

LES MÉTHODES DE DÉTECTION DE *FASCIOLA HEPATICA* DANS LES TROUPEAUX BOVINS EN FRANCE

METHODS OF DETECTION OF FASCIOLA HEPATICA IN CATTLE IN FRANCE

Par Etienne MEISSONNIER⁽¹⁾ et Christian MAGE⁽²⁾
(communication présentée le 22 novembre 2007)

RÉSUMÉ

La fasciolose bovine qui se manifeste maintenant en France le plus souvent sous une forme subclinique, pénalise lourdement les troupeaux atteints. Elle demeure cependant ignorée car sous-diagnostiquée par les vétérinaires.

Après un rappel théorique sur les caractéristiques de sensibilité et de spécificité d'un test de diagnostic, les auteurs décrivent successivement les avantages et inconvénients de l'inspection des foies à l'abattoir, des méthodes coprologiques par sédimentation et/ou flottaison, et des méthodes de dosages immunologiques à partir du sang ou du lait.

Les méthodes classiques de coprologie sont indispensables pour le diagnostic des parasitoses digestives en routine, mais peu sensibles et peu précises pour le diagnostic de la fasciolose bovine. Les méthodes immuno-enzymatiques de type ELISA, permettant de rechercher des anticorps contre la grande douve tant dans le sang que dans le lait, ont amélioré la capacité de diagnostic du vétérinaire praticien. Cependant, en l'absence de validation rigoureuse, elles ont été parfois mises en défaut par manque de sensibilité ou de spécificité. Grâce aux outils statistiques modernes, leur seuil de positivité peut être optimisé. Ces méthodes s'imposent maintenant comme les plus pertinentes pour déterminer la prévalence d'une infestation à *F. hepatica* à partir des analyses des sérums de mélange dans un groupe ou dans un troupeau entier de bovins de race laitière ou allaitante.

Mots-clés : *Fasciola hepatica*, fasciolose, bovin, diagnostic, inspection des viandes, coprologie, sérologie, ELISA.

(1) Directeur technique, Janssen Santé Animale, TSA 91 003, 92 787 Issy-Les-Moulineaux Cedex 09.

(2) Consultant en Santé Animale, 20, rue Jean-Paul Sarre, 87 260 Pierre-Buffière.

SUMMARY

Bovine fasciolosis which now is expressed most frequently in a subclinical form in France, heavily penalizes infected cattle herds, but it is often ignored because under-diagnosed by veterinary surgeons.

After a theoretical recalling on the characteristics of sensitivity and specificity of a diagnosis test, the authors describe post mortem inspection of livers, coprological methods by sedimentation and/or flotation, and serological methods from blood and milk.

Classical methods of coprology are essential for the routine diagnosis of digestive parasitoses, but not sensitive and accurate enough for the diagnosis of fasciolosis in cattle. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) methods for the detection of antibodies against liver fluke as much in the blood as in the milk improve the diagnosis capacity of the veterinary practitioner. But, in absence of rigorous validation, these methods have sometimes failed by lack of sensitivity or specificity.

Modern statistical tools now allow the optimization of the cut-off point of the serological tests. ELISA tests are the most reliable methods to detect a Fasciola hepatica infestation in a group or a full herd of beef or dairy cattle.

Key words: *Fasciola hepatica, fasciolosis, cattle, diagnosis, meat inspection, coprology, serology, ELISA.*

