

CUNICULTURE Magazine

Volume 30 (année 2003) pages 64-74

Résumés des communications présentées lors des 10^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole dans la section « Pathologie »

Présidents de séance : Mr Jean-Marie AYNAUD (INRA) et Mme Michèle GUITTET (AFSSA)

Lors de cette séance, **19 communications** ont été présentées.

Les **8 premières** étaient consacrées à divers sujets de pathologie générale.

Les **11 suivantes** ont été consacrées à divers sujets en relation directe avec l'Entéropathie Epizootique du Lapin (EEL)

Le document papier contenant le texte intégral des communications (et un résumé en anglais) est disponible à l'adresse suivante : *ITAVI, Service Documentation, 28 rue du Rocher, 75008 Paris*, au prix de 35 €uros.

En outre, un CD Rom a été gravé par les organisateurs des journées pour y réunir le texte complet de TOUTES les communications présentées depuis 1973 lors des 10 journées de la Recherche Cunicole successives. Ce CD Rom est aussi disponible à l'ITAVI au prix de 35 €uros.

N. BENNEGADI¹, T. GIDENNE¹, D. LICOIS², 2003. Incidence du statut microbien de lapins "conventionnel vs. EOPS" sur l'activité microbienne caecale. Interaction avec la teneur en fibres alimentaires. *10èmes Journ. Rech. Cunicole, INRA-ITAVI, 19-20/nov/2003, Paris, ITAVI éd. Paris, 207-210.*

1 - INRA, Station de Recherches Cunicoles, BP 27, 31326 Castanet-Tolosan, France

2 - INRA, BASE, équipe pathologie cunicole, 37380 Nouzilly, France

Des lapins conventionnels ont été comparés à des lapins exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) sur leur activité microbienne caecale, en relation avec le niveau de fibres de l'aliment (Témoin " T ", Acid Detergent Fibre=19% ; Déficient " D ", ADF=9%). Les deux aliments ont été distribués à volonté à deux groupes de 80 lapins conventionnels et 72 lapins EOPS entre 28 et 70 jours d'âge. A 10 semaines d'âge, les lapins conventionnels recevant l'aliment T ont dans leur ensemble une activité cellulolytique et pectinolytique 2 fois plus élevées ($P < 0,05$) que ceux recevant l'aliment D. Alors que chez les lapins EOPS, l'activité fibrolytique est similaire avec les deux aliments, les activités cellulases et hémicellulases sont globalement 2 à 3 fois plus élevées chez les lapins conventionnels comparativement aux lapins EOPS. La concentration caecale en acides gras volatils totaux (AGVt) est 2 fois plus faible chez les lapins EOPS que chez les lapins T : 37,9 vs 73,0 mmoles/litre. Avec l'aliment D, la concentration en AGVt et la proportion d'acétate baissent respectivement de 10 et 8%, et celle de butyrate augmente de 37% (20,2% vs 14,8% de AGVt), indépendamment du statut microbien.

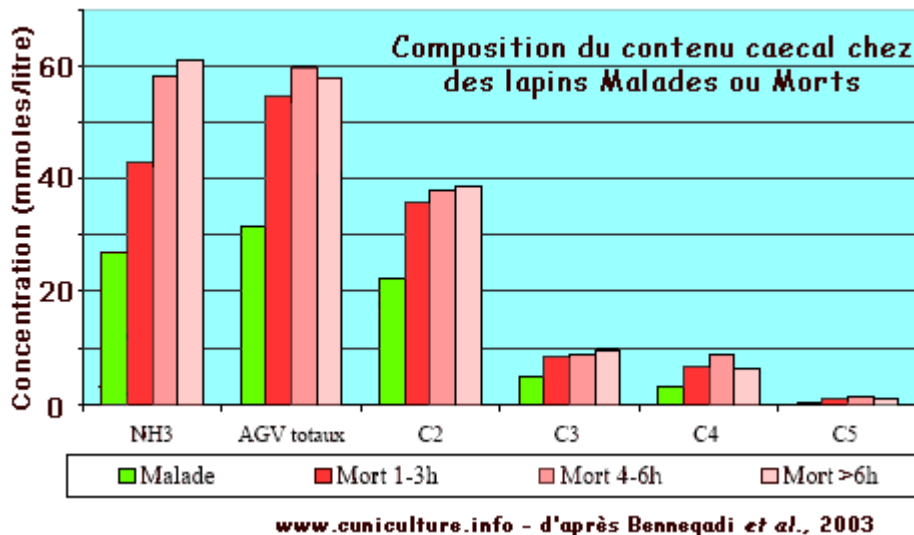
N. BENNEGADI¹, T. GIDENNE¹, D. LICOIS², 2003. Conséquences d'une entéropathie d'origine nutritionnelle sur l'activité microbienne caecale du lapin en croissance. *10èmes Journ. Rech. Cunicole, INRA-ITAVI, 19-20/nov/2003, Paris, ITAVI éd. Paris, 211-214.*

1 - INRA, Station de Recherches Cunicoles, BP 27, 31326 Castanet-Tolosan, France

2 - INRA, BASE, équipe pathologie cunicole, 37380 Nouzilly, France

Les caractéristiques caecales de 19 lapins conventionnels diarrhéiques âgés de 36 à 65 jours ont été comparées à celles de 100 lapins sains de 42 à 70 jours d'âge sur leur activité microbienne caecale. Chez les

lapins diarrhéiques, des baisses du poids vif, du poids du cæcum vide, de la teneur en matière sèche ont été constatées (respectivement de 34, 27, 29%), comparativement aux animaux sains. De même, une baisse de la concentration des acides gras volatils totaux (AGVt), des proportions de butyrate et d'acétate ont été constatées (AGVt: 32 vs 52 mmoles /litre; butyrate 9,8% vs 15,5% et acétate 70 vs 78% des AGVt). Parallèlement, toujours par rapport aux animaux sains, il a été constaté dans le cæcum des lapins malades une forte augmentation de la concentration de l'azote ammoniacal (27 vs 11 mmoles/litre), de la proportion des AGV mineurs (5,23% vs 0,77% des AGVt) et du pH (6,71 vs 6,00). Le ratio propionate /butyrate a été multiplié par 6. Les activités bactériennes cellulases et hémicellulases ne sont pas affectées par l'état de santé des lapins. Seule l'activité pectinase baisse de 25% chez les lapins malades (P=0,051). Par ailleurs, les auteurs ont montré que l'activité microbienne cæcale évolue considérablement dès les premières



heures suivant la mort de l'animal, suite à des troubles digestifs aigus (figure ci-contre). Lors d'un prélèvement effectué entre 1 et 3 heures *post-mortem*, l'ammoniac (NH₃), les acides gras volatils totaux, l'acétate (C₂), le propionate (C₃), le butyrate (C₄) et le valérate (C₅) s'élèvent respectivement de 59, 72, 61, 71, 117 et 146% comparativement aux prélèvements effectués sur des

lapins malades, en diarrhée aiguë. Ces évolutions seraient expliquées par le fait qu'après la mort de l'animal, les fermentations bactériennes continuent dans le cæcum. En tout état de cause elles limitent considérablement les possibilités d'interprétation des résultats de l'analyse d'un prélèvement de contenu cæcal effectué *post-mortem*, surtout si on ignore le délai exact depuis la mort.

