PREVALENCIA DE *Eimeria* spp. EN GALLINAS PONEDORAS DE GRANJAS PERTENECIENTES A TRES MUNICIPIOS DEL ESTADO TRUJILLO, VENEZUELA

Prevalence of *Eimeria* spp. in Egg-Laying Hens of Farms Belonging to Three Municipalities of Trujillo State, Venezuela

Eric Brown¹, Doraida Díaz Cuéllar¹, Leidy Moreno¹ y Atilio Gotopo²

¹Departamento de Ciencias Agrarias. E-mail: do7881@latinmail.com; ebrown@ula.ve ²Departamento de Ciencias Económicas y Administrativas, Núcleo Universitario Rafael Rangel (NURR), Universidad de Los Andes (ULA), Trujillo, Venezuela.

RESUMEN

Se realizó un estudio con la finalidad de determinar la prevalencia de *Eimeria* spp. en granjas de gallinas ponedoras ubicadas en los municipios Boconó, Pampán y Carvajal del estado Trujillo, Venezuela. Para ello fue seleccionada una población de 8.500 ponedoras evaluándose una muestra de 382, a través de la técnica de McMaster, obteniéndose una prevalencia de 17,02%. Se reportó la presencia de *Ascaridia galli* con una prevalencia de 5,24%. Se encontraron diferencias significativas en la distribución porcentual de las eimerias en los diferentes Municipios, centrándose el mayor porcentaje en el municipio Pampàn (P = 0,0000). El mayor porcentaje de las muestras positivas presentaron cargas de entre 50 y 200 ooquistes (P = 0,0000). Se evidenciaron las mayores tasas de infección en pisos de tierra (P \leq 0,0055) y en la época lluviosa del año (P \leq 0,0055).

Palabras clave: Eimeriosis, gallinas, prevalencia.

ABSTRACT

A study was carried out with the purpose of determining the prevalence of *Eimeria spp* in farms of egg-laying hens located in the Municipalities of Boconó, Pampán and Carvajal. Trujillo, Venezuela. For an egg-laying hens population of 8,500 it was selected a sample of 382, of which was evaluated through the technique of McMaster. A prevalence of 17.02% was obtained. Significant differences in the percentage distribution of the *Eimeria* spp. were found in the different Municipalities, being

centered the biggest percentage in the Municipality of Pampán (P = 0.0000). The biggest percentage in the positive samples presented loads of between 50 and 200 oocysts per gram of faces (P = 0.0000). The biggest infection rates were evidenced in earth floors (P \leq 0.0055) and in the rainy time of the year (P \leq 0.0055).

Key words: Eimeria spp., egg-laying hens, prevalence.

INTRODUCCIÓN

La Avicultura constituye a nivel mundial, un rubro de gran importancia, ya que contribuye con un consumo de 20 kg de carne y 140 unidades de huevos per cápita al año [11].

En Venezuela la producción avícola ha crecido vertiginosamente, al mismo ritmo se ha incorporado a la dieta, llegando a estimarse que el 54% de la proteína de origen animal consumida por la población venezolana es aportada por la industria avícola; por otra parte este crecimiento del sector ha producido fuentes de trabajo en forma directa e indirecta, aspectos importantes para la socio-economía del país [7].

Es más que evidente la necesidad de mantener la eficiencia del proceso productivo avícola, a través de un efectivo programa de bioseguridad en donde se involucre la limpieza y desinfección de instalaciones, equipos y otros insumos que se utilizan en la producción animal [13]. La presencia de parasitosis producidas por protozoarios, entre otros, ha justificado el uso de productos profilácticos, como los coccidiostáticos, en las raciones para controlar la eimeriosis en el tracto digestivo de las aves, principalmente en pollos de engorde [4]. Otros aspectos a considerar son los programas de manejo que contro-

Recibido: 22 / 04 / 2005. Aceptado: 09 / 06 / 2006.

len la humedad de la cama y disminuyan el stress en los galpones para evitar mayor susceptibilidad en los animales [6]. Por otra parte, es necesario prestar atención a los requerimientos nutricionales, que ejercen un papel importante en el adecuado funcionamiento de la respuesta inmune y la inmunoprofilaxis la cual es utilizada con mayor frecuencia en reproductoras y ponedoras, en este sentido es conveniente tener una supervisión estricta en la aplicación de la misma ya que por lo general son vacunas vivas [9]; aunque se han realizado investigaciones con vacunas atenuadas trivalentes (Eimeria acervulina, E. máxima y E. tenella) y han sido eficaces ante infecciones naturales [18].