En 2006, une équipe de chercheurs de Zurich publie les résultats d'une étude sur la fasciolose bovine, réalisée à partir de 1 331 bovins abattus dans deux abattoirs suisses (Rapsch *et al.* 2006). Quatre méthodes de diagnostic (inspection des foies à l'abattoir, recherche des œufs par examen microscopique d'échantillons de bile et de fèces, détection sérologique d'anticorps spécifiques par un test ELISA du commerce) ont été utilisées simultanément pour évaluer la prévalence réelle de la fasciolose dans le cheptel national. L'objectif des auteurs était de connaître la méthode offrant la meilleure représentation de cette parasitose. En appliquant les techniques statistiques bayésiennes (chaîne de Markov-Monte Carlo), ils concluent que la prévalence de la fasciolose bovine en Suisse est de 18% (15,9 à 20,3%) au lieu des 11% estimés antérieurement (Ducommun *et al.* 1991). A partir d'une analyse bibliographique des données zootechniques et économiques, Schweitzer *et al.* (2005) estiment les pertes, en Suisse, à 299€ par bovin, soit à un total de 52 millions € par an.

En France, Alzieu & Courouble (2004) rappellent la nécessité de hiérarchiser, selon leur prévalence et leur gravité, les trématodoses qui affectent les cheptels bovins : fasciolose, dicrocoeliose et paramphistomose. La fasciolose bovine mérite une attention particulière car sa présence est « constante, grave, banalisée et sous-diagnostiquée ». Son impact sur les performances zootechniques et économiques reste élevé. A la suite d'une vaste enquête épidémiologique effectuée en 2004-2005 dans 1 331 troupeaux de races allaitantes, en réalisant le même test sérologique sur un ou deux sérums de mélange, la prévalence individuelle apparente de la fasciolose bovine a été estimée en moyenne à 42,4% (de 15 à 88% selon les 20 départements concernés) (Espinasse 2006; Meissonnier & Boutet, 2007).

En épidémiologie, chaque test de diagnostic doit être validé selon des critères précis. En raison de l'évolution de la fascio-

lose bovine en France, devenue essentiellement subclinique, les signes cliniques caractéristiques (anémie, diarrhée, œdème déclive) ont disparu et il serait préférable de parler d'infestation plutôt que de maladie.

Dans cet article, nous avons choisi de considérer les lésions hépato-biliaires, l'excrétion fécale d'œufs de grande douve, la présence d'anticorps spécifiques dans le sang ou dans le lait, pour retenir parmi ces critères de diagnostic, celui qui permet d'estimer la prévalence réelle de cette infestation.

ASPECTS THÉORIQUES

Pour faciliter la compréhension, nous rappelons préalablement comment apprécier la fiabilité des résultats obtenus par un test de diagnostic dans un effectif de bovins, en prenant comme exemple les méthodes de diagnostic de l'infestation par *F. hepatica*.

Schématiquement, le résultat d'un test s'exprime :

- soit par une variable qualitative binaire, par exemple la présence ou l'absence de douves vivantes dans le foie à l'inspection *post mortem*, d'œufs de grandes douves dans les fèces : le résultat du test est alors positif ou négatif;
- soit par une variable quantitative ou semi-quantitative continue, par exemple la concentration d'une enzyme hépatique dans le sang ou d'une densité optique mesurée au cours d'une réaction immuno-enzymatique.

Un test est caractérisé par sa sensibilité et sa spécificité dont l'évaluation implique que le vrai statut d'un sujet soit connu. Elle n'est possible que si on dispose d'un test de référence (*gold standard* des anglo-saxons) ou d'une association de tests, qui permettent de certifier et d'optimiser son utilisation (McKenna & Dohoo, 2006).

La sensibilité et la spécificité sont calculées à partir des quatre situations [animaux vrais positifs (a) ou faux positifs (b), faux négatifs (c) ou vrais négatifs (d)] rencontrées lors de l'application du test, lequel doit permettre de conclure si un bovin est infesté ou non par des grandes douves (**tableau 1**):

- la sensibilité du test, exprimée par le rapport $a/a + c$, est la probabilité d'obtenir un résultat positif, lorsqu'un bovin est réellement infesté (**tableau 1**);
- sa spécificité (rapport $d/b + d$) est la probabilité d'obtenir un résultat négatif, lorsqu'un bovin est réellement exempt de l'infestation;
- sa valeur prédictive positive (rapport $a/a + b$) est la probabilité que le bovin soit infesté, lorsque le résultat de son test est positif;
- sa valeur prédictive négative (rapport $d/c + d$) est la probabilité que le bovin ne soit pas infesté, lorsque le résultat de son test est négatif.

