un an et rabattue à 50 cm

Provenances	NT/P	NB/T	NB/P	MSF g/m.l.
San Ramon (Costa Rica)	2,7	6,8	18,4	1 780
Kanyosha (Burundi)	1,7	8,0	13,6	1 290
Piedades (Costa Rica)	2,0	6,7	13,4	1 090

N : nombre ; T : tige ; MSF : matière sèche foliaire ; P : pied ; B : bourgeons non développés ; m.l. : mètre linéaire de plantation

Tableau III

Production foliaire de trois provenances de *Calliandra calothyrsus* utilisées en banque fourragère selon deux écartements (70 et 100 cm)

Provenance	Ecartement cm	MSF g/m ² 1 ^{ère} coupe	MSF g/m ² 2 ^e coupe
Suchitepequez (Costa Rica)	70	43	117
	100	23	79
Kanyosha (Burundi)	70	56	129
	100	38	88
Moroni (Comores)	70	59	68
	100	45	43

MSF : matière sèche foliaire

- de plus, il y a une interaction positive P-K ($P < 0,05$) dans la mesure où l'application conjointe de 43,5 g/plant de sulfate de potasse et de 74 g/plant de superphosphate augmente de 46 p. 100 l'élongation des tiges ;

- il y a également une interaction négative entre le calcium et le potassium, mais non significative. La fumure calcique semble avoir un effet négatif sur la croissance en présence de potasse ;

- on retrouve au niveau des teneurs en éléments minéraux une interaction positive P-K ($P < 0,05$). La fumure phosphopotassique entraîne une augmentation de 82 p. 100 des teneurs en potassium et de 11 p. 100 de celles en phosphore, par rapport au témoin.

Il est donc important d'appliquer une fumure phosphopotassique à la plantation. L'application de chaux et de compost de géranium ne semble rien apporter, voire avoir même un effet négatif sur *Calliandra calothyrsus* plantés dans des andosols.

Hauteur de coupe

La production de matière sèche foliaire ne laisse pas apparaître de différences significatives au seuil de 5 p. 100 pour les trois hauteurs de coupe pratiquées sur la provenance San Ramon (Costa Rica). Par contre, pour la provenance Piedades (Costa Rica), la production obtenue avec la coupe la plus basse (30 cm) reste significativement la plus élevée au seuil de 5 p. 100 (tableau IV).

Tableau IV

Production foliaire de deux provenances de *Calliandra calothyrsus* coupées à des hauteurs différentes après 14 mois de plantation (1^{ère} coupe) puis 8 mois plus tard (2^e coupe)

Provenance	Hauteur de coupe (cm)	MSF g/m.l. 1 ^{ère} coupe (g)	MSF g/m.l. 2 ^e coupe (g)
Piedades (Costa Rica)	30	173	125
	50	93	72
	70	106	87
San Ramon (Costa Rica)	30	137	106
	50	149	105
	70	117	116

L'ensemble de la production est resté faible sur cet essai, de fait installé sur un terrain non mis en valeur par l'agriculteur. La fertilité du sol y était inférieure à celle des parcelles agricoles de l'essai provenances (tableau II). Ceci explique les fortes différences de production entre les deux essais.

Valorisation par les caprins

Niveaux d'ingestion sur caprins

L'observation du comportement alimentaire de l'animal pour certains fourrages glanés dans la zone et pour *Calliandra calothyrsus* ont permis d'établir un ordre décroissant de préférence alimentaire (9) :

- *Ipomoea batatas* (lianes de patate douce),
- *Calliandra calothyrsus*, *Leucaena leucocephala* (cassi) et *Desmodium intortum*,
- *Pennisetum purpureum* (canne fourragère) et autres graminées,
- *Litsea glutinosa* (avocat marron),
- *Artemisia vulgaris* (herbe chinois),
- *Melia azedarach* (margosier).

Calliandra calothyrsus est presque totalement consommé, les refus n'étant constitués que par le bois des tiges d'un diamètre supérieur à 6 mm. En dessous de ce diamètre, la tige est entièrement ingérée.

Les repousses de canne fourragère âgées de 4 semaines sont ingérées en totalité, alors qu'à 8 semaines de repousse, seules les feuilles le sont. A ce stade, les refus sont intéressants pour la constitution du fumier.

Le fait d'être passé de 57 p. 100 (ration 1) à 62,5 p. 100 (ration 2) de *Calliandra calothyrsus* dans la ration a permis d'augmenter l'ingestion de ce fourrage de 50 p. 100 de l'ingéré total à 71 p. 100, sans dépasser ce taux quand on augmente l'apport de *Calliandra calothyrsus* jusqu'à 71 p. 100 de la ration (figure 1). Il semble donc que l'optimum d'une ration à base de *Calliandra calothyrsus* soit obtenu avec 60 p. 100 de ce fourrage dans la ration distribuée.

L'âge de repousse du *Calliandra calothyrsus* influe grandement sur son ingestion et sur la valeur alimentaire de la partie consommable (tableau V).

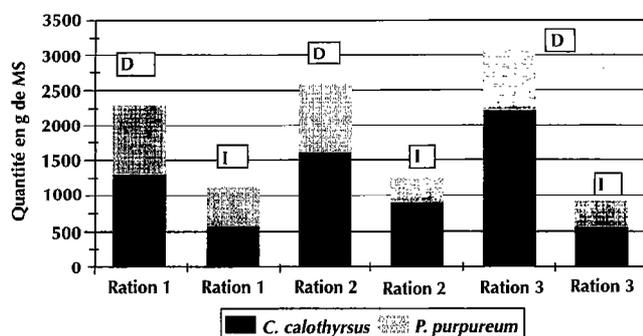


Figure 1 : niveaux d'ingestion du *Calliandra calothyrsus* par bouc pour trois rations testées.

D = ration distribuée ; I = ration ingérée

Les teneurs en tannins précipitants enregistrées à la Réunion sont faibles par rapport à celles obtenues en Australie sur cette même plante mais cela est très certainement dû à des techniques d'analyse différentes (11 p. 100 de tannins condensés dans les feuilles (1)).

Ces résultats confirment les recommandations des auteurs pour une fauche ne devant pas excéder trois mois de repousse (7). Au-delà, le rapport feuilles/tiges est faible, la matière organique digestible chute du fait de la lignification des tiges, et les teneurs en tannins triplent dans les feuilles.

Bien que les teneurs en matières azotées de *Calliandra calothyrsus* diminuent peu après trois mois de repousse, Kamatalit *et al.* (5), puis Kaitho *et al.* (4) ont montré qu'elles sont peu dégradées dans le rumen et le sont d'autant moins que la plante est âgée.

CONCLUSION

Une bonne production fourragère peut être obtenue avec la provenance San Ramon à condition de respecter un écartement inter plants de 0,70 m (dans le cas des banques fourragères) et d'assurer une fertilisation phosphopotassique à la plantation.

Une bonne valorisation par les caprins est possible pour des repousses de trois mois (feuilles, tiges < 6 mm de diamètre et écorce pour les tiges supérieures à ce diamètre).

Il est important de tenir compte de la faible valeur azotée de *Calliandra calothyrsus* dans l'équilibre de la ration de base.

L'influence des tannins, quand les teneurs sont faibles, semble être bénéfique dans le cas de cette légumineuse. Une dégradabilité retardée de l'azote est importante car le transit des légumineuses dans le rumen est plus court que celui des graminées (11). Ainsi une grande quantité de protéines non dégradées quitte le rumen pour être hydrolysées dans le petit intestin. Elles sont de ce fait mieux assimilées par l'animal.

Toutefois, dans l'optique d'une production de fumier, les tiges lignifiées sont un handicap. Elles peuvent servir de bois de feu, mais pas de litière. Il est donc indispensable de prévoir assez de graminées dans la ration.

A l'avenir, il sera intéressant d'étudier les transferts d'azote de la haie à l'animal, puis au fumier et enfin à la culture. De même, des mesures de performances zootechniques en fonction de la ration devront être faites.

Toutes ces recherches devront s'intégrer dans une étude générale du système d'exploitation pour aborder sa rentabilité économique. C'est à ce prix qu'on pourra juger de la faisabilité des innovations techniques proposées.

Tableau V

Organes consommables et valeur fourragère du *Calliandra calothyrsus* suivant l'âge des repousses

Age repousse	3 mois	6 mois	1 an
Rapport feuilles/tiges	3,08	1,14	0,92
% feuilles/plant	75,5	53,1	48,1
% écorce/plant	3,6	6,9	8,1
% tiges < 6 mm/plant	7,8	7,6	6,4
% matière sèche du consommable/plant	86,9	68,0	62,6
* Cendres du consommable (% MS)	5	6	6
* MAT du consommable (% MS)	22	21	19
* CBW du consommable (% MS)	17	23	21
* Dég du consommable (% MO)	61	49	48
* Tannins précipitants dans le consommable (% MS)	0,7	2,1	2,1

* Calculés en fonction des pourcentages d'organes consommables et à partir des résultats d'analyses réalisées au CIRAD-EMVT

MAT : matière azotée totale ; Dég : dégradabilité de la matière organique (Aufrère et Michalet-Doreau, 1990) ; CBW : cellulose brute de Weende

NDF : teneur en fibres ; Tannins précipitants (Hagerman et Butler, 1978)

BIBLIOGRAPHIE

- AHN J.H., ROBERTSON B.M., ELLIOTT R., GUTTERIDGE R.C., FORD C.W., 1989. Quality assessment of tropical browse legumes: tannin content and protein degradation. *Anim. Feed Sci. Techn.*, **27**: 147-156.
- AUFRERE J., MICHALET-DOREAU B., 1990. Nouvelles méthodes d'estimation de la valeur alimentaire des fourrages. II. Méthodes enzymatiques. *Fourrages*, **122** : 203-217.
- HAGERMAN A.E., BUTLER L.G., 1978. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *J. Agric. Food Chem.*, **26** (4): 809-812.
- KAITHO R.J., TAMMINGA S. et BRUCHEM J., 1993. Rumen degradation and *in vivo* digestibility of dried *Calliandra calothyrsus* leaves. *Anim. Feed Sci. Tech.*, **43**: 19-30.
- KAMATALIT P., TELLERT E., VANBELLE M., COLLIGNON G., FOULON M., 1992. *In situ* degradability of organic matter, crude protein and cell wall of various tree forages. *Anim. Prod.*, **55**: 29-34.
- LESUEUR D., TASSIN J., ENILORAC M.P., SARRAILH J.M., PELTIER R., 1996. La symbiose *Calliandra calothyrsus* - *Rhizobium*. *Bois Forêts Trop.*, **248** : 43-59.
- MANDRET G., 1993. Rapport d'activités 1992 du CIRAD Elevage. Etudes et synthèses du CIRAD Elevage Réunion, 37 p. (n°19)
- MARÉCHAUX S., 1993. Les haies fourragères dans les Hauts de l'Ouest de la réunion. Mémoire DESS, Université Paris XII, Créteil, France, 82 p. + annexes.
- PELISSOU F., 1993. Valorisation du système agroforestier dans des petites exploitations diversifiées des Hauts de l'Ouest à la Réunion. Mémoire DESS, Université Paris XII, Créteil, 63 p. + annexes.

10. PERRET S., MICHELON R., TASSIN J., 1994. Soil loss control and soil properties improvement based on cropping systems with cover plants and hedgerows in Réunion Island. In : Proc. 3^e Congrès ESA, Abaro-Padova, 1994.

11. THORNTON R.F., MINSON D.J., 1973. The relationship between apparent retention time in the rumen, voluntary intake and apparent digestibility of legume and grass diets in sheep. *Aust. J. Agric. Res.*, **24**: 809-819.

Reçu le 13.6.95, accepté le 7.5.97

Summary

Mandret G., Tassin J. Forage advantages of *Calliandra calothyrsus* in Réunion

The aim of this study was to evaluate the advantage of a hedge of *Calliandra calothyrsus* for forage production and nutritive value within various mixed farming systems in the Highlands of Réunion. From an agronomic point of view, *Calliandra calothyrsus* hedges, with a 0.70 m spacing, phosphopotassic manure and the higher quality ecotype from San Ramon (Costa Rica), are of interest. *Calliandra calothyrsus* is a good forage for goats if cut before three months of regrowth because of its low tannin content and leaves/stems ratio. Within these diversified systems and, in particular, within the agriculture restructuring of the Western Highlands of Réunion, forage agroforestry certainly has a place. *Calliandra calothyrsus* hedges offer many advantages such as good water infiltration under the hedges (+ 400 %).

Key words: *Calliandra calothyrsus* - Browse plant - Goat - Nutritive value - Nutrient intake - Tannin - Spacing - Provenance - Mixed farming - Réunion.

Resumen

Mandret G., Tassin J. Importancia forrajera de la *Calliandra calothyrsus* en altitud, en la Reunión

El estudio consiste en evaluar el interés forrajero y alimenticio de una cerca de *Calliandra calothyrsus* en el cuadro de sistemas diversificados policultura-crianza en los «Altos» de la Reunión. El comportamiento agronómico de la cerca demuestra la importancia de una distancia de 0,70 m y de un abono con estiércol fosfopotásico, así como la superioridad de la proveniente de San Ramón (Costa Rica). Es interesante la apreciación de los caprinos por los brotes de tres meses, debido a la tenencia en taninos bajos y a una buena relación hojas/tallos. En el cuadro de los sistemas diversificados y principalmente en la renovación de la agricultura de las Alturas del Oeste de La Reunión, los forrajes agroforestales tienen un lugar importante. La instalación de cercas forrajeras de *Calliandra calothyrsus* presenta numerosas ventajas, sobretodo la de una mejor infiltración del agua bajo la cerca (+ 400 p. 100).