S. BOUCHER¹, C. BOUCRAUT BARALON², T. JOLY³, K GRANGE¹, L. NOUAÏLLE¹, 2003. Contamination du liquide de lavage utérin contenant des embryons lors de récolte d'embryons de lapins (*Oryctolagus cuniculus*) dans un élevage contaminé par la VHD (Maladie Hémorragique Virale). *10èmes Journ. Rech. Cunicole, INRA-ITAVI, 19-20/nov/2003, Paris, ITAVI éd. Paris, 215-218.*

1 - LABOVET (Réseau Cristal) - BP 539 - 85505 Les Herbiers Cedex, France

2 - SCANELIS, 23 Chemin des Capelles, 31076 TOULOUSE Cedex 03, France

3 - ISARA, 31 pl Bellecour 69002 Lyon, France

Le liquide de lavage utérin contenant les embryons issus de lapines inséminées depuis 3 jours et atteintes de VHD dans élevage commercial a été analysé par une technique de RT-PCR sur le gène de la VP60 du virus de la VHD. Le diagnostic de certitude de VHD a été réalisé par une technique ELISA sandwich sur le foie des femelles. Le lavage utérin a été effectué sur 23 femelles mortes de VHD (test Elisa positif) depuis moins de 3 heures. Il résulte de cette expérimentation que tous les liquides de lavage contenant les embryons et tous les échantillons de foie testés simultanément contenaient effectivement des particules virales correspondant à la VHD. Le virus résistant bien à la congélation, il est vivement conseillé de détruire les embryons qui auraient été prélevés sur des lapines contaminées par le VHD. Si pour des raisons impérieuses de rareté de ces embryons, ils étaient conservés et surtout ultérieurement implantés sur des lapines, des précautions sanitaires devraient être prises lors de cette réimplantation afin de ne pas disséminer le virus plusieurs années après la récolte des embryons.

S. BOUCHER¹, S. LEMIERE², A. ALAPHILIPPE³, S. BERTAGNOLI⁴, 2003. Vaccination mixte contre la myxomatose et la VHD chez le lapin nain (*Oryctolagus cuniculus*) à l'aide du vaccin combiné Dercunimix© : innocuité, suivi de la prise vaccinale et aspects pratiques au cabinet vétérinaire. *10èmes Journ. Rech. Cunicole, INRA-ITAVI, 19-20/nov/2003, Paris, ITAVI éd. Paris, 219-222.*

1 - SCP NSBABBG, ZAC de la Buzenière, 85505 Les Herbiers, France.

2 - Laboratoire Merial, Saint-Herblon, 44153 Ancenis, France

3 - Cabinet vétérinaire, ZI en Jacca, 31770 Colomiers, France

4 - Ecole Nationale Vétérinaire, UMR960 Microbiologie Moléculaire, 23 chemin des capelles, 31076 Toulouse Cedex 03, France

L'innocuité de la vaccination combinée **myxomatose**, valence vivante atténuée, souche SG33, et **VHD**, valence inactivée adjuvée en hydroxyde d'alumine, souche AG88, chez le lapin de compagnie utilisant l'injection intradermique à la seringue est démontrée sur un échantillon représentatif de cette population (40 lapins répartis dans 4 groupes de nains adultes ou juste sevrés, à poil normal ou long [Angora]). Une réaction locale au point d'injection apparaît de façon constante entre 2 à 3 jours suivant la vaccination du jeune lapin et de façon inconstante chez l'adulte. Cette réaction se manifeste sous la forme d'un érythème transitoire évoluant entre 2 à 3 jours suivant la vaccination et pouvant persister au plus tard la semaine suivant celle-ci. La réponse immunitaire à médiation humorale, évaluée par le suivi de l'activité sérologique VHD et myxomatose utilisant pour chacun des composants du vaccin une méthode ELISA, est également démontrée. La production d'anticorps suivant la vaccination est notée dans les deux cas. Le titre ELISA VHD est maximal (192 ! 130) chez les animaux vaccinés au bout d'un mois suivant la vaccination. Les anticorps sont encore détectés un mois plus tard (94 ! 39). Le titre moyen observé chez les témoins non vaccinés est égal à 0. Pour la valence myxomatose le titre ELISA maximal (10518 ! 2417) est atteint au bout de deux mois suivant la vaccination. Le titre moyen observé chez les témoins non vaccinés est proche de 0 (889 ! 744). Enfin, un protocole de vaccination simplifié est proposé au praticien, à la lumière de ces éléments, afin qu'il puisse adapter la vaccination mixte à la fois à sa clientèle urbaine et au matériel dont il dispose : première injection à l'aide de 0,2 ml de Dercunimix© par voie intradermique (ID) suivie d'un rappel à quatre mois avec 0,1 ml de Dervaximyxo SG33© en ID, puis un vaccin tous les quatre à cinq mois en alternant Dercunimix© et Dervaximyxo SG33©. Le lapin doit donc être vu trois fois par an. Le vaccin reconstitué ne se conservant que 2 heures, il est recommandé aux praticiens de regrouper les consultations d'au moins 10 lapins nains ce qui correspond au flaconnage le plus petit.

V. MARTELLA¹, A. CAMARDA¹, M. CIARLET², V. TERIO¹, A. LAVAZZA³, C. BUONAVOGLIA¹, 2003. Identification d'un nouveau génotype, P[22], de rotavirus du lapin. *10èmes Journ. Rech. Cunicole, INRA-ITAVI, 19-20/nov/2003, Paris, ITAVI éd. Paris, 223-226.*

1 - Dipartimento di Sanità e di Benessere Animale, Università degli Studi di Bari, S.p. per Casamassima km 3, 70010, Valenzano Bari, Italie

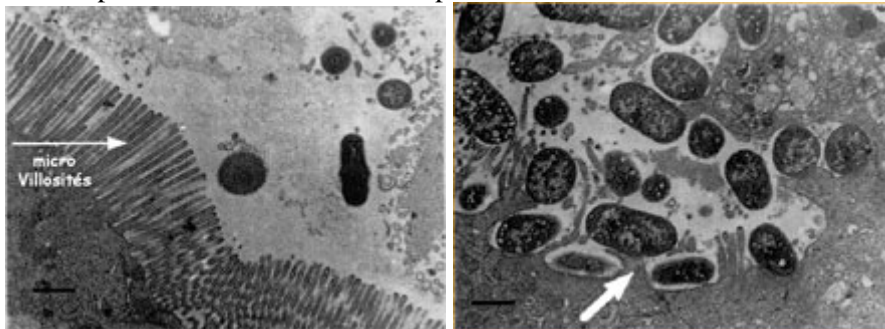
2 - Merck & Co., Inc., Bioprocess and Bioanalytical Research, West Point, U.S.A.