Résultat du test	Infestation présente	Infestation absente	Total
Test positif	Vrai positif : a	Faux positif : b	a + b
Test négatif	Faux négatif : c	Vrai négatif : d	c + d
Total des résultats	a + c	b + d	a + b + c + d

Tableau 1 : Résultats possibles d'un test de diagnostic sérologique (d'après Thrusfield 1986).

En pratique, il convient de trouver le meilleur compromis entre sensibilité et spécificité qui évoluent en sens inverse. Si la sensibilité est élevée, on prend le risque d'augmenter le nombre des faux-positifs, et dans le cas d'une spécificité élevée, celui des faux-négatifs. Ces deux propriétés du test dépendent de la définition par l'opérateur de la meilleure valeur de son seuil de positivité (**figure 1**).

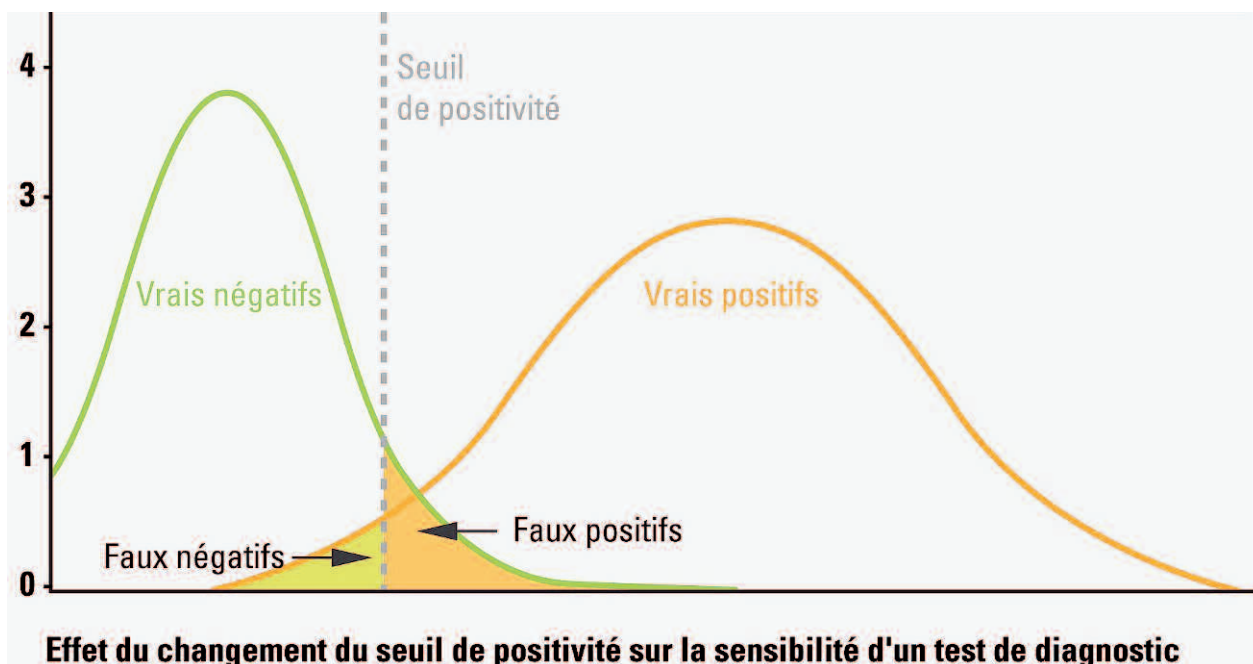


Figure 1 : Choix du seuil de positivité d'un test. La figure illustre la répartition bimodale d'une variable (résultats d'un test sérologique par exemple) dans une population d'animaux (les valeurs de la variable croissent de façon continue le long de l'axe des abscisses). Cette répartition des valeurs permet de distinguer deux sous-populations, à gauche celle des animaux négatifs, présumés sains (faibles valeurs de la variable) et à droite, celle des animaux positifs présumés atteints (fortes valeurs de la variable). Le choix du seuil de positivité fixe la valeur de la variable au dessous de laquelle des animaux sont considérés comme de faux négatifs et au dessus de laquelle des animaux sont considérés comme de faux positifs. Il permet le calcul de la sensibilité et de la spécificité du test (voir texte). Ces deux critères dépendent donc du choix du seuil de positivité. Son déplacement vers la gauche augmente la sensibilité du test au détriment de sa spécificité et son déplacement vers la droite entraîne les effets inverses.

La sensibilité et la spécificité dépendent uniquement des qualités du test (et de son opérateur), tandis que les valeurs prédictives dépendent aussi de la prévalence de l'infection dans une population donnée:

- plus le test est sensible, meilleure est la valeur prédictive positive,
- plus le test est spécifique, meilleure est la valeur prédictive négative.

Le résultat d'un test sérologique de l'infestation par *Fasciola hepatica* dans un troupeau de bovins, dépend :