Palabras clave: *Calliandra calothyrsus* - Planta de ramoneo - Caprino - Valor nutritivo - Ingestión de nutrientes - Tanino - Espaciamiento - Procedencia - Explotación agrícola combinada.

Aspects pratiques en élevage d'aulacodes (*Thryonomys swinderianus*). VI. Mesures préventives contre la mauvaise usure des incisives

G.A. Mensah¹ A. Schwarzenberg² C.-H. Stier³
T. Kangni⁴ C.F. Gall^{2*}

Mots-clés

Thryonomys swinderianus - Dent - Usure - Captivité - Vitamine C - Santé animale - Bénin - Allemagne.

Résumé

Des expériences ont été conduites avec des aulacodes capturés ou nés en captivité, afin d'étudier des éléments facilitant l'usure des incisives et d'analyser l'effet de la vitamine C dans la ration alimentaire sur l'usure des incisives. Pour l'usure mécanique de celles-ci, l'aulacode utilise surtout le métal et le bois. L'hypothèse d'une avitaminose C dans l'alimentation comme cause d'une croissance démesurée des incisives n'est pas confirmée. Mettre à la disposition des animaux des dispositifs et différents matériaux seraient une mesure indiquée pour éviter les pertes dues à des problèmes dentaires. De plus, l'ajout d'ingrédients grossiers dans la ration alimentaire et l'absence de facteurs de stress peuvent aider l'aulacode à user normalement ses incisives.

■ INTRODUCTION

Comme chez tous les rongeurs, les incisives de l'aulacode ont une croissance continue. A l'état sauvage, il consomme canne à sucre (*Saccharum officinarum*), herbe à éléphant (*Pennisetum purpureum*) et autres graminées. Sa façon de manger entraîne apparemment une usure des incisives proportionnelle à sa croissance (5).

Dans la station d'élevage du Projet Bénino-Allemand d'Aulacodiculture (PBAA), seuls les aulacodes sauvages récemment capturés recevaient, avec une alimentation variée, des morceaux de canne à sucre pendant leur phase d'adaptation à la captivité. Un an

après la suppression de la canne à sucre, une usure insuffisante des incisives a été observée chez 67 p. 100 des animaux du cheptel (1).

L'usure insuffisante des incisives de l'aulacode engendre des pertes dans l'élevage. Ce problème serait dû à un défaut d'ajustement spontané des incisives ou à l'absence de certains éléments permettant à l'aulacode dans son biotope naturel d'entretenir ses dents, ou bien au fait que certains aulacodes n'arrivent pas à utiliser les dispositifs disponibles dans l'élevage (1, 5).

Comme l'homme affecté par le scorbut (causé par une carence en vitamine C) souffre de la membrane périodentaire, ce qui l'empêche de mâcher, il a paru opportun aux auteurs d'examiner l'effet de la vitamine C sur l'usure des dents. L'avitaminose C serait en effet responsable de la décoloration des dents et de la mauvaise croissance ou de la croissance démesurée des incisives chez le cobaye.

Bien que la plupart des mammifères et des oiseaux synthétisent la vitamine C dans leur foie (2), il existe d'autres animaux (jeunes oiseaux, cobayes, rats mutants et primates) et l'homme qui n'ont pas cette faculté ou bien qui l'ont perdue.

Ainsi, bien qu'*E. coli* soit présent dans la microflore intestinale de l'aulacode, il n'a pas, jusqu'à présent, été prouvé qu'il synthétise

1. Unité de Recherches Zootechnique et Vétérinaire, INRA du Bénin, Ministère du Développement Rural, BP 2359, Cotonou, République du Bénin

2. Institut de Production Animale des Pays Tropicaux et Subtropicaux, Université de Hohenheim (480), Garbenstraße 17, D-70593 Stuttgart, Allemagne

3. Fachhochschule Rheinland-Pfalz, FB Agrarwirtschaft, Rochusallee 4, 55411, Bingen (am Rhein), Allemagne

4. Projet Bénino-Allemand d'Aulacodiculture, Ministère du Développement Rural, BP 03-2900, Cotonou, République du Bénin

* Auteur pour la correspondance : Tél. : 49 711 459 3170 ; Fax : 49 711 459 3290
E-mail : gall@uniho.de

la vitamine C, comme c'est le cas chez d'autres animaux (8) ; par ailleurs, on ne dispose d'aucune connaissance en matière de besoins en vitamine C de l'aulacode.

De l'acide ascorbique est administré lors d'un traitement du scorbut. En ce qui concerne les besoins en vitamine C, les avis sont partagés et une dose journalière de 42 à 167 mg/kg poids vif (7) ou de 150 à 200 mg/kg poids vif (6) est préconisée pour les animaux de laboratoire. En cas de stress, le besoin en vitamine C serait plus élevé (4), et certains animaux en synthétiseraient plus (7).

Le présent article expose des études sur des dispositifs et des éléments facilitant l'usure des incisives, ainsi que des mesures préventives prises pour pallier aux effets d'une usure insuffisante.

■ MATERIEL ET METHODES

Les études ont été faites dans les élevages d'aulacodes du Projet Bénino-Allemand d'Aulacodiculture à Godomey (Bénin) et de l'Université de Hohenheim (Allemagne). Les aulacodes étaient élevés individuellement en cage hors sol ou en enclos au sol en groupe de reproduction. A l'Université de Hohenheim, les animaux étaient gardés dans un bâtiment chauffé, ventilé et obscur où des conditions d'éclairage de jour étaient simulées de 23 à 11 h tout au long de l'année.

Quatre expériences différentes ont été conduites :

Première expérience : inventaire de quelques dispositifs et matériaux facilitant l'usure des incisives

L'expérience a été conduite au PBAA et a duré quatre mois avec trois groupes d'animaux :

- 509 aulacodes (dont 230 mâles) récemment capturés à l'état sauvage ;
- 571 aulacodes (dont 300 mâles) en captivité depuis un an ;
- 116 aulacodes (dont 52 mâles) nés en captivité et faisant partie de l'expérience dès l'âge de 4 jours.

Les animaux étaient nourris avec des grains de maïs sec, des granulés de concentré, de la canne à sucre (*Saccharum officinarum*) et du paspalum frais (*Paspalum vaginatum*).

Les dispositifs ou matériaux suivants ont été installés dans les cages et enclos d'élevage pour les 1 196 animaux :

- grillages à mailles carrées de 2,5 cm de côté, diamètre du fil 1,8 mm ;
- fils de fer (2,45 mm de diamètre) placés en trois lignes parallèles et horizontales, l'un au-dessus de l'autre, espacés entre eux de 10 cm ;
- fils de fer (2,45 mm de diamètre) de suspension des bottes de fourrages ;
- abreuvoirs-biberons avec tétines métalliques ;
- morceaux de roches cristallines : granit, gneiss et galet ;
- bouts de bois d'acajou (*Khaya senegalensis*) ;
- coques de noix de coco (*Cocos nucifera*).

Les dispositifs les plus utilisés étaient observés trois fois par jour entre 10 et 12 h, 16 et 18 h, ainsi que 22 et 24 h. De même, au cours de l'inspection du cheptel et de la conduite de l'élevage de 7 à 10 h, tous les aulacodes observés s'ajustant les dents sur l'un des dispositifs étaient enregistrés.

Pour quantifier l'utilisation d'un dispositif donné, les critères suivants ont été fixés :

- dispositif peu utilisé : temps d'utilisation par l'animal inférieur à une demi-minute ;
- dispositif moyennement utilisé : temps d'utilisation par l'animal d'environ une minute ;
- dispositif très utilisé : temps d'utilisation par l'animal supérieur à une minute et demi.

Les incisives des animaux récemment capturés ont été inspectées à leur arrivée et à leur sortie de la quarantaine au bout de trois semaines. Celles des aulacodeaux (jeunes aulacodes) furent inspectées le 4^e jour après leur naissance et à leur sevrage au 28^e jour. L'inspection des incisives de tous les animaux de l'expérience était faite au cours des pesées mensuelles, des traitements sanitaires et des transferts.

Deuxième expérience : influence du diamètre du granulé de concentré sur l'usure des incisives de l'aulacode

L'expérience a été conduite à l'Université de Hohenheim et a duré 20 semaines dont 4 semaines de phase de transition alimentaire et d'adaptation. Vingt-neuf aulacodes mâles, adultes, nés en captivité et d'âge moyen de 9 mois, ont été utilisés. Ils étaient élevés en cage individuelle et abreuvés à volonté. Les animaux étaient répartis en trois groupes, l'un de 11 animaux et les deux autres de 9. Ils étaient nourris avec des granulés de trois diamètres différents : 4, 6 et 8 mm.

Les ingrédients utilisés pour fabriquer le granulé étaient :

	p. 100
Tourteaux de soja	30,0
Blé	27,5
Seigle	12,5
Avoine	15,0
Paille	7,5
Huile de soja	3,0
CMV	4,5

La composition du granulé (92,3 p. 100 de matière sèche (MS)), selon l'analyse de Weende, était la suivante :

	p. 100 de MS
Protéines brutes	24,4
Lipides brutes	5,9
Fibres brutes	9,1
Extractif non azoté	51,7
Cendres	8,9

L'état des incisives a été contrôlé au début et à la fin de l'expérience ; trois indices ont été retenus (1) :

- indice 0 : incisives sans défaut ;
- indice 1 : quelques défauts mais l'état des incisives ne gênait pas l'animal pour s'alimenter normalement ;
- indice 2 : l'état des incisives ne permettait plus à l'animal de s'alimenter correctement.

Le gaspillage alimentaire a été calculé comme fraction gaspillée sur la quantité de granulés donnée. Les animaux ont été pesés au début et à la fin de l'expérience.

Troisième expérience : influence de la vitamine C et de trois sortes de bois différents sur l'usure des incisives de l'aulacode sauvage capturé

L'expérience a été conduite à l'Université de Hohenheim et a duré cinq mois. Dix-neuf aulacodes mâles, sauvages, capturés et répartis en deux groupes de 10 et 9 animaux, ont été utilisés. Ils étaient élevés en cage individuelle, nourris et abreuvés à volonté :

- groupe 1 (témoin) : foin et granulé sans vitamine C ;
- groupe 2 : foin et granulé contenant 0,1375 p. 100 de vitamine C.

Trois sortes de bouts de bois leur étaient régulièrement distribués : bois de saule (bois tendre), bois de hêtre (bois dur) et bois de hêtre imprégné de glucose (bois glucosé). Le bois glucosé était obtenu en plongeant le bois frais dans une solution saturée de glucose à 120°C pendant une heure à l'étuve, puis en le faisant sécher à 40°C pendant une heure dans un four.

Les morceaux de bois mis dans les cages de chaque animal étaient pesés trois fois par semaine et complétés ou renouvelés au besoin. Le même bois était différencié selon le degré de séchage en bois frais et en bois sec. L'état des incisives a été contrôlé suivant trois indices comme dans la 2^e expérience.

De plus, les paramètres suivants ont été étudiés :

- couleur des incisives : jaunes ou blanches ;
- utilisation des morceaux de bois (perte de poids du bois, en g) ;
- développement du poids vif des animaux (en g).

Quatrième expérience : influence de la vitamine C et de trois sortes de bois différents sur l'usure des incisives de l'aulacode né en captivité

L'expérience a été conduite à l'Université de Hohenheim ; elle a duré 12 semaines.

Vingt-sept aulacodes mâles nés en captivité et élevés dans des cages individuelles ont été utilisés. Ils ont été répartis en quatre groupes expérimentaux de 6 ou 7 animaux, nourris avec des granulés durs ou tendres, avec ou sans vitamine C, et du bois à ronger (pour user leurs incisives) leur a été donné selon les dispositifs indiqués au tableau I.

Le granulé a été durci en ajoutant 5 p. 100 de mélasse de canne à sucre. En revanche, le granulé dit tendre a été fabriqué sans mélasse.

- groupe 1 (témoin) : recevait des granulés durs avec de la vitamine C (0,1375 p. 100) et trois sortes de bois ;
- groupe 2 : recevait trois sortes de bois, des granulés durs mais pas de vitamine C ;
- groupe 3 : recevait des granulés durs avec de la vitamine C (0,1375 p. 100) mais pas de bois ;
- groupe 4 : recevait trois sortes de bois, de la vitamine C (0,1375 p. 100), des granulés tendres mais pas de granulés durs.

Trois sortes de bois ont été utilisés pour éviter un effet éventuel de leur qualité ou autre. Ils étaient identiques à ceux de la 3^e expérience,

Tableau I

Utilisation des dispositifs facilitant l'usure des incisives de l'aulacode (% d'observations, n = 920)

	Degré d'utilisation		
	peu ¹	moyen ²	élevé ³
Grillage à mailles carrées	1,09	18,48	21,74
Fils métalliques en rangées horizontales et parallèles	2,17	16,30	19,56
Embout de la tétine de l'abreuvoir-biberon	1,09	6,52	4,35
Fil de fer de suspension de la botte de fourrages	-	2,17	4,35
Bout de bois d'acajou	1,09	1,09	-
Coque de noix de coco	-	-	-
Morceaux de roches cristallines	-	-	-

¹ temps inférieur à une demi-minute

² temps d'une minute environ

³ temps supérieur à une minute et demie

bois de saule (bois tendre), bois de hêtre (bois dur) et bois de hêtre imprégné dans une solution saturée de glucose (bois glucosé). Ils ont été mis à la disposition des aulacodes comme dans l'expérience précédente. Les granulés tendres étaient préparés en ajoutant de l'eau pendant la granulation.