3 - Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Lombardia/Emilia Romagna, Brescia, Italie.

Un nouveau génotype de la protéine VP4 a été identifié grâce à l'analyse de séquence de souches de rotavirus présents dans les fèces de lapins atteints de diarrhée. Les séquences des gènes VP4 des souches italiennes de rotavirus du lapin (160/01, 229/01 et 338/01) identifiés en 2001, se sont avérées très proches entre-elles (90-95% de similitude en acides aminés), mais nettement moins proches (34-77%) des séquences des souches de référence représentatives des divers génotypes P jusqu'alors identifiés. La souche de rotavirus du lapin 30/96, identifiée en 1996, s'est par contre révélée très semblable (87-96%) aux rotavirus du génotype P[14] qui comprend aussi bien des rotavirus humains que des rotavirus du lapin. Le nouvel allèle de la protéine VP4 est donc proposé comme étant le génotype P[22]. Des études sont en cours pour établir son éventuelle pathogénicité, sachant qu'il a souvent été détecté en association avec d'autres agents tel des clostridies. Un vaste étude est également en cours en Italie pour déterminer sa distribution exacte dans les élevages de lapins.

S. BOULLIER, C. TASCA, C. BERTIN, A. MILON, 2003. Induction d'une réponse inflammatoire intestinale locale par les *Escherichia coli*. 10^{èmes} Journ. Rech. Cunicole, INRA-ITAVI, 19-20/nov/2003, Paris, ITAVI éd. Paris, 227-230. UMR 1225 INRA/ENVT, Ecole Vétérinaire, 23 chemin des capelles, 31076 Toulouse, France

Les *Escherichia coli* entéropathogènes représentent un problème économique et sanitaire important dans les élevages cunicoles d'engraissement. Ils provoquent une réponse inflammatoire intense de la muqueuse intestinale. Les mécanismes de virulence de ces bactéries sont bien caractérisés alors que la réponse de l'hôte est encore mal connue. Nous avons étudié la réponse inflammatoire induite chez l'hôte par un sérovar prédominant dans les élevages européens, la souche E22 O103:K:H2. Le jour du sevrage (28j), des lapereaux ont été infectés par la souche E22 et l'iléon distal a été prélevé 4, 6 ou 8 jours après l'infection. Les ARNm de deux cytokines pro-inflammatoires ont été quantifiés en utilisant une technique de PCR en temps réel mise au point au laboratoire. La colonisation bactérienne et le recrutement des macrophages ont été étudiés par immunohistochimie. Nos résultats montrent une forte réponse inflammatoire, caractérisée par une augmentation de la synthèse de TNF α et d'IL-6 et par un recrutement massif de macrophages dans la *lamina propria* de l'iléon. Cette réponse inflammatoire est corrélée avec la colonisation bactérienne et est associée à des lésions tissulaires importantes aboutissant à la disparition des villosités intestinales.



Microvillosités intactes en présence de bactéries non pathogènes (les "taches" noires). Destruction des microvillosités consécutive à l'attachement des bactéries (flèche blanche)

L. BOHEZ, T. STAKENBORG, D. VANDEKERCHOVE, J. PEETERS, 2003. Essai de protection des lapins vaccinés avec une souche EPEC 2+/O132 délétée dans le gène tir contre des inoculations d'épreuves hétérologues. 10^{èmes} Journ. Rech. Cunicole, INRA-ITAVI, 19-20/nov/2003, Paris, ITAVI éd. Paris, 231-234.

Département de Bactériologie Générale, Centre d'Etude et de Recherche Vétérinaire, Groeselenberg 99, 1180 Bruxelles, Belgique.

Les *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC) provoquent une maladie intestinale sévère chez le lapin et causent des pertes importantes après sevrage. En France, le pathotype 8+/O103 est le plus important, en Belgique c'est le 3-/O15. Un vaccin efficace devrait permettre à la fois de protéger les lapins contre les troubles digestifs dus aux EPEC et de limiter l'utilisation des antibiotiques. Le pouvoir pathogène des EPEC comporte un mécanisme d'attachement et d'effacement (A/E). L'attachement intime des *E. coli* pathogènes sur la paroi des cellules intestinales est réalisé par la fixation d'une adhésine - l'intimine - sur un récepteur transloqué d'origine bactérienne - le Tir. Les auteurs ont créé une souche avirulente en délétant le gène Tir, qui encode le récepteur de l'intimine, d'une souche EPEC 2+/O132 (82/90 delta-tir). L'administration par voie buccale de cette souche modifiée à raison de 10 milliards de bactéries par lapin n'entraîne aucune altération de leur croissance. Les lapins ainsi vaccinés *per os* avec la souche atténuée vivante, ont été totalement protégés contre une infection hétérologue réalisée avec une souche 3-/O15 un mois plus tard. Par contre, ils n'ont été que partiellement protégés contre une infection hétérologue avec une autre souche d'*E. coli* pathogène 8+/O103. Des travaux doivent donc être poursuivis pour rechercher la nature exacte des facteurs impliqués dans la protection vaccinale.

P. COUDERT¹, S. VERDELHAN², A. MOREL-SAIVES², 2003. Compatibilité entre la salinomycine et la tiamuline chez le lapin en croissance. 10^{èmes} Journ. Rech. Cunicole, INRA-ITAVI, 19-20/nov/2003, Paris, ITAVI éd. Paris, 235-238.