La eimeriosis es un enfermedad gastrointestinal producida por protozoarios del género Eimeria, la cual puede afectar diversas especies domésticas como bovinos, ovinos, caprinos, cerdos, conejos, y aves; constituyéndose en una enfermedad de importancia sanitaria en las explotaciones pecuarias. Se manifiesta a través de diarrea, inquietud y niveles variables de mortalidad [4]; es importante su control especifico ya que de lo contrario produce daños económicos producto de la interrupción del crecimiento y mala absorción de los alimentos [9] por la disminución de la actividad enzimática a nivel de duodeno y yeyuno, lo cual reduce la digestión y absorción de proteínas, e incrementa la excreción de nitrógeno y por ende disminuye la proteína muscular y reduce la ganancia de peso corporal en aves infectadas [19]; por otra parte la eimeriosis puede ser un factor coadyuvante para la instalación de otras enfermedades como la enteritis necrótica [4, 12] ya que incrementa la producción de mucus que a su vez favorece el crecimiento del Clostridium perfringens produciendo mucólisis dañando tejido y aumentando su permeabilidad [20].

La estructura de propagación de estos protozoarios es el ooquiste el cual se produce en cantidades exorbitantes; una coccidia puede producir medio millón de oocistos durante su ciclo vital y una sola ave infectada puede ser la fuente de 65 millones de oocistos de estos parásitos [10].

Ruiz [15] especifica que existen nueve diferentes especies del género Eimeria en aves de las cuales seis son los que tienen implicaciones económicas en la avicultura como son: E. tenella, E. necatrix, E. acervulina, E. brunetti, E. mitis, y E. hagani.

En la región zuliana existen por lo menos cinco especies parasitando pollos de engorde: E. acervullina, E. maxima, E. brunetti, E. tenella y E. necratix, siendo las tres primeras las más prevalentes [9].

En los estados Táchira y Trujillo existe la mayor cantidad de granjas de pollos de engorde y ponedoras de la zona Andina, por lo que es importante determinar la prevalencia de esta enfermedad que tiene una repercusión importante desde el punto de vista económico-sanitario.

En este orden de ideas se planteó como objetivo del presente trabajo determinar la presencia de Eimeria spp. en heces de la población de gallinas ponedoras ubicadas en tres Municipios del estado Trujillo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área estudiada

El presente trabajo fue realizado en los municipios Boconó, Pampán y Carvajal. Las características climatológicas de la zona de estudio pueden ser discriminadas de la siguiente manera: El municipio Boconó, ubicado a 1185 msnm, presenta una temperatura media anual de 21°C y una precipitación de 1009 mm al año. El municipio Pampán ubicado a 468 msnm con temperaturas medias anuales de 25,9°C y precipitación de 1459 mm al año; mientras que el municipio Carvajal ubicado a 569 msnm con temperatura media anual de 24,6°C y una precipitación de 1071 mm al año [5].

Existen dos épocas del año marcadas en estos Municipios, una de escasa precipitación denominada época seca, que comprende los meses de diciembre a mayo y otras donde ocurre la mayor precipitación denominada época lluviosa, y comprende los meses de junio a noviembre.

Población

La población estuvo conformada por 8500 gallinas ponedoras de líneas comerciales que procedían de granjas avícolas de los municipios Boconó, Carvajal y Pampán [17].

Tamaño de la muestra

Se determinó el tamaño de la muestra a través de un muestreo estratificado [17]. Se estableció la precisión a través del margen de error (β) permisible de 0,05. Se aplicó la siquiente fórmula:

$$n = \frac{\sum_{i=1}^{L} Ni^2 \frac{Pi \ qi}{wi}}{N^2 D + \sum_{i=1}^{L} Ni \ Pi \ qi}$$

L= Número de estratos

Ni = tamaño de cada estrato

pi = Proporción $p_1 = p_2 = p_3 = p_4 = p_5 = 0.5$

Complemento de pi es 0,05 Margen de error. $D = \frac{\beta^2}{4}$, D =

donde β es error máximo permisible: 0,05

$$D = \frac{(0,05)^2}{4} = 0,000625$$

N = Tamaño de la población: 8500, requiriéndose 382 aves como mínimo para obtener resultados válidos estadísticamente.