L'état des incisives a été contrôlé selon trois indices comme dans la 2^e expérience. Outre les trois paramètres retenus lors de la 3^e expérience, les paramètres suivants ont été étudiés :

- mesure des incisives : longueur, largeur (5) et, comme profondeur, le creux de l'encoche des incisives supérieures dans lequel viennent se loger les incisives du bas ;
- surcroît des incisives (différence entre croissance et usure).

Les mensurations des incisives ont été faites à l'aide d'un pied à coulisse (5). Pour effectuer les mesures, les animaux ont été placés sous anesthésie générale.

Les mesures linéaires des incisives et les prises de poids vif ont été effectuées au début de l'expérience, puis après 6 et 12 semaines.

■ RESULTATS

Première expérience

Tous les animaux sauvages capturés et les aulacodeaux avaient, sans exception, des incisives jaune orangé et sans défaut.

Parmi les aliments distribués, c'était la canne à sucre qui était la première consommée, puis c'était le tour du granulé et enfin celui du maïs. La coque de noix de coco et les morceaux de roches cristallines n'ont pas été utilisés par les animaux durant toute la période d'observation. Les aulacodes avaient d'abord recours au métal et, à défaut de métal, au bois (tableau I).

Deuxième expérience

La plupart des aulacodes des trois groupes avaient des dents sans défaut : dans chaque groupe il n'a été trouvé qu'un faible pourcentage d'animaux avec des incisives mal usées et les différences n'étaient pas significatives ($p \geq 0,05$) (tableau II).

Tous les animaux dans les trois groupes ont gagné du poids et les différences entre les trois groupes n'étaient pas significatives. Le gaspillage alimentaire a été respectivement : 6,8 p. 100 (granulé 4 mm), 39,7 p. 100 (granulé 6 mm) et 49 p. 100 (granulé 8 mm). Le gaspillage du granulé de diamètre 4 mm est significativement plus faible ($p \leq 0,01$) que celui des deux autres.

Tableau II

Etat des incisives des aulacodes en fonction du diamètre du granulé (% d'observations)

Etat des incisives	Diamètre du granulé*		
	4 mm (n = 9)	6 mm (n = 9)	8 mm (n = 11)
0	66,67	88,89	81,82
1	11,11	00,00	00,00
2	22,22	11,11	18,18

0 = sans défaut

1 = quelques défauts mais alimentation possible

2 = mauvais état et alimentation difficile

* les différences attribuées au diamètre du granulé ne sont pas significativement différentes ($p \geq 0,05$)

Troisième expérience

Les animaux du groupe 1 (sans vitamine C) avaient des incisives plus longues que ceux du groupe 2, mais les différences n'étaient pas significatives ($p \geq 0,05$) (tableau III). Aucun problème dentaire n'a été observé chez les aulacodes pendant les cinq mois d'observation.

Tableau III

Longueur des incisives et gain pondéral des aulacodes

	Groupe 1 (vitamine C)* (n = 9)	Groupe 2 (témoin)* (n = 10)
Longueur des incisives		
- supérieures (mm)	9,2 ± 1,7	11,2 ± 1,9
- inférieures (mm)	8,7 ± 1,5	11,6 ± 2,4
Poids		
- initial (g)	3098,0 ± 50,7	3096,0 ± 31,5
- final (g)	3916,8 ± 197,0	3973,4 ± 99,7
Age (jours)	352,0 ± 3,3	352,0 ± 3,9
Gain de poids total (g)	818,8 ± 166,3	877,4 ± 95,3

* Les valeurs moyennes entre les deux groupes ne sont pas significativement différentes ($p \geq 0,05$)

Les gains de poids du groupe avec vitamine C étaient plus élevés que ceux du groupe contrôle, mais la différence n'était pas significative ($p \geq 0,05$).

La quantité de bois glucosé rongé était significativement plus élevée ($p \leq 0,05$) dans les deux groupes que celle des bois tendre et dur (tableau IV).

Tableau IV

Utilisation des trois sortes de bois (en g) chez les aulacodes de la 3^e expérience (valeurs moyennes du moindre carré*)

	Groupe 1 (témoin) (n = 9)	Groupe 2 (vitamine C) (n = 10)
Bois tendre	139,1 ^a ± 220,4	151,5 ^a ± 258,7
Bois dur	102,1 ^a ± 110,2	176,4 ^a ± 269,3
Bois glucosé	307,4 ^b ± 418,3	302,2 ^b ± 518,0

* Les valeurs moyennes suivies de lettres différentes sur une même colonne sont significativement différentes ($p \leq 0,05$)

Quatrième expérience

Dans le tableau V sont indiquées les dimensions moyennes (longueur, largeur et profondeur) des incisives supérieures et inférieures. Les différences observées à leur niveau entre les animaux des quatre groupes ne sont pas significatives ($p \geq 0,05$). Le tableau VI résume le surcroît enregistré chez les animaux dans chaque groupe. Les différences entre les groupes sont plus importantes pour le surcroît des incisives inférieures que pour celui des incisives supérieures, mais elles ne sont pas significatives ($p \geq 0,05$).

Dans le tableau VII est montrée la quantité des trois sortes de bois rongé par les aulacodes, dans les trois groupes qui en ont reçu. Il existe une relation entre le degré de séchage du bois, le traitement du groupe ($p \leq 0,01$), puis la sorte de bois ($p \leq 0,001$). Aucune relation n'existe entre la sorte de bois et le surcroît des incisives ($p \geq 0,05$). Les animaux qui préféraient des morceaux de bois dur avaient une usure plus forte de leurs incisives, alors que les animaux qui rongeaient le plus de bois (groupe 2) avaient le surcroît le plus élevé (tableau VI).

Il n'y a pas de différences significatives ($p \geq 0,05$) au niveau des paramètres étudiés entre les groupes 1, 2 et 3 qui ont reçu le granulé dur et le groupe 4 le granulé tendre. La dureté n'a donc eu aucune incidence sur l'usure des incisives.

Une classification des animaux selon la couleur des dents ou le comportement n'a pas relevé de différences de surcroît des incisives ni de gain pondéral.

DISCUSSION

Les dents des animaux capturés ainsi que celles des jeunes nés en captivité étaient en parfaite condition. Dans la nature, l'aulacode consomme des fourrages qui sont riches en cellulose et parfois en lignine et silice (feuilles et tiges des graminées). Ces aliments constituent à la fois un matériau énergétique, un lest et une véri-

Tableau V

Dimensions moyennes ($\bar{x} \pm s_x$) des incisives (en mm)

	Groupe 1 (témoin) (n = 7)	Groupe 2 (sans vitamine C) (n = 7)	Groupe 3 (sans bois) (n = 6)	Groupe 4 (granulés tendres) (n = 7)	Total (n = 27)
Supérieures					
- longueur	10,8 ± 2,2	11,1 ± 1,6	12,8 ± 1,2	11,3 ± 1,6	11,4 ± 1,8
- largeur	10,9 ± 2,5	11,7 ± 0,6	11,9 ± 0,4	11,9 ± 0,5	11,6 ± 1,4
- profondeur	4,9 ± 0,4	5,1 ± 0,4	5,2 ± 0,3	5,3 ± 0,3	5,1 ± 0,4
Inférieures					
- longueur	13,2 ± 1,4	13,8 ± 1,9	12,2 ± 2,3	12,0 ± 1,8	12,8 ± 2,0
- largeur	11,2 ± 0,6	11,6 ± 0,4	11,8 ± 0,6	11,9 ± 0,4	11,6 ± 0,6
- profondeur	4,7 ± 0,4	5,0 ± 0,4	5,1 ± 0,3	4,9 ± 0,4	4,9 ± 0,4

Tableau VI

Surcroît des incisives supérieures et inférieures dans chaque groupe (en mm)
(valeurs moyennes du moindre carré)

	Groupe 1 (témoin) (n = 7)	Groupe 2 (sans vitamine C) (n = 7)	Groupe 3 (sans bois) (n = 6)	Groupe 4 (granulés tendres) (n = 7)
Surcroît supérieur	1,32 ± 0,47	1,75 ± 0,52	1,45 ± 0,53	1,57 ± 0,42
Surcroît inférieur	0,80 ± 0,43	1,22 ± 0,47	0,22 ± 0,45	-0,16 ± 0,44

Tableau VII

Quantité de bois rongé par semaine (en g) (valeurs moyennes du moindre carré*) **

	Groupe 1 (témoin) n = 7	Groupe 2 (sans vitamine C) n = 7	Groupe 4 (granulés tendres) n = 7
Bois tendre	123,8 ^a ± 69,5	224,2 ^b ± 69,5	40,2 ^a ± 69,5
Bois dur	103,2 ^a ± 69,5	355,1 ^b ± 69,5	105,4 ^a ± 69,5
Bois glucosé	149,6 ^a ± 69,5	663,4 ^c ± 69,5	152,6 ^a ± 69,5
Bois frais	309,0 ^c ± 86,7	677,1 ^d ± 86,7	261,0 ± 86,7
Bois sec	46,7 ± 86,7	219,9 ± 86,7	41,1 ± 86,7

* les valeurs moyennes suivies de lettres différentes sur une même ligne sont significativement différentes ($p \leq 0,05$)** des différences entre les écarts-types n'interviennent qu'à partir du 3^e chiffre après la virgule

table lime à user les dents. De même, l'aulacode ingère de la terre avec les racines et les tubercules qu'il déterre, en mangeant directement du sable, en grignotant des termitières et des roches tendres. L'aulacode paraît avoir conscience de la croissance rapide de ses incisives, et use celles du haut contre celles du bas en faisant des mouvements de haut en bas.

En captivité, il les frotte sur le fil de fer des mailles des grillages de sa cage d'élevage. En effet, les dispositifs les plus utilisés (après les aliments comme la canne à sucre) sont ceux de nature métallique (tableau I). De même, il a été observé que des aulacodes élevés en groupe en enclos rongeaient régulièrement les lamelles de bois apposées contre les parois latérales de séparation

des enclos, dans un effort pour rejoindre ceux qui se trouvaient dans les enclos voisins. Par ailleurs, ils rongeaient régulièrement du bois, de préférence glucosé. L'entretien de leurs incisives a pu ainsi se faire et aucun problème dentaire n'a été décelé.

L'usure des incisives n'était pas augmentée par le diamètre du granulé. Comme le gaspillage alimentaire est plus important avec des granulés de gros diamètre, les granulés de diamètre plus petit sont donc à préférer.

Un effet du dosage de vitamine C sur les problèmes dentaires n'a pas été observé. Les aulacodes du groupe sans vitamine C avaient des incisives plus longues et un gain pondéral plus élevé, mais ils rongeaient plus intensivement le bois. Par conséquent, on peut

supposer que les aulacodes n'ont pas besoin de supplémentation en vitamine C comme c'est le cas chez d'autres rongeurs (8). Il serait cependant souhaitable de mener des expériences plus approfondies sur le sujet.

L'émail de la face labiale des incisives des aulacodes a une coloration régulière jaune à orangée, caractéristique des rongeurs. Dans cette étude, une partie des animaux dont les incisives manquaient de coloration avaient un surcroît inférieur, bien que la différence ne soit pas statistiquement significative. Ces observations concordent avec celles de Granados (3) qui a observé que les dents pigmentées étaient plus longues que les blanches.

Le surcroît journalier enregistré dans la 4^e expérience est supérieur à celui enregistré dans la 3^e. Cependant, aucun problème dû aux incisives trop longues n'a été rencontré durant toute l'expérimentation. De plus, tous les aulacodes de cette 4^e expérience avaient des gains de poids réguliers et appréciables.

La comparaison du groupe 4 avec le groupe témoin montre que la consistance des granulés n'a pas d'influence sur le surcroît des incisives. Ce résultat concorde avec celui observé dans la 2^e expérience relative à la taille du granulé, qui n'avait aucune influence sur l'usure des incisives. Le groupe 3, qui n'a pas reçu de bois, présente un surcroît légèrement supérieur à celui du groupe témoin, bien que la différence observée ne soit pas statistiquement différente. Ces animaux affilent leurs incisives sur les mailles métalliques plus fréquemment que les autres qui ont du bois à leur disposition.

Les aulacodes préfèrent le bois frais au bois sec. Cependant, le bois imprégné au préalable de glucose était rongé par les animaux, même à l'état sec. Il correspondrait donc à la canne à sucre qu'il peuvent trouver au Bénin. La supplémentation en canne à sucre devrait être conservée pour faciliter l'auto-usure des incisives chez les aulacodes.

La fréquence de la mauvaise usure et des dents longues, nettement plus faible dans l'élevage expérimental en Allemagne que dans celui du Bénin, pourrait s'expliquer par une conduite de l'élevage caractérisée en Allemagne par l'absence de facteurs de stress perturbant l'actogramme des animaux.