1 - INRA, UR 86 Pathologie du lapin 37380 Nouzilly, France

2 - Cybelia 104 Av du Président Kennedy 75016 Paris, France

Quatre essais ont été réalisés pour évaluer une éventuelle incompatibilité entre la salinomycine (un anticoccidien) et la tiamuline (un antibiotique utilisé pour lutter contre l'EEL) chez le lapin en croissance, ces

deux produits étant ajouté à l'aliment. Ces 4 essais lapins ont été réalisés sur un total de 688 lapereaux de statut sanitaire très variable mais en l'absence de pathologie, dans des conditions d'environnement très différentes: 108 lapins EOPS en animalerie protégée, 502 lapins standard dans un élevage expérimental et 78 dans un élevage de terrain. Pour les 3 premiers essais, la salinomycine (toujours à 20 ppm) a été associée à des doses croissantes de tiamuline (30 - 90 et 270 ppm), soit utilisée seule, soit la tiamuline était utilisée seule (270 ppm). Enfin un lot témoin ne recevait aucune supplémentation. De faibles variations des performances ont pu être observées entre lots sans que celles-ci ne se confirment d'un essai à l'autre. Dans le 4^e essai dans l'élevage de terrain, le protocole a été un peu différents avec 3 lots : tiamuline seule, tiamuline +salinomycine et bacitracine+salinomycine. Dans aucun des essais les auteurs n'ont observé d'incompatibilité entre la salinomycine et la tiamuline (ni la bacitracine): aucune mortalité, ni morbidité, ni baisse des performances zootechniques (gmq moyen situé entre 44 et 48 g/jour en fonction des essais).

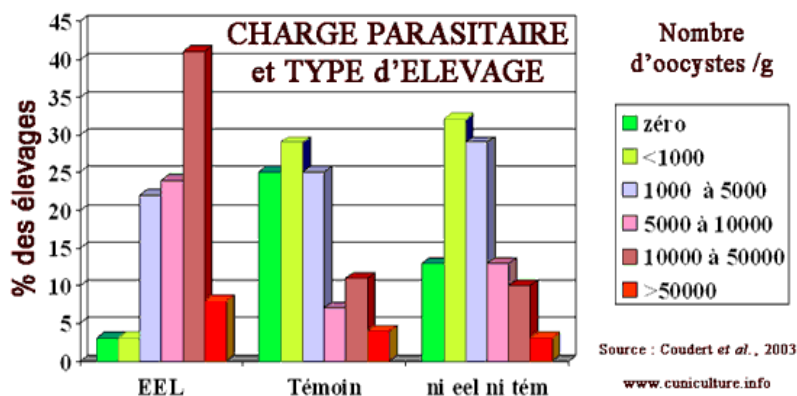
Les 11 Communications de cette deuxième partie de la section de Pathologie étaient toutes consacrées à l'étude de l'Entéropathie Épizootique du Lapin (EEL).

P. COUDERT¹, J.L. JOBERT², G. LAROUR², M. GUITTET², 2003. Relation entre l'entéropathie épizootique du lapin (EEL) et l'infestation par les coccidies : enquête épidémiologique. *10èmes Journ. Rech. Cunicole, INRA-ITAVI, 19-20/nov/2003, Paris, ITAVI éd. Paris, 239-241.*

1 - INRA UR86 Pathologie du Lapin 37380 Nouzilly, France

2 - AFSSA, UEQAC, BP 53, 22440 Ploufragan, France

Une enquête a porté sur 96 élevages intensifs de lapin. Les paramètres enregistrés étaient : mortalité en engraissement et en maternité, présence ou non d'entéropathie épizootique du lapin (EEL) au cours des 5 dernières bandes: présence (élevages "EEL" n=37), absence d'EEL (élevages "Témoins" n= 28) ou élevages ni "EEL" ni "témoins" (élevages "X" n=31). Un échantillon de crottes a été prélevé sous les lapins en engraissement âgés de 43 ± 4 jours. Le nombre d'oocystes par gramme (OPG ou charge parasitaire) a été évalué et les espèces de coccidies identifiées. Les seules coccidies trouvées dans les élevages sont *Eimeria media*, *Eimeria magna* et *Eimeria perforans*. Dans 13% des élevages la présence des coccidies est en dessous du seuil de détection. *Eimeria media* est l'espèce dominante (44%) devant *Eimeria magna* (33%). Quand *Eimeria perforans* est dominant, c'est le plus souvent la seule coccidie présente (7/10). Un tiers des élevages était contaminé par une seule espèce (*Eimeria media* le plus souvent). Les niveaux d'excrétion se répartissent de façons très différentes en fonction de l'existence ou non de l'EEL dans l'élevage. Les $\frac{3}{4}$ des élevages "EEL" excrètent plus de 5 000 OPG avec un pic de l'ordre de 10 000 à 50 000 OPG. Le groupe des



"témoins" se caractérise au contraire par 25% d'élevages sans coccidies et un pic au niveau <1 000 OPG. Les pics de charge parasitaire des "témoins" et des "EEL" sont significativement différents. Les élevages classés "X" sont très proches des témoins. Dans cette étude les auteurs n'ont observé aucune relation entre des différents facteurs parasites et la mortalité en maternité. La mortalité en engraissement la plus élevée (14,5 à 16%) a été observée dans les élevages "EEL" ayant la charge parasitaire la

plus élevée. Les élevages avec la mortalité la plus faible (6,6%) étaient les "témoins" ayant la charge parasitaire la plus faible. La mortalité en engraissement a été significativement plus faible en présence d'*Eimeria perforans* dominant (7,1%) ou lorsqu'il n'y avait aucune coccidie détectable (6,6%). *Eimeria media*, *Eimeria magna* ou leur association ont eu une influence similaire sur la mortalité en engraissement (10,2% et 11,3% respectivement avec chacune des 2 coccidies).

B. LE NORMAND¹, J. LE GUENEC², P.Y. MOALIC², 2003. Contribution à l'étude toxinotypique des souches de *Clostridium perfringens* isolées dans l'entéropathie épizootique du lapin (EEL). Relation avec la clinique observée. *10èmes Journ. Rech. Cunicole, INRA-ITAVI, 19-20/nov/2003, Paris, ITAVI éd. Paris, 239-241.*

1 - SCP FOUQUE-GOUNOT-LE NORMAND-GUILLON, 47 Bd Leclerc, 35460 St Brice-en-Coglès, France

2 - LABOFARM, 6, rue T. Botrel, 22600 Loudéac, France

L'étude de 38 souches de *Clostridium perfringens* isolées entre 2000 et 2002 sur des lapins atteints d'entéropathie épizootique (EEL) montre que 20 sont positives en PCR-alpha, 17 positives en PCR-alpha et -beta2, et toutes négatives en PCR-beta. La séparation clinique des lapins en deux groupes de 19, selon l'aspect du contenu cæcal (liquide ou compacté) montre une relation entre le toxinotype et la forme clinique: plus forte fréquence des *Clostridium* type alpha quand le cæcum est liquide (15/19) et de type alpha-beta2 quand il est compacté (13/19). La recherche par ELISA des toxines A et B de *Clostridium difficile* et de la toxine beta sur les fèces congelées a été négative sur les 23 prélèvements cæcaux effectués que les lapins soient malades (n=16) ou sains (n=7). L'analyse ELISA pour la toxine alpha a été positive pour 10 lapins malades sur les 16 prélevés, et négative pour les 7 témoins. La bactériologie classique n'avait permis l'isolement de *C. perfringens* que sur un seul des lapins malades, et la souche s'est avérée positive en PCR-alpha, ce qui démontre la plus grande sensibilité de la détection par ELISA par rapport à la bactériologie classique. Cette étude confirme que *Clostridium perfringens* en particulier, mais probablement les bactéries du genre *Clostridium* en général, sont des éléments intéressants à étudier dans les dysfonctionnements fermentaires et notamment dans l'évolution de la flore des lapins atteints d'EEL, même s'ils n'interviennent qu'en contaminants opportunistes.