Así:

$$w_1 = \frac{1000}{8500} = 0.12$$
; $w_2 = 0.33$; $w_3 = 0.06$; $w_4 = 0.15$; $w_5 = 0.34$

 $382 \times 12\% = 46$

En la TABLA I se presenta la localidad, la población (N) y el número de muestras necesarias (n) que participan en este estudio.

Toma de la muestra

El muestreo se realizó durante los meses de noviembre 2003 y abril 2004. Se recolectaron muestras individualizadas directamente de las aves escogidas al azar en horas de la mañana, se colocaron en bolsas plásticas y una vez identificadas se introdujeron en cavas refrigeradas para ser trasladadas al laboratorio de Ecología de Parásitos del Núcleo Universitario Rafael Rangel de la Universidad de los Andes donde fueron conservadas a 4°C hasta su procesamiento dentro de un periodo de 7 días.

En cada visita se realizó una entrevista con el fin de recolectar información sobre características de las instalaciones, tipo de comedero y bebedero (manual o automático), tipo de cama y si realizaron deparasitaciones con compuestos coccidicidas. Por otra parte se tomó en cuenta la época del año en la cual se realizó la recolección de las heces. Esto se hizo con la idea de relacionar algunos de estos factores con la prevalencia de eimeriosis en la zona.

Análisis de la muestra

El análisis de la muestra para determinar el número de ooquistes por gramo de heces (OPGH) se realizó a través de la técnica de Mc Master [2] la cual consistió en: identificar un vaso de precipitado con un número igual al de la muestra, pesar 2 gramos de heces a los cuales se les adicionó 28 mL de una solución sobresaturada de cloruro de sodio (densidad 1,18 a 1,20 g/mL) y se homogenizó utilizando un agitador magnético, se coló para extraer las partes gruesas, y se extrajo con un

gotero una cantidad suficiente para llenar las dos cuadrículas de la cámara de McMaster. Se dejó reposar por 5 minutos y posteriormente se procedió a observar en el microscopio para la identificación de los ooquistes y su contaje utilizando el objetivo 10X, finalizado el conteo el resultado se multiplicó por el factor de corrección que en este caso era 50 y se expresó como OPGH. Tomando en consideración experiencias previas de los autores se clasificaron los OPGH de las aves positivas a *Eimeria* spp. en tres rangos: 50-200, 300-500 y mayores de 500, pudiéndose definir los mismos como forma subclínica, moderada y fuerte, respectivamente.

Análisis estadísticos

Los resultados fueron analizados utilizando la prueba de Z para comparar la positividad entre los Municipios y entre los diferentes rangos antes mencionados. También se utilizó para comparar las prevalencias entre los factores como son: si desparasitan o no, época del año y tipo de piso [8].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 382 muestras sometidas al análisis coproparasitológico 65 resultaron positivas a *Eimeria* spp. (TABLA II). El hecho de que estas muestras sean de aves de postura y no abunden referencias en el país que permita comparar estos resultados, no deja de ser importante para la industria avícola, ya que la eimeriosis constituye un factor de gran relevancia debido a su alta morbilidad y mortalidad que compromete la salud y producción no solo en pollos de engorde sino también en ponedoras [14].

Vergani y Toro [21] realizaron observaciones pioneras sobre eimerias en aves de corral en Venezuela, mientras que en otros países como Cuba refieren valores de prevalencia de 45% [16] y 53% [3]. En este trabajo se determinó una prevalencia de 17,02% (TABLA III) valores que están por debajo de los obtenidos por los diferentes autores citados.