Summary

Mensah G.A., Schwarzenberg A., Stier C.-H., Kangni T., Gall C.F. Practical aspects of grass-cutter (*Thryonomys swinderianus*) breeding. VI. Preventive measures against insufficient incisor wear

Experiments were carried out with grass-cutters captured or born in captivity in order to study the elements facilitating incisor attrition and to analyze the effect of vitamin C addition to daily rations on incisor wear. The grass-cutters mainly used metal and wood for mechanical incisor wear. The hypothesis that an excessive incisor growth was caused by avitaminosis C was not confirmed. Losses due to dental problems could be prevented by providing animals with devices and various materials. In addition, coarse materials included into the diet and a non stressful environment might help ensure proper incisor wear.

Key words: *Thryonomys swinderianus* - Tooth - Wear - Captivity - Vitamin C - Animal health - Benin - Germany.

■ CONCLUSION

Des possibilités assez simples peuvent réduire les problèmes causés par l'usure insuffisante des incisives des aulacodes, en mettant à la disposition des animaux des supports et des dispositifs leur permettant de se «faire les dents». De plus, il semble qu'une alimentation diversifiée et un élevage laissant assez de temps de repos à l'aulacode, aident à réduire les problèmes dentaires.

BIBLIOGRAPHIE

1. ADJANOHOUN E., 1986. Bilan de l'état des incisives de tous les aulacodes entretenus au PBAA au 6 septembre 1986. Cotonou, Bénin, Ministère du Développement Rural, PBAA/DEP/MDRAC/BENIN. (Rapport technique inédit)
2. CHATTERJEE I.B., MAJUMBER A.D., NANDI B.K., SUBRAMANIAN N., 1975. Synthesis and some major functions of vitamin C in animals. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **258** : 24-26.
3. GRANADOS H., 1986. Physiological role of the pigment of the enamel in the rodent incisors. Its importance in experimental biology and medicine. *Arch. Invest. Med. Mex.*, **17** : 37-54.
4. KALLNER A., 1987. Requirement for vitamin C based on metabolic studies. In: Burns J.J., Rivers J.M., Machlin L.J. eds., Third conference on vitamin C, New York, USA, october 8-10, 1986. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **498**: 418-423.
5. MENSAH G.A., BRÖNNEMANN A., STIER C.-H., GALL C.F., 1992. Aspects pratiques en élevage d'aulacodes (*Thryonomys swinderianus*). V. Croissance et usure normales des incisives. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **45** : 175-178.
6. PAULING L., 1982. Effect of dietary ascorbic acid on the incidence of spontaneous mammary tumors in R III mice. In: Hanck A., ed., Vitamin C. Bern, Switzerland, Huber, p. 7.
7. STONE I., 1977. The healing factor vitamin C against disease. New York, USA, Grosset and Dunlap.
8. WALKER E.P., 1968. Mammals of the world, 2nd ed., Vol. II. Baltimore, USA, The Johns Hopkins Press.

Reçu le 16.2.93, accepté le 18.4.97

Resumen

Mensah G.A., Schwarzenberg A., Stier C.-H., Kangni T., Gall C.F. Aspectos prácticos de la crianza del cobayo *aulacodes* (*Thryonomys swinderianus*). VI. Medidas preventivas contra el mal desgaste de los incisivos

Los estudios se realizaron con *aulacodes* capturados o nacidos en cautiverio, con el fin de estudiar los elementos que favorecen el desgaste de los incisivos, así como analizar el efecto de la vitamina C en la ración alimenticia sobre el desgaste de los incisivos. Para el desgaste mecánico de éstos, el *aulacodes* utiliza sobre todo el metal y la madera. No se confirma la hipótesis de una avitaminosis C en la alimentación, como causa de un crecimiento desmesurado de los incisivos. Poner a disposición de los animales diferentes dispositivos y materiales, sería una medida indicada para evitar la pérdidas debidas a los problemas dentarios. Además, la adición de ingredientes bruscos en la ración alimenticia y la ausencia de factores de stress pueden ayudar al aulacodes a utilizar normalmente sus incisivos.

Palabras clave: *Thryonomys swinderianus* - Diente - Desgaste - Cautividad - Vitamina C - Sanidad animal - Benin - Alemania.

Blood protein polymorphism in the one-humped camel (*Camelus dromedarius*) in Morocco

L. Ouragh ^{1*} M. Bengoumi ²

Key words

Dromedary - *Camelus dromedarius* -
Blood protein - Catalase - Polymorphism -
Morocco.

Summary

Two hundred and seventeen serum samples and 117 hemolysate samples were obtained from 217 one-humped camels (*Camelus dromedarius*) from Morocco and analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis for albumin (Alb), postalbumin (Pa) and transferrin (Tf) and by starch gel electrophoresis for catalase (Cat). Only the last system exhibited polymorphism with the estimated frequencies of 0.325 and 0.675 for Cat^F and Cat^S, respectively.

■ INTRODUCTION

Several blood and milk protein systems have been studied in the dromedary (*Camelus dromedarius*). Some of them revealed genetic variability: albumin (Alb), haptoglobin (Hp) (2), haemoglobin (Hb), X protein, β -lactoglobulin (β -Lg) (1), transferrin (Tf), glucosephosphate-isomerase (GPI: EC 5.3.1.9.), acid phosphatase (AP: EC 3.1.3.2.), phosphoglucomutase (PGM: EC 2.7.5.1.), 6-phosphogluconate dehydrogenase (PGD: EC 1.1.1.43.) (4) and malic enzyme (ME: EC 1.1.1.40.) (6).

In 1988, Penedo *et al.* (8) reported the polymorphism of 5 electrophoretic systems: post-albumin (Pa), Tf, Cat, PGD and GPI for llama (*Lama glama*) and alpaca (*Lama pacos*).

In this report, the authors present evidence for electrophoretic variation of the catalase system of the dromedary in Morocco. No variation was found for albumin, postalbumin, and transferrin systems.

■ MATERIALS AND METHODS

Analyses were carried out on 217 dromedaries from Guelmim, an area in the southern region of Morocco, at the western edge of the Sahara desert. Random samples in herds were taken from each dromedary in two 10 ml vacuum tubes: one containing an anticoagulant (lithium heparin) to collect red cells and the other dry to obtain serum.

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (3, 8) was used to analyze albumin, postalbumin and transferrin systems in 217 sera. Starch gel electrophoresis (SGE) (5) was used to analyze the catalase system in 117 hemolysate samples.

■ RESULTS AND DISCUSSION

Of the four systems studied, only the catalase was found to be polymorphic (figure 1). Three phenotypes were observed in this system; their distribution and allelic frequencies are shown in table I.

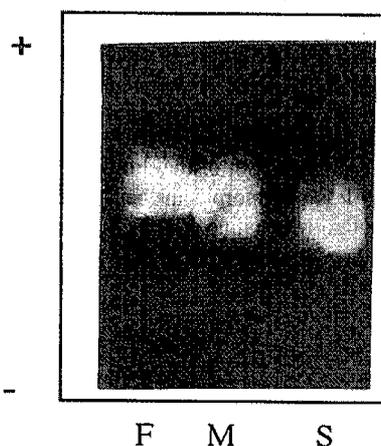


Figure 1: photograph of starch gel electrophoretic pattern showing the three phenotypes of catalase in dromedaries in Morocco.

Allelic frequencies were calculated as:

$$\text{Cat}^F = 2(\text{FF}) + (\text{FS}) / 2N = 2 \times 16 + 44 / 2 \times 117 = 0.325$$

$$\text{Cat}^S = 2(\text{SS}) + (\text{FS}) / 2N = 2 \times 57 + 44 / 2 \times 117 = 0.675$$

The expected phenotypes were calculated from allelic frequencies as follows (the heterozygote phenotype FS is also designated as M. It has an intermediary activity area between F and S):

$$\text{FF} = (\text{Cat}^F)^2 \times N = (0.325)^2 \times 117 = 12.36$$

$$\text{FS ou M} = 2 \times (\text{Cat}^F) \times (\text{Cat}^S) \times N = 2 \times 0.325 \times 0.675 \times 117 = 51.33$$

$$\text{SS} = (\text{Cat}^S)^2 \times N = (0.675)^2 \times 117 = 53.31$$

1. Département de Pathologie Médicale et Chirurgicale, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, BP 6202, Rabat-Instituts, Maroc

2. Département de Biochimie, Pharmacie et Toxicologie, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, BP 6202, Rabat-Instituts, Maroc

* Correspondence: tel. and fax: 212 7 771395

E-mail: Ouragh@syfed-ma.ma.refer.org

Table I

Distribution and allelic frequencies of catalase types in dromedaries in Morocco

Phenotypes	n observed	n expected	Frequencies
FF	16	12.36	Cat ^F = 0.325
FS or M	44	51.33	Cat ^S = 0.675
SS	57	53.31	
Total	117	117	

$$\chi^2 = 2.372$$

The χ^2 test was used to check the panmixia of the population under study (Hardy-Weinberg's law). At a 5 % threshold, the χ^2 table gives a 5.991 value for ddl = 2. The χ^2 observed (2.372) is very much below the χ^2 limit. The hypothesis of the genetic balance of the population studied by the catalase system cannot be rejected (5 % risk).

As in the horse (5), the llama, the alpaca and the guanaco (8), the three observed phenotypes, F, FS or M and S, suggest that the Cat system in the dromedary is also controlled by two codominant genes: Cat^F and Cat^S.

The Cat^F allele seems to be more prevalent in the camelids of South America than in the dromedary (8).

No polymorphism was observed for the Alb, Pa (postalbumin) and Tf systems. This is in agreement with the findings of Van de Weghe *et al.* (10), Di Stasio *et al.* (1), Penedo and Juneja (9) and Penedo and Fowler (7). However, Khanna and Tandon (4) described, without specifying the variants, the presence of six phenotypes within the Tf system in the dromedary of India. Likewise, Elamin and Saha (2) described six atypical heterozygote variants of the albumin system in dromedaries in the Sudan.

In conclusion, this study confirms what has already been reported on biochemical polymorphism of the dromedary, in that *Camelus dromedarius* has less polymorphism than the camelid species of the new world within which nine protein systems and four enzyme systems revealed a genetic variability (7).

Résumé

Ouragh L., Bengoumi M. Le polymorphisme des protéines sanguines chez le dromadaire (*Camelus dromedarius*) au Maroc

Deux cent dix-sept sérums et 117 hémolysats de dromadaires du Maroc (*Camelus dromedarius*) ont été analysés respectivement par électrophorèse en gel de polyacrylamide pour trois systèmes, l'albumine (Alb), la post-albumine (Pa) et la transferrine (Tf) et par électrophorèse en gel d'amidon pour le système catalase (Cat). Seul ce dernier système a montré une variation génétique avec des fréquences respectives de 0,325 et 0,675 pour les allèles Cat^F et Cat^S.

Mots-clé : Dromadaire - *Camelus dromedarius* - Protéine sanguine - Catalase - Polymorphisme - Maroc.

The fact that a genetic variability of the Cat system, considered until now to be monomorphic (7), is described here, spurs on the need to explore other systems of the dromedary in Morocco, notably those showing a polymorphism in dromedaries of other African countries (Hb, Hp) and camelids of South America (Esterase D: EsD, GPI and PGD).

Acknowledgements

We thank A. Nabich and N. Benbihi for technical assistance.

REFERENCES

- DI STASIO L., CRISTOFORI F., SARTORE G., 1983. Phenotypic variation in blood and milk of the Somali camel. *Anim. Blood Groups Biochem. Genet.*, **14**: 225-228.
- ELAMIN F.M., SAHA N., 1980. Blood protein polymorphism in the one-humped camel (*Camelus dromedarius*) in the Sudan. *Anim. Blood Groups Biochem. Genet.*, **11**: 39-41.
- GAHNE B., JUNEJA R.K., GROLMUS J., 1977. Horizontal polyacrylamide gradient gel electrophoresis for the simultaneous phenotyping of transferrin, post-transferrin, albumin and post-albumin in the blood plasma of cattle. *Anim. Blood Groups Biochem. Genet.*, **8**: 127-137.
- KHANNA N.D., TANDON S.N., 1985. A note on electrophoretic studies on certain blood proteins and enzymes in Indian camels. *Indian vet. J.*, **62**: 343-345.
- KELLY E.P., STORMONT C., SUZUKI Y., 1971. Catalase polymorphism in the red cells of horses. *Anim. Blood Groups Biochem. Genet.*, **2**: 135-143.
- OTCHOM B.B., NOUR S.M., 1989. Rapport sur le stage de formation en génétiques des populations, Laboratoire de Zoogéographie (Projet : étude génétique des populations de dromadaires au Tchad). Montpellier, France, Université de Montpellier III.
- PENEDO M.C.T., FOWLER M.E., 1992. Parentage verification in camelids. In: Proc. 1st Int. Camel Conf., Doubay, United Arab Emirates, 2-6 février 1992, p. 285-287.
- PENEDO M.C.T., FOWLER M.E., BOWLING A.T., ANDERSON D.L. and GORDON L., 1988. Genetic variation in the blood of llamas, llamas glamas, and alpacas, llamas pacos. *Anim. Genet.*, **19**: 267-276.
- PENEDO M.C.T., JUNEJA R.K., 1989. Polymorphic plasma post-albumin (Po) of llamas and alpacas identified as Gc protein. *Anim. Genet.*, **20**: 221-223.
- VAN DE WEGHE A., VAN ZEGEREN A., BOUQUET Y., 1982. The vitamin D binding protein in domestic animals. *Comp. Biochem. Physiol.*, **73B**: 977-982.