D. MARLIER¹, R. DEWRÉE¹, D. LICOIS², P. COUDERT², C. LASSENCE¹, A. POULIPOULIS¹, H. VINDEVOGEL¹, 2003. L'Entéropathie Epizootique du Lapin (EEL) : un bilan provisoire des résultats après 20 mois de recherches. *10èmes Journ. Rech. Cunicole, INRA-ITAVI, 19-20/nov/2003, Paris, ITAVI éd. Paris, 247-250.*

1 - Secteur Médecine aviaire et cunicole, Département des Maladies Infectieuses et Parasitaires, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Bld de Colonster 20, Sart-Tilman, 4000 Liège, Belgique

2 - INRA, UR86, Unité BioAgresseurs, Santé, Environnement, F37380 Nouzilly - France

Les travaux ont porté d'une part sur trente lapins issus de 8 élevages atteints d'entéropathie épizootique du lapin (EEL) et d'autre part sur 181 lapins EOPS (Exempts d'Organisme Pathogènes Spécifiés). Ces derniers ont été utilisés pour des inoculations expérimentales au moyen des inoculum TEC2 (10 inoculés, 5 témoins); TEC3 (30 inoculés, 5 témoins) ; de fractions de TEC3 obtenues après filtration au travers d'un filtre de 0,45µ (15 inoculés, 5 témoins positifs) ; de souches de *Cl. perfringens* et *histolyticum*, (20 inoculés) ; de souches de *Bacillus licheniformis* ; de souches de *Cl. perfringens* et *Cl. sordelii*, et de pools bactériens aérobies et anaérobies provenant de TEC3 (76 inoculés) et dans des expériences d'anses intestinales ligaturées (15 animaux). Les essais en anse ligaturée n'ont pas été concluants par manque de reproductibilité et de fiabilité. Grâce aux reproductions expérimentales réussies avec TEC2 et TEC3 les auteurs ont pu mettre en évidence: une légère modification du profil sanguin avec souvent l'apparition d'une neutrophilie associée au pic d'observation des signes cliniques. Les résultats obtenus lors du fractionnement de l'inoculum suggèrent l'intervention de 2 facteurs: l'un de taille > à 0,45 µ (bactérie ?) et l'autre de taille < à 0,45 µ (toxine ?). Un rôle direct et unique pour une quarantaine de souches bactériennes [voir tableau ci-après] a pu être écarté sur la base de l'un ou plusieurs des critères suivants 1/ faibles fréquences d'isolement des cas typiques du terrain ; 2/ absence de l'agent dans des inoculum de référence reproduisant l'EEL ; 3/ échec lors de ré-inoculation expérimentale directe d'une ou plusieurs souches. En outre, aucune pathologie n'a pu être reproduite par inoculation de lapins avec un pool des souches bactériennes obtenues après culture au départ de l'inoculum TEC3 en aérobiose et en anaérobiose, alors que TEC3 complet a parfaitement permis de reproduire l'EEL. Des souches de *Cl. perfringens* ont été isolées du caecum de lapins morts d'EEL dans approximativement 80% des analyses (10⁴ cfu/g de matière fraîche), mais le rôle étiologique direct des infections par *Cl. perfringens* semble pouvoir être éliminé. En effet, dans de nombreuses occasions, ni cette bactérie ni sa toxine alpha, commune à tous les toxinotypes, n'ont pu être mises en évidence de cas expérimentaux caractéristiques. Cependant, sur la base des résultats d'analyses provenant de lapins de terrain morts d'EEL, il apparaît que les infections à *Cl. perfringens* semblent jouer un rôle dans les mortalités enregistrées dans les élevages. La présence de rotavirus a été détectée dans approximativement 30% des échantillons de terrain. Par contre, même s'ils sont présents dans l'inoculum, ils n'ont que rarement été mis en

Liste des bactéries ré-inoculées ne reproduisant pas l'EEL

<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>	
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Enterococcus asseliflavus</i> et/ou <i>durans</i>
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Bacillus sphaericus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Bacteroides capillosus</i>	<i>Escherichia coli</i> pathogènes
<i>Campylobacter</i> spp, <i>Capnocytophaga</i> spp,	<i>Fusobacterium necrogenes</i>
<i>Clostridium baratii</i>	<i>Haemophilus paracuniculus</i>
<i>Clostridium beijer/butyricum</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Lawsonia intracellularis</i>
<i>Clostridium fallax</i>	<i>Peptostreptococcus micros</i>
<i>Clostridium glycolicum</i>	<i>Salmonella</i> spp,
<i>Clostridium histolyticum</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
<i>Clostridium paraputrificum</i>	<i>Staphylococcus</i> spp,
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Treponema</i> spp,
<i>Clostridium piliforme</i>	<i>Vibrio</i> spp,
<i>Clostridium ramosum</i>	<i>Yersinia</i> spp.
<i>Clostridium sordelli</i>	
<i>Clostridium spiroforme</i>	

évidence dans les contenus digestifs des animaux inoculés ayant présenté de l'EEL. La présence d'un nombre excessif (> 5000 / g matière fécale) d'oocystes de coccidies a été observé dans [seulement] approximativement 40% des cas. Aucun autre parasite intestinal n'a été observé au cours de ces études. Enfin, selon les auteurs, il convient d'arrêter les diagnostics systématiques établis sur la simple base de pathologies digestives avec mortalité importante. Compte tenu de leur expérience et de leurs résultats, un diagnostic d'EEL primaire en élevage ne peut être posé que 1/ par observation à l'autopsie des lésions caractéristiques sur un nombre significatif d'animaux, obligatoirement associée à 2/ une analyse parasitaire et bactériologique complète (aérobie et anaérobie) éliminant l'intervention d'autres pathogènes primaires et/ou opportunistes dans le syndrome clinique global observé en élevage.