En la TABLA IV se presenta la distribución porcentual de las muestras positivas a *Eimeria* spp. en los diferentes Municipios estudiados. En dicha tabla se puede apreciar que el

TABLA I

POBLACIÓN DE PONEDORAS MUESTREADAS. MUNICIPIOS BOCONÓ, PAMPÁN Y CARVAJAL, ESTADO TRUJILLO,

VENEZUELA, 2004 / POPULATION OF EGG-LAYING AND NUMBER OF TAKEN SAMPLES IN THE MUNICIPALITIES OF BOCONÓ, PAMPÁN AND

CARVAJAL. TRUJILLO STATE, VENEZUELA, 2004

Municipio	Localidad	N	n
Boconó	Boconó	1000	46
Pampán	Flor de Patria	2800	126
	El Tablón	2900	130
Carvajal	El Filo	1300	57
	Las Mesetas	500	23
Total		8500	382

TABLA II

MUESTRAS POSITIVAS A Eimeria spp. SEGÚN LOCALIDADES. MUNICIPIOS: BOCONÓ, PAMPÁN Y CARVAJAL.

ESTADO TRUJILLO, VENEZUELA, 2004 / POSITIVE SAMPLES OF Eimeria spp. ACCORDING TO LOCALITIES. MUNICIPALITIES: BOCONO,

PAMPAN AND CARVAJAL. TRUJILLO STATE, VENEZUELA, 2004

Municipio	Nº de muestras positivas		
	Localidad	Evaluadas	Eimeria spp
Boconó	Boconó	46	02
Pampán	Flor de Patria	126	40
	El Tablón	130	00
Carvajal	Las Mesetas	23	05
	El Filo	57	18
Total		382	65

TABLA III

PREVALENCIA DE Eimeria spp. SEGÚN LOCALIDADES.
MUNICIPIOS: BOCONÓ, PAMPÁN Y CARVAJAL.
ESTADO TRUJILLO, VENEZUELA, 2004 / PREVALENCE OF
Eimeria spp. ACCORDING TO LOCALITIES. BOCONO, PAMPAN AND
CARVAJAL MUNICIPALITIES. TRUJILLO STATE, VENEZUELA, 2004

Municipio	Localidad	Prevalencia Eimeria spp.(%)
Boconó	Boconó	4,35
Pampán	Flor de Patria	31,75
	El Tablón	0
Carvajal	Las Mesetas	21,74
	El Filo	31,58
Total		17,02

TABLA IV

DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LAS MUESTRAS POSITIVAS A Eimeria spp. EN TRES MUNICIPIOS DEL ESTADO TRUJILLO. VENEZUELA, 2004 / PERCENTAGE DISTRIBUTION OF POSITIVE SAMPLES TO Eimeria spp. IN THREE MUNICIPALITIES OF TRUJILLO STATE. VENEZUELA, 2004

Municipio	Distribución Porcentual (%) Eimeria spp.	
Boconó	3,08ª	
Pampán	61,54b	
Carvajal	35,38c	
Total	100	

Pab = 0,0000. Pac = 0,0000. Pbc = 0,01.

61,54% corresponde al municipio Pampán, el 35,38% al municipio Carvajal y el 3,08% restante al municipio Boconó, determinándose que existen diferencias significativas entre la positividad de los diferentes municipios. En el municipio Pampán se encontró el mayor porcentaje de muestras positivas (TA-BLA IV), lo cual podría estar determinado por la mayor temperatura y precipitación presentes allí en comparación con los

otros Municipios, lo cual incide en el aumento de la humedad en la zona y por ende influencia positivamente las condiciones para la proliferación de las eimerias. Es conveniente acotar que en este Municipio existen granjas que no desparasitan (No suministran anticoccidiales), por lo que este factor puede estar involucrado.

La TABLA V resume la clasificación de las cargas de OPGH de las muestras en los tres Municipios estudiados. La menor cantidad de OPGH se encontró en el primer rango, en el cual se ubicó el mayor porcentaje de las muestras positivas y fue diferente significativamente (P = 0,0000) a los otros dos rangos.

De las entrevistas realizadas, el 100% de las explotaciones presentó un tipo de construcción con alambre de gallinero, paredes de bloques y techo de zinc, con cama de concha de arroz, comederos manuales y bebederos automáticos.

Se resaltan diferencias importantes en la prevalencia relacionadas con algunos factores, siendo mayores significativamente (P \leq 0,0055) en explotaciones que no desparasitan (TABLA VII), que tienen piso de tierra (TABLA VIII) y en las épocas lluviosas (TABLA VIII).