Reçu le 13.5.96, accepté le 24.4.97

Resumen

Ouragh L., Bengoumi M. Polimorfismo proteico sanguíneo en el camello de una joroba (*Camelus dromedarius*) en Marruecos

Se obtuvieron doscientas diecisiete muestras de suero y 117 muestras hemolisadas a partir de 217 camellos de una joroba (*Camelus dromedarius*) en Marruecos, las cuales se analizaron mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida para albúmina (Alb), post albúmina (Pa) y transferrina (Tf) y mediante electroforesis en gel de levadura para catalasas (Cat). Solamente este último sistema demostró polimorfismo con las frecuencias estimadas de 0,325 y 0,675 para Cat^F y Cat^S, respectivamente.

Palabras clave: Dromedario - *Camelus dromedarius* - Proteína sanguínea - Catalasa - Polimorfismo - Marruecos.

Factors affecting the birth weight and neonatal mortality of Massa and Fulbe sheep breeds in a hot and dry environment, Cameroon

A.L. Ebangi¹ L.N. Nwakalor² D.A. Mbah³ D. Abba⁴

Key words

Massa sheep - Fulbe sheep - Lamb - Environmental factor - Breed - Adaptation - Season - Birth weight - Mortality - Statistical analysis - Cameroon.

Summary

From 1986 to 1991, data from 377 and 422 Massa and Fulbe lambs were collected for birth weights and neonatal mortalities. The data were obtained from random bred foundation populations kept at the Animal Research Unit, Yagoua, Cameroon. Data analyzed by GLM procedure and chi-square were used to identify and quantify factors affecting birth weight and neonatal mortality. Results indicated highly significant breed, season and year of birth, birth type, parity, season by breed and season by year of birth effects on birth weight ($p < 0.001$). Breed by parity, breed by birth type, birth type by parity ($p < 0.01$) were equally significant sources of variation of birth weight. Though the Fulbe breed had a significantly higher birth weight than the Massa (2.88 vs. 1.99 kg), mortality in the latter was significantly lower (49.76 vs. 50.24 %). Mortality was significantly lower during the rainy season (16.82 %) than during the cold dry (42.90 %) and hot dry (40.28 %) seasons. The Massa breed though with a smaller birth weight was more adapted to the hot and dry environment than the Fulbe. Programming breeding for rainy season lambing could therefore increase productivity and production of both breeds.

■ INTRODUCTION

The potential of sheep production in Cameroon is high, especially as they are found in all the ecological zones of the country. The estimated population is about 2,358,100 with about 1,362,600 (57.8 %) belonging to the Sahel zone alone. About 47.5 % of this belongs to the Far-North Province and about 10.3 % to the North Province (Njwe, unpublished results). This estimate is indicative of the socio-economic importance of sheep in the area. Husbandry is, however, rural, extensive and subsistent. Diseases and parasites abound. Capital investment is minimal as inputs are usually generated within the homestead.

Deciry (4) reported information on the reproductive performance of the breeds. Cardinale *et al.* (2) reported high mortalities of

above 50 % in small ruminants in North Cameroon and attributed this mostly to diseases and, especially, digestive parasites and to *la peste des petits ruminants* (PPR). No serious attempt has been made to quantify environmental factors affecting their productivity and mortality. Information on such factors is important to optimize productivity and production.

The objective of this study was to identify and quantify factors affecting birth weight and neonatal mortality (lambs born alive but that died before 7 days) of Fulbe and Massa breeds.

■ MATERIALS AND METHODS

Experimental site

The Yagoua Station of the Institute of Animal and Veterinary Research (IRZV) is located in the stressful environment of the Far-North Province of Cameroon at an altitude of 300 m, latitude 10°23'N and longitude 15°16'E. The mean rainfall is 800 mm (falling within a period of about four months) and temperatures range from 12.5°C in January to 40°C in March. The year is

1. Institute of Agricultural Research and Development, PO Box 1073, Garoua, Cameroon

2. Department of Animal Science, University of Nigeria, Nsukka, Nigeria

3. Ministry of Scientific and Technical Research, PO Box 1457, Yaoundé, Cameroon

4. Institute of Agricultural Research and Development, Maroua, Cameroon

divided into three seasons, which include a cold dry season (CDS) from October to January, a hot dry season (HDS) from February to May and a rainy season (RS) from June to September.

Experimental animals and management

The two major sheep breeds found in this area are the Fulbe (Peulh) and the Massa (Kirdi). The Fulbe sheep, widespread from Guinea Savanna through the Sudan to Sahel is characterized by a predominantly white coat colour. It has long legs and long and large drooping ears. Males have long spiral horns. Females are generally hornless, but when the horns are present they are usually quite small (7). The Massa is a local breed reared by the Massa, Toupouri and Mousgoum ethnic groups (4). The body size compared to that of the Fulbe is small. The breed is hairier and its coat colour is predominantly black or brown around the Yagoua region. It is predominantly white around the mountainous region of Mokolo. The forehead is flat, the ears short and small and the head large and rectilinear. Males have horns which are prismatic in shape, larger at the base and directed towards the back (3).

The two breeds were grazed separately on natural pastures of the savannah type all year round. They were lodged in separate barns to avoid crossbreeding. During the HDS they received feed supplements made of cotton seed-cake, bran and straws of rice and groundnut haulms.

Data collection

Data on breed, birth weight (weight within 24 h of birth in kg), sex, birth type, parity, season and year of lambing, and neonatal mortality were obtained from daily records kept from 1986 to 1991 at IRZV Yagoua, Cameroon. A total of 377 and 322 lambs of 145 Massa ewes and 422 and 346 lambs of 132 Fulbe ewes were used for the estimation of least squares means of birth weight and neonatal mortality (mortality between 0 and 7 days of birth), respectively.

Statistical analyses

Two statistical methods were involved in the analyses:

Method I

This method was used for testing the effects of the various environmental factors on birth weight and for estimating the least squares means (LSM) and standard errors (SE) of birth weight. The SAS computer program (16) with GLM procedure was used. A retained linear model comprising significant fixed effects, first order interactions and the random error, assumed to be identically, independently and normally distributed with a zero mean and variance σ^2 for the analysis was as follows:

$$Y_{ijklmno} = \mu + B_i + S_j + T_k + D_l + R_m + P_n + (BS)_{ij} + (BD)_{il} + (BP)_{in} + (DP)_{in} + (ST)_{jk} + e_{ijklmno}, \text{ where}$$

$Y_{ijklmno}$ is the birth weight of the o^{th} lamb;

μ the overall mean ;

B_i is the fixed effect of the i^{th} breed ($i = 1, 2$);

S_j the effect of the j^{th} season ($j = 1, 2, 3$);

T_k effect of the k^{th} year of lambing ($k = 1, 2, \dots, 6$);

D_l effect of the l^{th} birth type ($l = 1, 2$);

R_m the effect of m^{th} sex ($m = 1, 2$);

P_n the effect of the n^{th} parity ($n = 1, 2, \dots, 4$);

$(BS)_{ij}$, $(BD)_{il}$, $(BP)_{in}$, $(DP)_{in}$ and $(ST)_{jk}$ first order interaction for breed by season of lambing, breed by birth type, breed by parity, birth type by parity, season by year of lambing and $e_{ijklmno}$, the random error associated with the weight of the o^{th} lamb of breed i , birth type l , sex m , parity n , lambing during season j of the k^{th} year.

Method II

This method involved the calculation of mortality rates as simple proportions of dead lambs to total number lambing. First order interactions involving mortalities were determined directly from observed mortalities using the basic definition of interaction. The effects of the various factors on the different neonatal mortality rates were then tested using the chi-square (χ^2) (12) test.

RESULTS AND DISCUSSION

Important sources of variation of birth weight are presented in table I. These include breed, season and year of lambing, birth type, parity, breed by season and season by year of lambing ($p < 0.001$). Birth type by parity, breed by parity and breed by birth type, all first order interactions, were equally significant sources of variation ($p < 0.01$). The effect of sex was moderately significant ($p < 0.05$). Similar results on birth type, parity, year of birth and sex have been reported by various authors (1, 6, 8, 9, 10, 11, 17). Comparative results have been reported by Ebangi *et al.* (7) and Rajab *et al.* (15), though with a non-significant sex effect ($p > 0.05$). Significant breed effect ($p < 0.001$) has been reported by Kiriro (10), Yapi (17) and Demeke (5).

Table I

Tests of significance for factors affecting birth weight (kg) of Massa and Fulbe sheep

Source of variation	DF	F value	P > F
Breed	1	593.28	0.0001
Season of lambing	2	12.11	0.0001
Year of lambing	5	6.61	0.0001
Birth type	1	31.93	0.0001
Sex	1	4.08	0.0438
Parity	3	5.15	0.0001
Breed x season	2	6.52	0.0001
Birth type x parity	3	4.00	0.0077
Breed x parity	3	3.69	0.0118
Breed x birth type	1	7.46	0.0065
Season x year	8	3.86	0.0001

The LSM and SE of main and subclass effects on birth weight are presented in tables II and III, respectively. The lamb birth weight differed significantly between the breed groups ($p < 0.001$). The Fulbe breed maintained this superiority in the subclass effects ($p < 0.001$). Male lambs were generally heavier than females in both single and twin births ($p < 0.05$). The season effect was highly significant on birth weight ($p < 0.001$) with heavier lambs obtained from rainy season lambings. Lambs born during the HDS and CDS did not differ significantly in birth weight ($p > 0.05$). The first order interaction of breed by season did not affect Massa

Table II

Least squares means (LSM) and standard errors (SE) of birth weight for significant main effects

Main effect	n	LSM (kg)	SE (kg)
Breed**			
Massa	377	1.99 ^b	0.04
Fulbe	322	2.88 ^a	0.04
Sex*			
Male	339	2.48 ^a	0.04
Female	360	2.40 ^b	0.04
Season**			
HDS	233	2.40 ^b	0.04
RS	182	2.54 ^a	0.05
CDS	284	2.37 ^b	0.04
Birth type**			
1	450	2.58 ^b	0.04
2	249	2.29 ^a	0.04
Parity**			
1	361	2.30 ^b	0.03
2	176	2.43 ^a	0.04
3	109	2.51 ^a	0.06
4	53	2.52 ^a	0.08
Year of lambing**			
1986	58	2.19 ^c	0.09
1987	161	2.20 ^c	0.05
1988	106	2.33 ^{bc}	0.06
1989	151	2.56 ^a	0.05
1990	129	2.47 ^{ab}	0.05
1991	94	2.38 ^b	0.06

* p < 0.05, ** p < 0.0001

CDS: cold dry season, HDS: hot dry season, RS: rainy season
LSM with different superscripts are significantly different

Table III

LSM and SE of birth weight for significant two-factor interaction

Subclass	n	LSM (kg)	SE (kg)
Breed x season**			
M x HDS	134	1.98 ^c	0.06
M x RS	90	1.96 ^c	0.06
M x CDS	153	1.88 ^c	0.05
F x HDS	99	2.73 ^b	0.06
F x RS	92	3.09 ^a	0.07
F x CDS	131	2.81 ^b	0.06
Birth type x parity*			
1 x 1	241	2.39 ^b	0.04
1 x 2	116	2.50 ^a	0.05
1 x 3	69	2.63 ^a	0.07
1 x 4	24	2.77 ^a	0.12
2 x 1	120	2.19 ^b	0.05
2 x 2	60	2.12 ^b	0.08
2 x 3	40	2.34 ^b	0.09
2 x 4	29	2.24 ^b	0.10
Breed x parity*			
M x 1	205	1.91 ^c	0.04
M x 2	90	1.97 ^c	0.06
M x 3	55	1.93 ^c	0.08
M x 4	27	1.95 ^c	0.11
F x 1	156	2.67 ^b	0.05
F x 2	86	2.75 ^b	0.07
F x 3	54	3.04 ^a	0.09
F x 4	26	3.06 ^a	0.11
Breed x birth type*			
M x 1	197	2.09 ^c	0.04
M x 2	182	1.84 ^d	0.05
F x 1	255	3.16 ^a	0.03
F x 2	65	2.64 ^b	0.09

* p < 0.01, ** p < 0.0001

F: Fulbe, M: Massa, RS: rainy season, CDS: cold dry season, HDS: hot dry season
LSM within the same effects with different superscripts are significantly different

lambs ($p > 0.05$). The seasonal influence on birth weight may be caused by variations in the physical environment due to changes in the weather (long dry season), which directly affect feed availability. The impact on the nutritional status of the pregnant ewe becomes very stressful during the hot dry and cold dry seasons. This is passed to the lamb through the prenatal developmental environment. The non-significant season by breed effect on the Massa may be an indication that the breed has become really adjusted to the environmental conditions. Whereas parity by breed interaction did not affect birth weight of Massa lambs, heavier lambs were dropped by the third and fourth parity Fulbe ewes (table III). Single lambs were significantly heavier than twin lambs ($p < 0.001$) and this superiority prevails in all two-factor interactions. This could be caused by the limitation of the capacity of the ewe to provide prenatal nourishment for the fetuses. Although year of lambing was a significant source of variation of birth weight, years are not repeatable and their specific effects are of limited interest.