- de la sensibilité et la spécificité du test réalisé sur le sérum d'un animal,
- de la représentativité d'un sérum de mélange, composé de plusieurs sérums individuels,
- du nombre de bovins à prélever, lequel est fonction de la taille du groupe de bovins qui pâturent dans la même prairie : dans un tel sous-troupeau, un sérum de mélange est habituellement réalisé à partir des prélèvements de 10 animaux,
- et du nombre de sous-troupeaux à tester, lequel est fonction du nombre de groupes de bovins qui pâturent dans des prairies différentes.

APPLICATION AUX MÉTHODES DE DÉTECTION DE *FASCIOLA HEPATICA* DANS UN TROUPEAU

Plusieurs sources d'informations sont théoriquement possibles pour détecter la présence de *F. hepatica* dans tout ou partie d'un troupeau. Nous n'aborderons que les méthodes spécifiques les plus courantes :

- l'inspection des foies à l'abattoir,
- la recherche des œufs de grande douve dans les fèces,
- l'analyse des anticorps spécifiques dans le sérum sanguin,
- l'analyse des anticorps spécifiques dans le lait.

Inspection des foies à l'abattoir

La cholangite chronique est une inflammation des canaux biliaires, consécutive à une infestation prolongée ou répétée, due surtout à l'action mécanique et phlogogène de trématodes : soit des grandes douves (*Fasciola hepatica*) adultes, localisées dans les canaux biliaires principaux, soit de petites douves (*Dicrocoelium lanceolatum*) adultes dans les petits canaux biliaires (Le Net *et al.* 2005). Dans de nombreuses régions françaises, les deux infestations coexistent chez les mêmes bovins (Dorchies *et al.* 1988 ; Bichet *et al.* 1998). Comme l'hépatomégalie, la fibrose, la nécrose et les abcès hépato-biliaires, ces lésions ne sont pas pathognomoniques de la fasciolose bovine. L'inspection sanitaire retient le critère de la présence de douves vivantes ou calcifiées : il dépend de l'observation attentive des grands canaux biliaires par le préposé d'abattoir, après deux ou trois incisions réglementaires de la face ventrale du foie. En cas de faible infestation (< 10 douves/foie), cette technique se révèle peu efficace pour détecter leur présence. Les faux négatifs sont donc fréquents comme l'ont observé les auteurs qui ont réalisé la dissection complète des foies (Gimard 2001 ; Mekroud *et al.* 2006 ; Rapsch *et al.* 2006).