R. DEWRÉE¹, D. LICOIS², P. COUDERT², C. LASSENCE¹, H. VINDEVOGEL¹, D. MARLIER¹, 2003. L'entéropathie épizootique du lapin (EEL) : étude du rôle des infections par *Clostridium perfringens* dans l'étiopathogénie de ce syndrome. *10èmes Journ. Rech. Cunicole, INRA-ITAVI, 19-20/nov/2003, Paris, ITAVI éd. Paris, 251-254.*

- 1 - Secteur Médecine aviaire et cunicole, Département des Maladies Infectieuses et Parasitaires, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Bld de Colonster 20, Sart-Tilman, 4000 Liège, Belgique
- 2 - INRA, UR86, Unité BioAgresseurs, Santé, Environnement, F37380 Nouzilly - France

Dans une première étude, divers examens bactériologiques, virologiques et parasitaires ont été réalisés sur des prélèvements intestinaux provenant de 12 lapins atteints d'EEL, issus de 8 élevages. Seules 17 espèces bactériennes ont été isolées. Dans 10 des 12 prélèvements, la flore anaérobie était dominée par *Clostridium perfringens*. Pour tenter d'affiner le rôle de cette bactérie dans l'étiologie de l'EEL, 62 souches de *Cl. perfringens* provenant d'autres lapins morts d'EEL ont été toxinotypées. Globalement, 66 et 34% des souches étaient respectivement de toxinotype A ou C, le gène codant pour l'entérotoxine étant présent dans 73 % des souches. Au cours d'une seconde étude, une recherche de toxine alpha dans le contenu digestif de 86 lapins morts de pathologie digestive a été effectuée. Cette toxine a été mise en évidence dans le contenu digestif de 31 animaux, 22 morts d'EEL et 9 d'autres pathologies. Elle était absente des contenus digestifs de 55 lapins dont seulement 10 morts d'EEL (P < 0,0001 par le test de chi²).

D. LICOIS¹, R. DEWRÉE², P. COUDERT¹, H. VINDEVOGEL², D. MARLIER², 2003. Essai de reproduction expérimentale de l'entéropathie épizootique du lapin (EEL) avec des inoculums originaires de Belgique et des Pays-Bas et avec des souches bactériennes isolées de ces inoculums ainsi que de TEC2 et TEC3 (inoculums INRA). *10èmes Journ. Rech. Cunicole, INRA-ITAVI, 19-20/nov/2003, Paris, ITAVI éd. Paris, 255-258.*

- 1 - INRA, Unité BioAgresseur, Santé, Environnement, 37380 Nouzilly, France
- 2 - Secteur Médecine aviaire et cunicole, Département des Maladies Infectieuses et Parasitaires, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Bld de Colonster 20, Sart-Tilman, 4000 Liège, Belgique

Quatre expérimentations ont utilisé au total 310 lapins EOPS pour tester différents inoculums. Ils ont été inoculés dans la semaine suivant le sevrage (29j). Dans l'essai 1, un inoculum d'origine belge et l'inoculum de référence TEC3 ont été comparés à un témoin. Dans l'essai 2 utilisant le même protocole un inoculum d'origine hollandaise a été étudié.

Essai	Inoculum	nbre	% Mobidité	% Morts
1	Témoin	27	0	0
	Belgique	36	89	22,2
	TEC3	27	100	33,3
2	Témoin	24	0	0
	Hollande	38	87	15,8
	TEC3	23	100	24,0

Tous les lots inoculés ont abouti à la reproduction expérimentale de l'Entéropathie Epizootique du Lapin (EEL), caractérisée par les signes cliniques et lésionnels propres à cette maladie (dilatation de l'estomac et de l'intestin grêle, parésie caecale, absence d'inflammation...). Les 2 autres essais qui consistaient à tester le pouvoir infectieux de différentes souches bactériennes (plus d'une vingtaine) et notamment de

différentes espèces de *Clostridium*, issues de ces inoculums belge et hollandais, mais aussi des inoculums INRA (TEC2 et TEC3), n'ont provoqué aucun signe clinique ni entraîné de réduction de la croissance. Il en résulte que si l'hypothèse d'une l'étiologie bactérienne est bien la bonne, soit il s'agit de bactérie(s) non cultivable(s), soit elle(s) n'exprime(nt) pas ou plus son (ses) facteur(s) de virulence, dans nos conditions de travail. En conséquence, d'autres approches (moléculaires ou autres...) s'avèrent nécessaires pour tenter d'identifier l'agent causal.

D. LICOIS¹, C. FRANCHET², C. PERSILLON², 2003. Obtention d'échantillons d'air, prélevés dans des locaux expérimentaux à l'aide de bio-collecteurs, chez des lapins sains et des lapins après reproduction expérimentale de l'entéropathie épizootique (EEL). Test d'infectiosité des échantillons collectés. *10èmes Journ. Rech. Cunicole, INRA-ITAVI, 19-20/nov/2003, Paris, ITAVI éd. Paris, 259-262.*

1 - INRA, Unité BioAgresseur, Santé, Environnement, F-37380 Nouzilly, France

2 - Protéus, 70 allée Graham Bell, Parc G. Besse, 30000 Nîmes, France

Afin de mettre en œuvre un programme d'identification du ou des agents pathogènes de l'entéropathie épizootique du lapin (EEL) par différentes approches de biologie moléculaire, il convenait d'obtenir un matériel biologique contenant le moins possible de génomes "contaminants" tels que ceux existant dans du contenu intestinal (génome provenant des lapins eux-même ou issus de l'alimentation, micro-organismes commensaux normaux de l'intestin). Pour cela, des prélèvements d'air biquotidiens ont été réalisés avec 2 appareils concentrateurs de particules, lors d'une expérimentation conduite en parallèle, chez des lapins sains et des lapins contaminés avec l'inoculum INRA-TEC3. Le premier appareil (type cyclone) a permis à chaque utilisation de concentrer dans 40 ml de liquide les particules présentes dans 32 m³ d'air. Le deuxième (type filtre ultra fin en gélatine) a permis de récupérer chaque fois dans dans 10 ml les particules issues de 2,4 m³ d'air. Le pouvoir infectieux de ces produits collectés a été testé par administration *per os* de 1 à 4 ml de concentrat à des lapins EOPS. Les échantillons poolés recueillis entre 2 et 6 jours ou entre 9 et 10 jours après infection par TEC3 n'ont entraîné aucune perturbation des animaux. Seuls les échantillons poolés collectés entre 7 et 9 jours post inoculation ont permis *a priori* de reproduire l'EEL. Ces résultats préliminaires sont cependant à considérer avec prudence compte tenu du faible nombre de tests qui ont pu être menés à ce jour : un essai "positif" conduit sur 22 lapins inoculés, dont 7 ont développé de l'EEL.