Mortality rates evaluated with the chi-square test are presented in table IV. The results indicate that the mortality rate between the

breeds was significantly different ($p < 0.05$). A higher neonatal mortality rate of 50.24 % was registered for the Fulbe compared to 49.76 % for the Massa breed. This higher mortality rate for the Fulbe breed was apparent even in the two-factor interactions, but for Fulbe by sex interaction (table IV). The lower mortality rate (expression of more adaptability) for the Massa may result from a high maternal instinct and rare cases of abandonment of the lambs by the Massa dams as reported by Deciry (4). The neonatal mortality rate for the Fulbe breed was quite high compared to that obtained by Njoya and Ngo Tama (13). This may be due to genotype environmental interaction and management differences. Sex of the lamb did not significantly affect the mortality rate ($p > 0.05$). Similar results have been obtained by Patil *et al.* (14). However, higher mortalities were observed in males than in females (51.42 vs. 48.58 %). Sex by breed significantly affected mortality ($p < 0.05$).

Season of lambing was highly significant on the mortality rate, with the highest mortalities occurring in the cold dry season (42.90 %). The lowest neonatal mortality (16.82 %) was observed during the rainy season when the heaviest lambs were produced.

Table IV

Neonatal mortality rate by breed, sex and season of lambing

Effect	Number lambed	Dead (0-7 days)	Mortality rate (%)	Level of reduction ¹
Overall mean (μ)	768	422	54.95	
Breed*				
Massa	422	210	49.76 ^b	5.19
Fulbe	346	212	50.24 ^a	4.71
Sex (ns)				
Male	382	217	51.42	
Female	386	205	48.58	
Season of lambing**				
RS	205	71	16.82 ^c	38.13
DCS	307	181	42.90 ^a	12.05
HDS	256	170	40.28 ^b	14.67
Breed x sex*				
Massa male	213	109	25.83 ^a	
Fulbe male	169	107	25.36 ^a	
Massa female	209	101	23.93 ^b	
Fulbe female	177	101	23.93 ^b	
Season x breed**				
RS x Massa	102	32	7.58 ^e	47.37
RS x Fulbe	104	39	9.24 ^d	45.71
DCS x Massa	142	89	21.09 ^a	33.86
DCS x Fulbe	164	92	21.80 ^a	33.15
HDS x Massa	145	83	19.67 ^a	35.28
HDS x Fulbe	111	87	20.62 ^b	34.33

¹ Percentage reduction in neonatal mortality under planned breeding.

RS: rainy season, DCS: dry cold season, HDS: hot dry season, mortality rates within the same effects with different superscripts are significantly different

(ns): $p > 0.05$ * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

This is equally indicative in season of lambing by breed. Consequently, if all lambings were planned to occur during specific seasons in order to eliminate the season of lambing effect, mortality could be reduced by 38.13 % (54.95-16.82), 14.67 % (54.95-40.28) and 12.05 % (54.95-42.90) (table IV) during the rainy, hot dry and cold dry seasons, respectively. Njoya and Ngo-Tama (13) recorded mortality reductions of 17.4 and 25.0 % through feed supplementation and prophylactic treatment, respectively. During the rainy and hot dry seasons, the Massa die less than during the cold dry season. This may suggest that the Massa survive better in a hot environment than the Fulbe, also indicating better adaptability to a stressful environment than the Fulbe, which may have arrived more recently. The very high neonatal mortality rate during the hot dry season could be attributed to inherent nutritional and climatic stress effects on the foetus, within the maternal uterine environment.

CONCLUSION AND RECOMMENDATION

Results indicate that breed and non-genetic factors significantly affect birth weight and neonatal mortality. Though the Fulbe breed has a higher birth weight than the Massa, the latter appears to be more adjusted to the hot dry environmental conditions. This is indicated by the significantly lower mortality rate in the main and subclass effects. Heavier lambs are produced in the rainy season and they survive better. High neonatal mortalities occur in the hot dry and cold dry seasons for both breeds. It may therefore be necessary that a management programme aimed at increasing productivity and production be planned for rainy season lambing.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Banser, Director of IRZV for authorizing the publication of this work. The contributions of Messrs. Bosch, Deciry, Asanji and Abakar towards data collection are equally acknowledged. The encouragement from Drs. Tanya, Chief of Centre, IRZV Wakwa, and Njoya, Chief of Station, IRZV Garoua and the critical review of the manuscript by Ngo-Tama of IRZV Garoua are equally greatly acknowledged.

REFERENCES

- BATHAEI S.S., LEROY P.L., 1994. Lamb growth performance and factors affecting body weight of Iranian fat-tailed Mehraban breed of sheep. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **47** (1): 113-116.
- CARDINALE E., NGO-TAMA A.C., NJOYA A., 1996. Elevage des petits ruminants. Connaissance et amélioration de la productivité. In: *Agricultures des savanes du Nord-Cameroun, communications présentées à l'atelier d'échange, Garoua, Cameroun, 25-29 novembre 1996*, p. 97-109.
- COURTIN C., 1986. Contribution à l'étude sérologique de maladies virales des petits ruminants du Nord-Cameroun. Thèse doct. vétérinaire, Ecole nationale vétérinaire, Maisons-Alfort, France, 131 p.
- DECIRY A., 1987. Contribution à l'étude des paramètres zootechniques des races ovines Massa, Fulbe et Djallonké dans l'Extrême-Nord Cameroun. Thèse doct. vétérinaire, Université de Paris Val-de-Marne, Créteil, France, 241 p.
- DEMEKE S., THWAITES C.J., LEMMA S., 1995. Effects of ewe genotype and supplementary feeding on lambing performance of Ethiopian highland sheep. *Small Ruminant Res.*, **15**: 149-153.
- DJEMALI M., ALOULOU R., BENSASSI M., 1994. Adjustment factors and genetic and phenotypic parameters for growth traits of Babarine lambs in Tunisia. *Small Ruminant Res.*, **13**: 41-47.
- EBANGI A.L., MBAH D.A., NGO-TAMA A.C., 1996. Impact of genetic and environmental factors on birth weight of Fulbe sheep in Cameroon. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **49**: 178-182.
- FALL A., DIOP M., SANFORD J., WISSOCQ Y.J., DURKIN J., TRAIL J.C.M., 1981. Evaluation of the productivities of Djallonké sheep and Ndama cattle at the Centre de Recherches Zootechniques, Kolda, Sénégal. (Research Report No. 3).
- INYANGALA B.A.O., REGE G.A.O., ILTUYA S., 1991. Growth traits of the Dorper sheep 1. Factors influencing growth traits. In: Proc. 1st Biennial Conference of the African Small Ruminant Research Network, Nairobi, Kenya, December 10-14, 1990. Nairobi, Kenya, ILRAD, p. 505-514.
- KIRO P.M., 1994. Estimate of genetic and phenotypic parameters for Dorper, Red Massai and their crosses. In: Proc. 2nd Biennial Conference of African Small Ruminant Res. Network, Arusha, Tanzania, December 7-11, 1992, p. 229-234.
- MANYUCHI B., TAWONEZI H.P.R., CHIWARA R.M., 1991. Breed and environmental influences on weaner lamb production in Zimbabwe. *Trop. Anim. Health Prod.*, **23**: 115-125.

12. MEAD R., CURNOW R.N., 1983. Statistical methods in agriculture and experimental biology. London, United Kingdom, Longman, p. 223-229.
13. NJOYA A., NGO-TAMA A.C., 1993. Incidence de la complémentation protéique et des traitements prophylactiques sur les paramètres de reproduction des brebis Foulbé et la mortalité périnatale des agneaux. Garoua, Cameroun, IRZV, 89 p. (Rapport annuel)
14. PATIL N.A., PRASANNAKUMAR S., MALLIKARJUNAPPA S., 1992. Mortality in Southdown, Decca and Bannur crossbred lambs. *Indian J. Anim. Sci.*, **62** (2): 175-176.
15. RAJAB M.H., CARTWRIGHT T.C., DAHM P.F., FIGEIREDO E.A.P., 1992. Performance of three tropical hair sheep breeds. *J. Anim. Sci.*, **70**: 3351-3359.
16. SAS, 1987. SAS/STAT Guide for personal computers, 7th ed.
17. YAPI C.V., 1994. Caractères phénotypiques de différenciation et de croissance des agneaux de race pure Djallonké et croisés Sahélien x Djallonké. In: Proc. 2nd Biennial conference of the African Small Ruminant Res. Network, Arusha, Tanzania, December 7-11, 1992, p. 215-219.

Reçu le 6.11.96, accepté le 24.4.97

Résumé

Ebangi A.L., Nwakalor L.N., Mbah D.A., Abba D. Facteurs affectant le poids à la naissance et la mortalité néonatale chez les moutons Massa et Foulbé dans un environnement chaud et sec au Cameroun

De 1986 à 1991, les données relatives au poids à la naissance et à la mortalité néonatale ont été recueillies sur 377 et 422 agneaux de race Massa et Foulbé. Ces données provenaient des populations d'origine, élevées à la Station de Recherches Zootechniques de Yagoua, Cameroun. Le modèle linéaire général (GLM) et χ^2 ont été utilisés pour analyser les données et pour identifier et quantifier les facteurs affectant le poids à la naissance et la mortalité natale. Les résultats ont montré qu'à la naissance les effets suivants étaient très significatifs ($p < 0,001$) : la race, la saison et l'année de naissance, le type de naissance, la parité, les interactions saison-race et saison-année de naissance. Les interactions race-parité, race-type de naissance, type de naissance-parité étaient également significatives quant aux variations de poids à la naissance. Bien que la race Foulbé ait présenté un poids à la naissance significativement plus élevé que celui de la race Massa (2,88 vs. 1,99 kg), la mortalité était significativement plus faible chez cette dernière (49,76 vs. 50,24 p. 100). La mortalité était significativement plus faible pendant la saison pluvieuse (16,82 p. 100) que pendant la saison sèche froide (42,90 p. 100) et la saison sèche chaude (40,28 p. 100). La race Massa, malgré son faible poids à la naissance, était mieux adaptée que la race Foulbé à l'environnement chaud et sec. Une programmation des naissances en saison pluvieuse permettrait ainsi d'accroître productivité et production de ces deux races.

Mots-clés : Ovin - Mouton Massa - Mouton Foulbé - Agneau - Facteur du milieu - Race - Adaptation - Saison - Poids à la naissance - Mortalité - Analyse statistique - Cameroun.

Resumen

Ebangi A.L., Nwakalor L.N., Mbah D.A., Abba D. Factores que afectan el peso al nacimiento y la mortalidad neonatal de las ovejas Massa y Fulbe en un medio caliente y seco en Camerún

Entre 1986 y 1991, se recolectaron datos a partir de 377 corderos Massa y 422 Fulbe, para los pesos al nacimiento y la mortalidad neonatal. Los datos fueron obtenidos al azar a partir de poblaciones mantenidas en la Unidad de Investigación Animal, Yagoua, Camerún. Los datos se analizaron mediante GLM y chi-cuadrado, con el fin de identificar y cuantificar los factores que afectan el peso al nacimiento y la mortalidad neonatal. Los resultados indican un efecto altamente significativo ($p < 0,001$) sobre el peso al nacimiento de la raza, estación y año de nacimiento, tipo de parto, paridad, estación por raza y estación por año de parto. Otros factores significativos de variación para el peso al nacimiento fueron la raza por paridad, raza por tipo de parto, tipo de parto por paridad ($p < 0,01$). A pesar de que la raza Fulbe presentó un peso al nacimiento significativamente más elevado que la Massa (2,88 vs. 1,99 kg), la mortalidad en esta última fue significativamente más baja (49,76 vs. 50,24 p. 100). La mortalidad fue significativamente más baja durante la estación lluviosa (16,82 p. 100) que durante la estación fría y seca (42,90 p. 100) y la seca y caliente (40,28 p. 100). La raza Massa, aunque con un peso al nacimiento menor, está más adaptada al medio caliente y seco que la Fulbe. Sin embargo, la programación de los partos para la estación lluviosa podría aumentar la productividad y la producción de ambas razas.

Palabras clave: Ovino Massa - Ovino Fulbe - Cordero - Factor ambiental - Raza - Adaptación - Estación - Peso al nacimiento - Mortalidad - Análisis estadístico - Camerún.