Martínez y Bohórquez [10] reportaron en el municipio Maracaibo del estado Zulia, una prevalencia de Eimeriosis en pollos de engorde de 51,08% y 29,9% para las épocas lluviosa y seca, respectivamente. Los datos de este trabajo determinan comportamientos de prevalencias con respecto a la época lluviosa (24,45%) y seca (10,95%) semejantes a las obtenidas por Martínez y Bohórquez [10], pero con valores inferiores.

Se puede decir que la manifestación de la eimeriosis en este estudio fue en forma subclínica, ya que el mayor porcentaje de las muestras positivas presentaron cargas de entre 50 y 200 OPGH; sin embargo, no hay que restarle importancia dado que, tanto las formas clínica como subclínica de esta enfermedad, causan pérdidas económicas [1].

Tamasaukas y col. [19], refieren que es conveniente realizar una profilaxis integrada para el control de dicha enfermedad. En este sentido, en el presente trabajo se comprueba que

TABLA V

OOQUISTES DE Eimeria spp. POR GRAMO DE HECES (OPGH) EN TRES MUNICIPIOS DEL ESTADO TRUJILLO.

VENEZUELA, 2004 / OOCYSTS PER GRAM OF FACES (OPGF) OF Eimeria spp. IN THREE MUNICIPALITIES OF TRUJILLO STATE.

VENEZUELA, 2004

Municipio	OPGH		
	50-200	300-500	> 500
Boconó	02	00	00
Pampán	34	02	04
Carvajal	15	02	06
Total	51	4	10
%	78,46 ^a	6,15 ^b	15,38 ^c

Pab = 0,0000. Pac = 0,0000. Pbc = 0,01.

TABLA VI PREVALENCIA DE Eimeria spp. DE ACUERDO A SI DESPARASITAN / PREVALENCE OF Eimeria spp ACCORDING TO DESPARASITATION

	Muestreo total	Positivos	Prevalencia
Desparasitan	210	23	10,95b
No desparasitan	172	42	24,45 ^a
Total	382	65	35,40

Proporciones marcadas con letras distintas son estadísticamente diferentes (P ≤ 0,0055).

TABLA VII

PREVALENCIA DE Eimeria spp. DE ACUERDO AL TIPO DE PISO / PREVALENCE OF Eimeria spp. ACCORDING

TO THE TYPE OF FLOOR

-	T-4-1		
	Total	Positivos	Prevalencia
Tierra	336	63	18,75 ^a
Cemento	46	02	4,34 ^b
Total	382	65	23,09

Proporciones marcadas con letras distintas son estadísticamente diferentes (P ≤ 0,0055).

TABLA VIII

PREVALENCIA DE Eimeria spp. DE ACUERDO A LA ÉPOCA DEL AÑO / PREVALENCE OF Eimeria spp. ACCORDING

TO THE STATION OF THE YEAR

Éроса	Muestreo		
	Total	Positivos	Prevalencia
Seca (abril)	210	23	10,95 ^b
Lluvia (Noviembre)	172	42	24,45 ^a
Total	382	65	35,40

Proporciones marcadas con letras distintas son estadísticamente diferentes (P ≤ 0,0055).

cuando se utilizan los anticoccidiales, disminuye la prevalencia de la eimeriosis (TABLA VI).

La más baja prevalencia observada en el piso de cemento con respecto al piso de tierra (TABLA VII) no coincidió con los datos reportados por Martínez y Bohórquez [10], los cuales obtuvieron menores aves positivas en el piso de tierra. Ruiz [14] refiere que los ooquistes detienen su desarrollo cuando hay altas temperaturas, por lo que en las épocas secas disminuyen las incidencias de eimeriosis. Esto permite confirmar, los hallazgos del presente trabajo, de prevalencias menores (10,95%) en la temporada seca con respecto a las lluviosas (24,45%; TABLA VIII).

CONCLUSIONES

La prevalencia de Eimeriosis en gallinas ponedoras de tres Municipios del estado Trujillo fue de 17,02%.

El mayor número de muestras positivas presentó cargas parasitarias entre 50-200 OPGH.

Se evidenciaron las mayores tasas de infección en los pisos de tierra y en las explotaciones que no desparasitaron.