H. DE ROCHAMBEAU¹, D. LICOIS², T. GIDENNE³, S. VERDELHAN⁴, P. COUDERT², J. M. ELSSEN¹, 2003. Variabilité génétique de la sensibilité à trois types d'entéropathies expérimentales chez le lapin. *10èmes Journ. Rech. Cunicole, INRA-ITAVI, 19-20/nov/2003, Paris, ITAVI éd. Paris, 263-266.*

1 - INRA, Station d'Amélioration Génétique des Animaux, BP 27, 31326 Castanet-Tolosan cedex, France

2 - INRA, BioAgresseurs, Santé, Environnement, 37380 Nouzilly, France

3 - INRA, Station de Recherches Cunicoles, BP 27, 31326 Castanet-Tolosan cedex, France

4 - Cybéla, Groupe Glon, 104, avenue du Président Kennedy, 75781 Paris Cedex 16, France

Ce travail analyse la variabilité génétique pour la sensibilité du lapereau sevré à 3 agressions digestives : après inoculation de coccidies (5000 oocystes d'*Emeria magna* par lapin le lendemain du sevrage : essai "coccidies"), avec un aliment déficient en fibres (aliment contenant 9% d'ADF : essai "fibres") et après reproduction expérimentale de l'entéropathie épizootique du lapin (0,5 ml de l'inoculum TEC2 administrés *per os* le lendemain du sevrage: essai "EEL"). Pour chaque agression expérimentale, en moyenne 1260 lapins issus de 48 mâles et sevrés à 30 jours ont été suivi en engraissement pendant 32 jours. Ils ont été pesés et leur état de santé individuel évalué 6 fois au

cours de la période (à J0, J4, J11, J18, J25 et J32). Les auteurs ont défini 3 indices binaires (oui-non) «hiérarchiques» - vivants, résilients, tolérants - pour caractériser la réponse des lapereaux estimée en fin d'essai à J32. Ainsi un lapin résilient est un lapin vivant à J32 et ayant eu une croissance moyenne normale. Un lapin tolérant est un lapin résilient n'ayant jamais montré de signe clinique ni de perturbation de la croissance entre 2 pesées. Les pourcentages sont exprimés par rapport aux lapins mis en essai. Ces indices prennent des valeurs faibles pour l'essai "coccidies" (61% de vivants, 40% de résilients et 20% de tolérants), plus élevés pour l'essai "fibres" (75 - 64 et 31%), et intermédiaires pour l'essai "EEL" (66 -57 et 33%). L'effet du père sur chacun des 3 indices est significatif pour les essais "coccidies" et "fibres" (les descendants de certains mâles ont un indice significativement meilleur que ceux issus d'autres mâles). Pour l'essai "EEL", il l'est uniquement pour l'indice "tolérant". Les classements des mâles sont corrélés pour les 3 indices d'un même essai (r compris entre 0,50 et 0,85). L'existence d'une liaison significative entre les classements des mâles pour les essais "coccidies" et "fibres" d'une part et pour les essais "fibres" et "EEL" d'autre part, conduit les auteurs à proposer l'hypothèse de l'existence de mécanismes de résistance communs aux trois agressions utilisées, et à supposer qu'il existe chez le lapin une variabilité génétique pour la sensibilité à certaines entéropathies.

P. BOISOT¹, D. LICOIS², T. GIDENNE³, 2003. Une restriction alimentaire réduit l'impact sanitaire d'une reproduction expérimentale de l'entéropathie épizootique (EEL) chez le lapin en croissance. *10èmes Journ. Rech. Cunicole, INRA-ITAVI, 19-20/nov/2003, Paris, ITAVI éd. Paris, 267-270.*

1 - Evialis, BP 235, F56006 Vannes ; France

2 - INRA, Unité BioAgresseur, Santé, Environnement, F37380 Nouzilly, France

3 - INRA, Station de Recherches Cunicoles, BP 27, F31326 Castanet-Tolosan Cedex, France

L'effet du rationnement alimentaire lors d'une reproduction expérimentale de l'EEL a été étudié sur deux lots de 256 lapins (non inoculés ou inoculés avec l'inoculum TEC3), répartis à 34 jours d'âge (sevrage) et suivis jusqu'à 70 jours dans deux bâtiments séparés. L'inoculation de chaque individu a eu lieu *per os* 5 jours après le début de l'engraissement. Pour chaque lot, 3 groupes ont été constitués dès le sevrage, correspondant respectivement à un rationnement, de 34 à 58 jours, de 0% (T), -20% (R20) et -40% (R40) de l'*ad libitum*, suivi de 58 à 70 jours par une alimentation à volonté. Pour les lapins non inoculés, le rationnement limite la croissance (gmq 34-70j. : T = 43,7 g/jour, R20 = 41,8 et R40 = 38,7 g/j.). Par contre il améliore l'efficacité alimentaire (IC de 3,13 - 2,70 et 2,57 pour les 3 lots dans le même ordre). Chez les lapins inoculés, le rationnement réduit la mortalité et la morbidité, les meilleures performances étant obtenues pour le groupe R40 (mortalité de 28,1 - 26,0 et 18,8% pour les lots T - R20 et R40). La croissance est aussi améliorée par le rationnement dans cette série de lapins inoculés avec l'EEL (gmq de 29,9 - 33,6 et 33,5 g/j. pour les lots T - R20 et R40). Ces résultats expérimentaux sont encourageants et montrent qu'il est possible de mieux maîtriser les troubles digestifs en présence d'EEL par un rationnement alimentaire préventif dès le sevrage.

J. DUPERRAY¹, P. BOISOT¹, A. GUYONVARCH¹, A. RICHARD², 2003. Persistance de l'efficacité de la bacitracine pour lutter contre l'entéropathie épizootique du lapin (EEL) après quatre années d'utilisation sur le terrain. *10èmes Journ. Rech. Cunicole, INRA-ITAVI, 19-20/nov/2003, Paris, ITAVI éd. Paris, 271-274.*

1 - Evialis, BP 235, 56006 Vannes, France

2 - Alphaarma, 3 impasse de la Noisette, SILIC 411, 91374 Verrières le Buisson, France

L'efficacité de la bacitracine pour contrôler l'entéropathie épizootique du lapin (EEL) a été réévaluée après 4 années d'utilisation, sur des lapins en engraissement suivis du sevrage à 67 jours. 96 lapins (essai 1) et 144 lapins (essai 2) sevrés à 32 ou 34 jours ont été repartis en trois lots : lot contaminé par un aliment provenant d'un élevage ayant développé de l'EEL, lot recevant un aliment blanc (non supplémenté) et lot recevant un aliment supplémenté en bacitracine à 100 ppm du sevrage à 60 jours. Pour chaque essai, tous les lapins étaient logés dans un même bâtiment. La bacitracine utilisée à cette dose sur la période d'engraissement a limité la mortalité (3,8% pour le lot bacitracine en moyenne contre 33,8% pour les lots contaminés et 12,5% pour les lots témoin blanc). La morbidité a également été réduite avec la bacitracine. Enfin, avec la bacitracine les gains de poids ont été supérieurs : *essai 1*: 39,3 g/j vs 38,0 et 37,5 g/j pour les lots témoin et contaminé; *essai 2* : 41,1 g/j vs 34,5 et 31,0 g/jour. Ces deux essais confirment qu'après quatre années d'utilisation sur le terrain, la bacitracine maintient son efficacité et reste une molécule de choix pour contrôler l'entéropathie épizootique du lapin.