■ Index 1996 des auteurs

- Abba, D.
n°4 p.349-353
- Abba, S.
n°3 p.253-255
- Abbas, S.I.
n°2 p.108-109
- Abdoulkadiri, S.
n°1 p.18-22
- Abraham, A.
n°4 p.299-302
- Adamou N'Diaye, M.
n°2 p.174-177
- Adesiyun, A.A.
n°1 p.28-30, n°4 p.303-309
- Adeyefa, C.A.O.
n°1 p.24-27, n°4 p.295-298
- Adjovi, A.
n°2 p.174-177
- Aguiar, P.H.P.
n°3 p.195-197
- Algazi, R.
n°4 p.299-302
- Alonso, M.
n°3 p.223-225
- Ataja, A.M.
n°3 p.257-262
- Baars, R.M.T.
n°3 p.243-251
- Bah, G.S.
n°3 p.263-265
- Barreto Filho, J.B.
n°3 p.195-197
- Bengaly, Z.
n°1 p.32-37
- Bengoumi, M.
n°4 p.347-348
- Bernardo, F.M.A.
n°2 p.102-106
- Bialota, F.
n°2 p.141-148
- Blandino, T.
n°3 p.223-225
- Bossy, J.P.
n°2 p.141-148
- Bouchel, D.
n°1 p.80-90
- Brando, C.F.S.N.
n°2 p.102-106
- Buldgen, A.
n°2 p.98-101
- Büscher, Ph.
n°3 p.207-211
- Castro, R.S.
n°3 p.195-197
- Cazabon, E.P.I.
n°1 p.28-30
- Cora, M.
n°1 p.74-75
- Corniaux, C.
n°1 p.60-67, n°2 p.158-166
- Cuisance, D.
n°1 p.46-48, n°2 p.132-140, n°2 p.141-148
- Cullinane, A.A.
n°1 p.24-27
- D'Amico, F.
n°2 p.141-148
- Dachet, P.
n°2 p.98-101
- Daget, P.
n°1 p.70-71, n°1 p.72-73, n°1 p.74-75, n°1 p.76-78
- Dagnogo, M.
n°1 p.50-54
- Danthu, P.
n°3 p.235-242
- Deconinck, P.
n°1 p.38-40
- Dehoux, J.P.
n°2 p.98-101
- Delafosse, A.
n°1 p.32-37

- Demandiere, J.M.
n°4 p.279-283
- Desquesnes, M.
n°4 p.315-321, n°4 p.322-327
- Diallo, A.
n°4 p.273-277
- Diallo, B.O.
n°4 p.273-277
- Dieng, A.
n°2 p.98-101
- Doko, A.
n°3 p.207-211
- Dorchies, P.
n°1 p.38-40, n°3 p.219-221
- Durand, N.
n°1 p.60-67
- Duvallet, G.
n°1 p.32-37
- Ebangi, A.L.
n°2 p.178-182, n°4 p.349-353
- Esievo, K.A.N.
n°3 p.263-265
- Fajimi, J.L.
n°1 p.6-16
- Fregel, N.
n°3 p.223-225
- Frézil, J.L.
n°2 p.132-140
- Friot, D.
n°3 p.235-242
- Gall, C.F.
n°4 p.341-346
- Geoffroy, B.
n°1 p.46-48, n°2 p.141-148
- Gidudu, A.M.
n°2 p.132-140
- Gitego, A.
n°1 p.38-40
- Gouteux, J.P.
n°2 p.130-131
- Guerin, H.
n°1 p.60-67, n°2 p.158-166
- Guerre, L.
n°3 p.189-194
- Gueye, L.
n°2 p.98-101
- Hamblin, C.
n°1 p.24-27
- Hamet, M.
n°1 p.18-22
- Hassan, S.U.
n°2 p.110-113
- Hounzangbe-Adote, M.S.
n°2 p.150-156
- Ickowicz, A.
n°3 p.235-242
- Igbokwe, I.O.
n°2 p.110-113, n°3 p.263-265
- Jochems, M.
n°3 p.199-206
- Jondet, R.
n°2 p.174-177
- Jong, R. de
n°3 p.243-251
- Kageruka, P.
n°3 p.199-206
- Kalu, A.U.
n°3 p.213-217
- Kaminjolo, J.S.
n°4 p.303-309
- Kamwendo, S.P.
n°1 p.42-45
- Kangni, T.
n°4 p.341-346
- Kanhai, G.K.
n°1 p.42-45
- Katunguka-Rwakishaya, E.
n°1 p.56-58, n°4 p.311-314
- Kazadi, J.M.
n°3 p.199-206
- Konaté, T.S.
n°1 p.72-73
- Koné, M.
n°1 p.50-54

- La Rocque, S. de
n°1 p.46-48
- Lage, A.P.
n°3 p.195-197
- Landais, E.
n°2 p.168-173
- Lauvergne, J.J.
n°1 p.80-90
- Lawani, F.A.
n°3 p.213-217
- Leite, R.C.
n°3 p.195-197
- Lejon, V.
n°3 p.207-211
- León, A.
n°3 p.229-234
- Losson, B.
n°3 p.199-206
- Magassouba, B.
n°4 p.289-293
- Mandret, G.
n°4 p.335-339
- Manga, D.
n°3 p.235-242
- Manjeli, Y.
n°3 p.253-255
- Mbah, D.A.
n°2 p.178-182, n°4 p.349-353
- McCauley, J.W.
n°1 p.24-27
- Mellor, P.S.
n°4 p.285-288
- Melo, M.I.V.
n°3 p.195-197
- Mendoza, E.
n°3 p.223-225
- Mensah, G.A.
n°4 p.341-346
- Mercier, P.
n°4 p.279-283
- Meyer, C.
n°2 p.150-156
- Meyer, H.
n°2 p.114-120
- Mohamed, M.E.H.
n°4 p.285-288
- Mourad, M.
n°4 p.289-293
- Mpoame, M.
n°3 p.227-228
- Munz, E.
n°2 p.114-120
- Musisi, F.L.
n°1 p.42-45
- Mzoma, F.J.
n°1 p.42-45
- Ngangnou, A.
n°1 p.18-22
- Ngo Tama A.C.
n°2 p.178-182
- Nguyen-Ba-Vy
n°3 p.189-194, n°4 p.279-283
- Njuguna, L.M.
n°1 p.42-45
- Njwe, R.M.
n°3 p.253-255
- Nwakalor, L.N.
n°4 p.349-353
- Nyska, A.
n°4 p.299-302
- Obagaiye, O.K.
n°3 p.263-265
- Olaleye, O.D.
n°1 p.6-16
- Otterbein, C.K.
n°2 p.114-120
- Ouattara, L.
n°3 p.219-221
- Ouragh, L.
n°4 p.347-348
- Pandey, V.S.
n°3 p.207-211
- Pangui, L.J.
n°1 p.38-40

- Picard, M.
n°3 p.229-234
- Quiroga, J.C.
n°1 p.42-45
- Rabo, J.S.
n°2 p.110-113
- Ravallec, M.
n°2 p.141-148
- Reifenberg, J.M.
n°2 p.132-140
- Renner-Müller, I.C.E.
n°2 p.114-120
- Rodriguez Diego, J.G.
n°3 p.223-225
- Romain, H.
n°4 p.303-309
- Rudeaux, F.
n°3 p.229-234
- Saint-Martin, G.
n°3 p.189-194
- Salako, M.A.
n°2 p.110-113
- Samake, K.
n°4 p.273-277
- Saror, D.I.
n°3 p.263-265
- Sarr, A.
n°3 p.235-242
- Sarraihl, J.M.
n°1 p.60-67
- Schmitz, H.
n°1 p.6-16
- Schwarzenberg, A.
n°4 p.341-346
- Seoane, G.
n°3 p.223-225
- Sidibe, S.
n°4 p.273-277
- Steingass, H.
n°2 p.158-166
- Stier, C.H.
n°4 p.341-346
- Tassin, J.
n°4 p.335-339
- Taylor, W.P.
n°4 p.285-288
- Tchoumboué, J.
n°3 p.227-228, n°3 p.253-255
- Teguia, A.
n°3 p.253-255
- Tomori, O.
n°1 p.6-16
- Toukara, K.
n°4 p.273-277
- Tourrand, J.-F.
n°2 p.168-173
- Traore, A.
n°4 p.273-277
- Traore, A.P.
n°4 p.273-277
- Traoré, G.
n°1 p.50-54
- Tresse, L.
n°4 p.315-321, n°4 p.322-327
- Uilenberg, G.
n°2 p.124-129
- Uko, O.J.
n°3 p.257-262
- Van Hees, J.
n°3 p.199-206
- Van den Bossche, P.
n°4 p.329-333
- Verhulst, A.
n°3 p.207-211
- Vilariño, M.
n°3 p.229-234
- Webb, L.A.
n°4 p.303-309
- Yerbanga, E.
n°4 p.279-283
- Yeruham, I.
n°4 p.299-302
- Zoyem, N.
n°1 p.18-2
- Zwart, D.
n°3 p.243-251

■ Index 1996 des mots-clés

- ABATTOIR
n°2 p.102-106
- ACIDE ASCORBIQUE
n°3 p.263-265
- ADAPTATION
n°4 p.349-353
- AGGLUTININE
n°1 p.28-30
- AGNEAU
n°4 p.311-314, n°4 p.349-353
- AILE
n°1 p.46-48, n°2 p.141-148
- ALIMENTATION DES ANIMAUX
n°2 p.168-173, n°3 p.199-206
- AMPLIFICATION CHAÎNE POLYMERASE
n°4 p.322-327
- ANALYSE D'IMAGE
n°1 p.46-48
- ANALYSE ECONOMIQUE
n°3 p.243-251
- ANALYSE STATISTIQUE
n°1 p.42-45, n°2 p.158-166, n°2 p.178-182, n°4 p.349-353
- ANE
n°1 p.24-27, n°1 p.38-40
- ANIMAL A VIANDE
n°1 p.28-30
- ANTHELMINTHIQUE
n°2 p.150-156
- ANTICORPS
n°3 p.189-194, n°4 p.273-277, n°4 p.279-283, n°4 p.285-288
- ANTICORPS MONOCLONAL
n°1 p.24-27
- ANTIGENE
n°1 p.32-37, n°3 p.207-211, n°4 p.295-298
- ANUS
n°2 p.132-140
- APPLICATION LOCALE
n°4 p.329-333
- APTITUDE A LA CONSERVATION
n°4 p.279-283
- ASSOCIATION AGRICULTURE ELEVAGE
n°3 p.243-251
- ATTRACTIF
n°1 p.50-54
- BACTERIOSE
n°2 p.110-113, n°2 p.98-101
- BETAIL
n°3 p.243-251, n°4 p.322-327
- BIOCHIMIE
n°3 p.257-262
- BIOMASSE
n°1 p.70-71
- BOVIN
n°1 p.18-22, n°1 p.32-37, n°1 p.42-45, n°2 p.102-106, n°2 p.108-109, n°2 p.174-177, n°3 p.207-211, n°3 p.213-217, n°3 p.235-242, n°3 p.243-251, n°3 p.263-265, n°4 p.273-277, n°4 p.285-288, n°4 p.299-302
- BOVIN BORGOU
n°2 p.174-177, n°3 p.207-211
- BOVIN DES LAGUNES
n°3 p.207-211
- BOVIN FRISON
n°2 p.108-109
- BOVIN N'DAMA
n°4 p.289-293
- BREBIS
n°2 p.150-156
- BRUCELLA ABORTUS
n°1 p.28-30
- BUFFLE D'EAU
n°3 p.195-197
- CALLIANDRA CALOTHYRSUS
n°4 p.335-339
- CAMPYLOBACTER
n°4 p.303-309
- CAPRIN
n°1 p.56-58, n°1 p.80-90, n°2 p.168-173, n°3 p.213-217, n°3 p.235-242, n°4 p.273-277, n°4 p.285-288, n°4 p.335-339

CAPTIVITE n°4 p.341-346	DETERMINATION DE L'AGE n°1 p.46-48
CARTOGRAPHIE n°1 p.80-90	DIAGNOSTIC n°1 p.32-37, n°3 p.219-221, n°4 p.295-298, n°4 p.322-327
CATALASE n°4 p.347-348	DIAPAUSE n°1 p.38-40
CENTRIFUGATION n°4 p.315-321, n°4 p.322-327	DIARRHEE n°3 p.195-197
CHAMEAU n°2 p.114-120	DIGESTIBILITE n°1 p.60-67, n°2 p.158-166, n°3 p.229-234
CHEVAL n°1 p.24-27, n°4 p.295-298	DOMESTICATION n°1 p.80-90
CHIMIORECEPTEUR n°2 p.141-148	DROMADAIRE n°2 p.114-120, n°3 p.189-194, n°4 p.347-348
CLASSIFICATION n°1 p.60-67	EAU USEE n°4 p.303-309
COCCIDIA n°3 p.227-228	ECONOMIE AGRICOLE n°3 p.243-251
COCHLIOMYIA HOMINIVORAX n°3 p.223-225	EIMERIA n°3 p.227-228
COMPLEMENTATION n°2 p.168-173	ELEVAGE n°2 p.168-173
COMPOSITION CHIMIQUE n°1 p.60-67, n°2 p.158-166, n°3 p.229-234	ELEVAGE EXTENSIF n°3 p.257-262
COMPOSITION DU SANG n°3 p.257-262, n°3 p.263-265, n°4 p.311-314	ENDEMIIE n°1 p.56-58
CONTAMINATION n°4 p.303-309	ENQUETE n°1 p.18-22, n°1 p.24-27, n°4 p.273-277
CONTROLE DE MALADIE n°2 p.124-129	ENQUETE PATHOLOGIQUE n°1 p.24-27, n°2 p.102-106
COQ n°3 p.229-234	ENVIRONNEMENT n°2 p.124-129
COUT n°2 p.124-129, n°3 p.243-251	EPIDEMIE n°2 p.110-113, n°2 p.98-101
COXIELLA BURNETII n°1 p.28-30	EPIDEMIOLOGIE n°1 p.24-27, n°1 p.32-37, n°2 p.102-106, n°3 p.213- 217, n°4 p.273-277, n°4 p.299-302
CRYPTOSPORIDIUM n°4 p.303-309	EPREUVE D'HEMAGGLUTINATION n°1 p.24-27
DELTAMETHRINE n°4 p.329-333	ERYTHROCYTE n°3 p.263-265
DENT n°4 p.341-346	