La época del año incide sobre la presencia de la coccidia, siendo más baja la prevalencia en la época seca.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AHO, P. Empresas líderes. Rev. Industr. Avíc. 43(1): 8-35. 1996.
- [2] DÍAZ U, C. Parasitología de los animales domésticos en Venezuela. Edit. Universitaria de la Universidad del Zulia. Maracaibo (Venezuela). Volumen I. 1097 pp. 1971
- [3] GÓMEZ, E.; BLANDINO, T. Determinación de la extensión de invasión de coccidiosis en varias categorías de aves de algunas granjas de la provincia Habana. Rev. Cub. de Cien. Avíc. 9:137. 1982.
- [4] GUANIPA, D. Enfermedades producidas por protozoarios. Rev. Venez. Avíc. 15(30):29-31. 1999.
- [5] HERNÁNDEZ, R. Zonificación Agroclimática del estado Trujillo. Volumen I. M.A.R.N. Región Ambiental Estatal de Trujillo. Venezuela 105 pp. 1988.
- [6] HESS, J.B.; ECKMAN, M.K. Influencia del manejo de la granja. Rev. Venez. Avíc. 16(34): 38-40. 2001.
- [7] LEAL, S. De la retórica a los hechos!!!! Rev. Venez. Avíc. 16(35):27-29. 2001.
- [8] LIND, D.; MASON, R.; MARCHAL, W. Estadística para administración y economía. 3ª Ed. McGraw-Hill. 575 pp. 2001.
- [9] MARTÍNEZ DE CH., N.; ARCAY DE P., L.; CHIRINOS, A. Estudios de coccidia en pollos de engorde del municipio Maracaibo: Identificación de especies. Rev. Científ. FCV-LUZ V(3):199-206. 1995.

- [10] MARTÍNEZ DE CH., N.; BOHÓRQUEZ, N. Prevalencias y factores asociados a la coccidiosis en pollos de engorde. Rev. Científ. FCV-LUZ. IV(1):25-36. 1994.
- [11] MULDER, R.W.A. La producción avícola en los países en desarrollo y su competitividad con la avicultura de la Unión Europea. Rev. Selecc. Avíc. 45(1): 24. 2003.
- [12] NORTON, R. Enteritis necrotica de los pollos. Rev. Venez. Avíc. 16(34):8-9. 2001.
- [13] RODRÍGUEZ, J. A. Desinfección virtual. **Rev. Venez. Avíc.** 16(35):18-22. 2001.
- [14] RUIZ, H. Coccidiosis Aviar. 2do Ciclo de Conferencias sobre Producción Avícola. Facultad de Agronomía y Facultad de Ciencias Veterinarias de la UCV. FONAIAP-CENIAP. Maracay. 09/23-24. Venezuela: 8 pp. 1982.
- [15] RUIZ, H. Tipificación de especies de coccidios aisladas de pollos de engorde. Área de parasitología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central. Maracay, Venezuela (Mimeografiado) 50 pp. 1982.
- [16] RUIZ, R.J. Incidencia de coccidiosis en aves bajo tratamiento profiláctico con coccidiostático durante 3 años, en las unidades avícolas de la provincia de matanzas. Rev. Cub. de Cien. Avíc. 9:111. 1982.
- [17] SCHEAFFER, R.L.; MENDENHALL, W.; OTT, L. Elementos del muestreo. Grupo Editorial Ibero América. Instituto Tecnológico Autónomo de México (ITAM). México. 321 pp. 1986.
- [18] TAMASAUKAS, R.; FLORES, B.; RODRÍGUEZ, H.; PU-RROY, R.; ROA, N.; RUIZ, H. Evaluación de la eficacia de una vacuna trivalente de cepas Atenuadas de Eimeria spp. Para el control de la coccidiosis aviar en sistemas de producción con pollos de engorde, Venezuela. Rev. Científ. FCV-LUZ. XII(2):608-613. 2002.
- [19] TAMASAUKAS, R.; RUIZ, H.; ROA, N. Relación costobeneficio de la profilaxis de la coccidiosis aviar. Rev. Científ. FCV-LUZ VIII(3):217-221. 1998.
- [20] VANDER S, J.H. Coccidiosis y enteritis necrótica. Rev. Selecc. Avíc. 45(1): 23. 2003
- [21] VERGANI, S.F.; TORO B., M. Observaciones sobre coccidia de aves en Venezuela. Rev Vet Venez 131:330-338. 1967.