P. BOISOT¹, J. DUPERRAY¹, A. GUYONVARCH¹, A. LE BIHAN², A. RICHARD³, D. LICOIS⁴, P. COUDERT⁴, 2003. Evaluation de l'efficacité de la bacitracine soluble (Bacivet S®) dans l'eau de boisson lors d'une reproduction expérimentale de l'entéropathie épizootique (EEL) chez le lapin en croissance. *10èmes Journ. Rech. Cunicole, INRA-ITAVI, 19-20/nov/2003, Paris, ITAVI éd. Paris, 275-278.*

1 - Evialis, BP 235, 56006 Vannes, France

2 - ISAB, BP 30313, 60026 Beauvais, France

3 - Alpharma, 3 impasse de la Noisette, SILIC 411, 91374 Verrières le Buisson, France

4 - INRA, Unité BioAgresseur, Santé, Environnement, 37380 Nouzilly, France

L'efficacité de la bacitracine soluble dans l'eau de boisson (Bacivet S®) lors d'une reproduction expérimentale de l'EEL a été étudiée chez le lapin en engraissement. Une inoculation de tous les lapins expérimentaux a été effectuée *per os* avec l'inoculum TEC3 à l'âge de 42 jours pour déclencher l'EEL (10 jours après le sevrage). Les lapereaux (n=168) avaient été répartis dès 32 jours en 4 lots égaux: A/ témoin non traité, B/ bacitracine 100 ppm dans l'aliment du sevrage à 60 jours, C/ Bacivet S® (0,675g/l d'eau de boisson) dès le sevrage (préventif) pour une durée de 19 jours, et D/ Bacivet S® (même concentration) à partir de 45 jours (lors de l'apparition des 1ers signes d'EEL) pour une durée de 14 jours (traitement curatif). Entre 32 et 67 jours, la mortalité a été de 33,3% dans le lot témoin A, 0% dans lot B avec la bacitracine administrée avec l'aliment, 7,14% dans le lot C traité préventivement et 11,9% dans le lot D traité en curatif dans l'eau de boisson. A 67 jours les poids vifs des lapins étaient respectivement 1859 - 2020 - 2017 et 2010 g pour les lots A - B - C et D. Ainsi, les résultats de cet essai montrent que le Bacivet S®, en utilisation préventive, est aussi efficace que la bacitracine 100 ppm dans l'aliment durant la période d'expression de la maladie. L'utilisation du Bacivet S® en curatif sur 14 jours, après apparition des symptômes, limite la mortalité et la morbidité des lapereaux par rapport à un témoin blanc mais se révèle moins efficace qu'une utilisation préventive. A noter que l'essai a été réalisé en période de fortes chaleurs (du 22-07 au 26-08-2003) ce qui a freiné la consommation d'aliment et la croissance des lapins, mais favorisé la consommation d'eau.

C. BOSTVIRONNOIS¹, A MOREL SAIVES², 2003. Intérêt et positionnement de la tylosine dans la maîtrise de l'entéropathie épizootique (EEL) du lapin de chair. *10èmes Journ. Rech. Cunicole, INRA-ITAVI, 19-20/nov/2003, Paris, ITAVI éd. Paris, 279-281.*

1 - LILLY France département ELANCO, 13 rue Pagès, 92158 Suresnes Cedex, France

2 - CYBELIA, 104 avenue du Président Kennedy, 75016 Paris, France

La tylosine est un antibiotique de la famille des macrolides préconisé principalement dans les troubles respiratoires. Toutefois, son spectre Gram positif permet de penser que la tylosine peut être un élément de maîtrise des désordres digestifs liés à l'entéropathie épizootique du lapin (EEL). L'expérience antérieure des auteurs les a amenés à considérer que deux critères sont nécessaires pour favoriser un pronostic d'efficacité du traitement avec la tylosine : association avec un antibiotique de spectre Gram moins et absence de sensibilité forte de l'élevage aux troubles colibacillaires. Une fois ces deux critères retenus, des essais élargis ont été menés sur une population de plus de 230 000 lapins en engraissement entretenus dans 31 élevages répartis sur tout le territoire national dans différentes organisations partenaires du Groupe GLON. La tylosine a été incorporée à l'aliment à raison de 100 - 150 ou 200 ppm et distribuée du sevrage jusqu'au maximum une semaine avant la date d'abattage. Selon les élevages, l'antibiotique à spectre Gram négatif utilisé en association a été : rien, apramycine (100 ppm), colistine (67 ppm) ou néomycine (200-240 ppm) [ndlr : le nombre d'élevages concernés par chaque cas n'a pas été spécifié par les auteurs si ce n'est que seuls 2 élevages ont utilisé l'association avec la colistine et que le nombre d'élevages utilisant la tylosine seule était "faible"]. Les mortalités observées sont réunies dans le tableau ci-dessous.

Mortalité en %	TYLOSINE (ppm)			
	100	150	200	total
- Apramycine	11,3%	5,0%	4,5%	7,3%
- Colistine	-	-	9,0%	9,0%
- Néomycine	10,5%	8,0%	10,9%	10,6%
- aucune	12,9%	-	8,1%	12,2%
Ensemble	11,71%	5,75%	9,40%	10,0%

Par rapport à la bande d'engraisement précédente n'utilisant pas de tylosine mais un autre antibiotique, au cours de la bande expérimentale avec tylosine, il a été observé une amélioration de la situation très nette (baisse de la mortalité de 5 à 15 points) ou nette (baisse de 0 à 5 points) dans 4 et 11 élevages respectivement. Une "stabilisation"

a été observée dans 13 élevages (accroissement de la mortalité de 0 à 5 points), une dégradation a été observée dans 2 élevages (accroissement de la mortalité de 5 à 10 points) et un réel échec thérapeutique dans un élevage sur les 31 de l'étude (mortalité accrue de plus de 10 points). Certains éleveurs ont souhaité conduire une deuxième bande avec de la tylosine. Comme pour la première, une tendance à une meilleure

efficacité a été observée avec la tylosine incorporée à l'aliment à 200 ppm par rapport à 100 ppm (mortalité de 6,9% vs 9,1%). Les résultats de cette étude conduisent les auteurs à envisager la tylosine comme une réelle alternative antibiotique dans la maîtrise de l'entéropathie épizootique du lapin de chair.

=====

Fin des résumés de la partie "Pathologie"

=====