- ESCHERICHIA COLI
n°2 p.110-113
- ESPACEMENT
n°4 p.335-339
- EXCRETION
n°3 p.235-242
- EXPERIMENTATION EN LABORATOIRE
n°4 p.329-333
- EXPERIMENTATION IN VITRO
n°2 p.114-120
- EXPERIMENTATION IN VIVO
n°2 p.114-120
- EXPLOITATION LAITIERE
n°4 p.303-309
- FACTEUR DU MILIEU
n°4 p.349-353
- FECES
n°3 p.227-228, n°4 p.303-309
- FIEVRE CATARRHALE DU MOUTON
n°3 p.195-197
- FREQUENCE DES REPAS
n°3 p.199-206
- GERME DE CERERALE
n°3 p.229-234
- GERMINATION
n°3 p.235-242
- GLOSSINA
n°2 p.130-131, n°3 p.213-217
- GLOSSINA FUSCIPES FUSCIPES
n°2 p.130-131
- GLOSSINA MORSITANS
n°2 p.132-140
- GLOSSINA PALLIDIPES
n°2 p.141-148
- GLOSSINA PALPALIS
n°1 p.50-54, n°3 p.199-206
- GLOSSINA TACHINOIDES
n°1 p.46-48, n°2 p.132-140, n°4 p.329-333
- GLUTATHION
n°3 p.263-265
- GRAINE
n°3 p.235-242
- GROUPE D'AGE
n°4 p.289-293
- HEMATOCRITE
n°3 p.263-265, n°4 p.315-321
- HEMATOLOGIE
n°3 p.257-262
- HEMOGLOBINE
n°3 p.263-265
- HERITABILITE
n°2 p.178-182
- HERPESVIRUS BOVIN
n°3 p.195-197
- HOMME
n°1 p.50-54
- HUMIDITE
n°3 p.227-228
- IDENTIFICATION
n°2 p.108-109, n°2 p.132-140
- IMMUNISATION
n°1 p.42-45
- IMMUNITE
n°4 p.279-283
- IMMUNOLOGIE
n°1 p.24-27, n°4 p.273-277
- INFECTION
n°4 p.311-314
- INFECTION EXPERIMENTALE
n°1 p.42-45, n°1 p.6-16, n°3 p.207-211
- INFESTATION
n°1 p.32-37, n°3 p.227-228
- INFLUENZAVIRUS EQUIN
n°1 p.24-27
- INGESTION DE SUBSTANCES NUTRITIVES
n°4 p.335-339
- INSECTICIDE
n°4 p.329-333
- INSEMINATION ARTIFICIELLE
n°2 p.174-177
- INTERVALLE ENTRE PARTURITIONS
n°2 p.150-156, n°2 p.178-182
- INVENTAIRE
n°1 p.72-73, n°1 p.74-75

IXODIDAE n°1 p.42-45	MORBILLIVIRUS n°1 p. 18-22, n°4 p.273-277
KLEBSIELLA PNEUMONIAE n°2 p.98-101	MORTALITE n°4 p.289-293, n°4 p.349-353
LAIT n°4 p.303-309	MOUTON DJALLONKE n°1 p.6-16, n°2 p.150-156, n°3 p.219-221
LAPIN (ORYCTOLAGUS) n°2 p.98-101	MOUTON FOULBE n°2 p.178-182, n°4 p.349-353
LARVE n°1 p.38-40	MOUTON MASSA n°4 p.349-353
LEGUMINEUSE n°3 p.235-242	MOUTON OUDAH n°1 p.6-16
LESION n°2 p.110-113	MOUTON SAHELIEN n°3 p.219-221
LISTERIA MONOCYTOGENES n°4 p.303-309	MOUTON YANKASA n°1 p.6-16
LUTTE ANTIINSECTE n°4 p.329-333	MYCOPLASMA BOVIS n°2 p.108-109
MAIS n°3 p.229-234	MYIASE n°3 p.219-221
MALADIE DE GUMBORO n°2 p.110-113	NUTRITION n°4 p.329-333
MALADIE DE NEWCASTLE n°4 p.279-283	OESTRIDAE n°1 p.38-40
MALADIE DES MUQUEUSES n°3 p.195-197	OESTRUS OVIS n°3 p.219-221
MALADIE TRANSMISE PAR VECTEUR n°3 p.213-217	OREILLE n°1 p.80-90.
MAMMITE n°2 p.108-109	ORGANE DES SENS n°2 p.141-148
MATIERE AZOTEE DIGESTIBLE n°2 p.158-166	ORTHOPOXVIRUS n°2 p.114-120, n°4 p.299-302
MATIERE ORGANIQUE n°2 p.158-166	OVIN n°1 p.56-58, n°1 p.6-16, n°2 p.150-156, n°2 p.178-182, n°3 p.213-217, n°3 p.219-221, n°3 p.235-242, n°4 p.273-277, n°4 p.285-288, n°4 p.311-314, n°4 p.315-321, n°4 p.322-327, n°4 p.349-353
MESURE n°1 p.70-71, n°1 p.76-78	PALMISTE n°3 p.229-234
METHODE DE LUTTE ANTIPARASITE n°4 p.329-333	PARASITOSE n°2 p.124-129
MICROSCOPIE n°4 p.299-302	PARTURITION n°4 p.289-293
MORBIDITE n°1 p.28-30, n°4 p.273-277	

- PASTEURELLA MULTOCIDA
n°2 p.98-101
- PATURAGE
n°1 p.76-78.
- PATURAGES
n°1 p.60-67, n°1 p.70-71, n°1 p.72-73, n°1 p.74-75.
- PERFORMANCE DE LA REPRODUCTION
n°2 p.150-156
- PERIODICITE
n°3 p.227-228
- PESTE BOVINE
n°1 p.18-22, n°4 p.273-277
- PIEGE
n°1 p.50-54, n°2 p.130-131
- PINTADE
n°3 p.257-262
- PLANTE D'ABROUTISSEMENT
n°1 p.60-67, n°4 p.335-339
- PLANTE LIGNEUSE
n°1 p.60-67, n°1 p.74-75, n°1 p.76-78, n°2 p.158-166, n°3 p.235-242
- PLASMA SANGUIN
n°3 p.263-265, n°4 p.315-321, n°4 p.322-327
- POIDS A LA NAISSANCE
n°2 p.178-182, n°4 p.349-353
- POLYCULTURE ELEVAGE
n°3 p.243-251, n°4 p.335-339
- POLYMORPHISME
n°4 p.347-348
- POPULATION
n°1 p.80-90
- PORCIN
n°1 p.50-54, n°1 p.56-58.
- POULET
n°2 p.110-113, n°3 p.227-228, n°3 p.257-262
- POULET DE CHAIR
n°4 p.279-283
- POXVIRIDAE
n°3 p.189-194
- PRELEVEMENT SANGUIN
n°1 p.32-37
- PREVALENCE
n°2 p.102-106
- PRODUCTIVITE
n°2 p.168-173
- PROTECTION INTEGREE
n°2 p.124-129
- PROTEINE SANGUINE
n°4 p.311-314, n°4 p.347-348
- PROVENANCE
n°1 p.80-90, n°4 p.335-339
- PSEUDOMONAS
n°2 p.98-101
- RACE
n°4 p.349-353
- REACTION DE NEUTRALISATION
n°4 p.285-288
- RECENSEMENT
n°1 p.74-75, n°1 p.80-90
- RENTABILITE
n°2 p.124-129
- RESISTANCE AUX PRODUITS CHIMIQUES
n°2 p.124-129
- RESSOURCE GENETIQUE
n°1 p.80-90
- REVENU
n°3 p.243-251
- RHINOESTRUS USBEKISTANICUS
n°1 p.38-40
- RUMINANT
n°1 p.60-67
- SAISON
n°4 p.279-283, n°4 p.349-353
- SAISON CHAUDE
n°4 p.289-293
- SAISON HUMIDE
n°2 p.98-101, n°4 p.289-293
- SALIVE
n°2 p.132-140
- SALMONELLA
n°2 p.102-106, n°4 p.303-309
- SANTE ANIMALE
n°4 p.341-346

- SAVANE
n°1 p.72-73
- SEPTICEMIE
n°1 p.6-16, n°2 p.110-113
- SEROLOGIE
n°1 p.24-27, n°1 p.28-30, n°1 p.32-37, n°3 p.219-221
- SERUM SANGUIN
n°4 p.285-288
- SOUCHE (ORGANISME)
n°1 p.6-16
- SPERME
n°2 p.174-177
- STOMOXYIS NIGRA
n°2 p.141-148
- SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE
n°1 p.32-37, n°3 p.223-225, n°4 p.295-298
- TABANIDAE
n°3 p.213-217
- TANNIN
n°4 p.335-339
- TEST ELISA
n°1 p.18-22, n°1 p.24-27, n°1 p.32-37, n°3 p.207-211, n°3 p.219-221, n°4 p.273-277, n°4 p.295-298
- THEILERIA PARVA
n°1 p.42-45
- THEILERIOSE
n°1 p.42-45
- THERAPEUTIQUE
n°2 p.150-156
- THRYONOMYS SWINDERIANUS
n°4 p.341-346
- TOURTEAU D'OLEAGINEUX
n°3 p.229-234
- TOXOPLASMA GONDII
n°1 p.28-30
- TROUPEAU
n°4 p.273-277, n°4 p.299-302.
- TRYPANOSOMA
n°1 p.32-37
- TRYPANOSOMA BRUCEI
n°1 p.56-58, n°3 p.199-206, n°3 p.207-211.
- TRYPANOSOMA BRUCEI RHODESIENSE
n°1 p.56-58
- TRYPANOSOMA CONGOLENSE
n°1 p.56-58, n°2 p.132-140, n°4 p.311-314.
- TRYPANOSOMA VIVAX
n°1 p.56-58, n°3 p.213-217, n°4 p.315-321, n°4 p.322-327
- TRYPANOSOMOSE
n°1 p.32-37, n°1 p.56-58, n°3 p.207-211, n°3 p.213-217
- TYOLOGIE
n°1 p.60-67
- USURE
n°4 p.341-346
- VACCIN
n°1 p.18-22, n°3 p.189-194, n°4 p.279-283
- VACCINATION
n°2 p.110-113, n°2 p.98-101
- VACHE
n°4 p.285-288
- VACHE LAITIERE
n°2 p.108-109, n°4 p.303-309
- VALEUR ENERGETIQUE
n°3 p.229-234
- VALEUR NUTRITIVE
n°1 p.60-67, n°2 p.158-166, n°4 p.335-339
- VARIATION SAISONNIERE
n°1 p.50-54, n°3 p.213-217
- VEAU
n°4 p.285-288, n°4 p.289-293
- VECTEUR DE MALADIE
n°3 p.199-206
- VIROSE
n°1 p.6-16, n°2 p.114-120, n°3 p.195-197
- VIRUS AKABANE
n°4 p.285-288
- VIRUS FIEVRE DE LA VALLEE DU RIFT
n°1 p.6-16
- VIRUS PESTE EQUINE AFRICAINE
n°4 p.295-298
- VITAMINE C
n°4 p.341-346
- VOLAILLE
n°2 p.110-113, n°3 p.227-228, n°3 p.229-234, n°3 p.257-262, n°4 p.279-283

YERSINIA ENTEROCOLITICA
n°4 p.303-309

ZEBU
n°1 p.42-45, n°3 p.207-211

ZEBU BORORO
n°3 p.207-211

ZEBU WADARA
n°3 p.263-265

■ Index 1996 géographique

AFRIQUE
n°1 p.80-90

ALLEMAGNE
n°4 p.341-346

BENIN
n°2 p.150-156, n°2 p.174-177, n°3 p.207-211, n°4
p.341-346

BRESIL
n°3 p.195-197

BURKINA FASO
n°1 p.32-37, n°3 p.219-221, n°4 p.279-283

CAMEROUN
n°1 p.18-22, n°2 p.178-182, n°3 p.227-228, n°4
p.349-353

COTE D'IVOIRE
n°1 p.50-54

CUBA
n°3 p.223-225

ECOSSE
n°4 p.311-314

GUINEE
n°4 p.289-293

GUINEE BISSAU
n°2 p.102-106

GUYANE FRANCAISE
n°4 p.315-321, n°4 p.322-327

ISRAEL
n°4 p.299-302

MALAWI
n°1 p.42-45

MALI
n°4 p.273-277

MAROC
n°4 p.347-348

MAURITANIE
n°3 p.189-194

NIGERIA
n°1 p.24-27, n°1 p.6-16, n°2 p.110-113, n°3
p.213-217, n°3 p.257-262, n°3 p.263-265, n°4
p.295-298

NOUVELLE CALEDONIE
n°1 p.60-67, n°2 p.158-166

OUGANDA
n°1 p.56-58

PAYS EN DEVELOPPEMENT
n°2 p.124-129

REPUBLIQUE CENTRAFRICAINE
n°2 p.130-131

REUNION n°4 p.335-339

SENEGAL
n°1 p.38-40, n°2 p.168-173, n°2 p.98-101, n°3
p.235-242

SOUDAN
n°2 p.108-109, n°4 p.285-288

TRINITE ET TOBAGO
n°1 p.28-30, n°4 p.303-309

VENEZUELA
n°3 p.229-234

ZAMBIE
n°3 p.243-251