Auteur/Année	Nombre de foies examinés	Sensibilité	Spécificité
Gimard (2001)	229	75 %	85 % *
Mekroud <i>et al.</i> (2006)	175	64,5 %	ND
Rapsch <i>et al.</i> (2006)	890	63,5 % (55,6-70,6%)	100 %

*15 % de foies cholangitiques avec présence de *D. lanceolatum*

Tableau 2 : Sensibilité et spécificité de la méthode d'inspection des foies de bovins à l'abattoir, calculées par rapport à des méthodes de référence (cf. références bibliographiques).

L'examen *post mortem* a donc une faible sensibilité, de l'ordre de 65 % (**tableau 2**), vraisemblablement inférieure si la prévalence de l'infestation est faible. De plus, il ne permet pas de détecter les infestations de moins de 3 mois (période de migration larvaire dans le parenchyme hépatique).

D'une enquête réalisée dans un abattoir de la région des Pays de Loire, sur 3 274 bovins adultes abattus, on retiendra que les foies ont été saisis pour fasciolose chez 3,7 % des bovins de race Prim'holstein, chez 8,0 % de ceux de race normande et 10,8 % de ceux de race charolaise : dans 75 % de ces saisies, la présence de grandes douves vivantes ou calcifiées a été mise en évidence (Gimard 2001). Une autre enquête porte sur 4 225 foies de brouillards mâles, de races charolaise et limousine, nés en France et engraisés dans le Nord de l'Italie : la fréquence élevée des saisies, au cours de l'hiver 2002-03, pour cholangite avec ou sans présence de douves vivantes, a été de 31 % dans la race charolaise et de 41 % dans la race limousine (Casartelli & Bonfanti, 2005). D'après un récent sondage auprès d'abattoirs de Normandie et de Bourgogne, les saisies au motif de la présence de grandes douves vivantes seraient actuellement en régression : de l'ordre de 1 %, voire au dessous (J.P. Berraud, A. Delafosse, P. Piette, com. personnelles).

Le problème majeur de cette inspection en abattoir réside dans l'absence fréquente de transmission des motifs de saisie des foies aux éleveurs et à leurs vétérinaires sanitaires, dans les zones où la fasciolose est encore enzootique. Par exemple, nous avons constaté dans le Limousin que cette absence de la remontée des informations par les abattoirs peut conduire à un quasi-oubli de la fasciolose par les acteurs du terrain.

Le diagnostic coprologique

Au laboratoire d'analyses et au cabinet vétérinaire, le diagnostic coproscopique reste la démarche indispensable pour identifier la présence d'œufs d'helminthes ou d'oocystes de protozoaires dans les prélèvements fécaux des bovins jeunes et adultes. Comme précédemment, le diagnostic coprologique sera défaillant pendant la période prépatente (10 à 12 semaines) qui précède la maturité et les premières excréments fécales d'œufs par les grandes douves.

Les œufs sont récupérés par sédimentation ou par flottaison grâce à un liquide d'enrichissement, ou bien par sédimentation et flot-

taison. Ils sont ensuite comptés sous microscope à l'aide de la cellule de McMaster (Thienpont *et al.* 1979). L'interprétation des résultats est délicate car elle dépend de la méthode choisie. Happich & Boray (1969) préconisent plutôt la méthode de sédimentation. Raynaud *et al.* (1974) comparent les résultats obtenus par la sédimentation ou par la flottaison des œufs : la méthode de flottaison dans l'iodomercure de Potassium présente de meilleures qualités de reproductibilité, précision, sensibilité et rapidité, que celle de sédimentation.

Mais, l'iodomercure de Potassium demeure un liquide très toxique qui ne peut plus être utilisé actuellement. Il doit être remplacé par des solutions potentiellement moins toxiques comme le sulfate de Zinc à saturation. Courouble (2003), puis Cringoli *et al.* (2004) ont évalué l'intérêt de l'utilisation de telles solutions pour la recherche d'œufs d'un autre trématode, *D. lanceolatum*, en augmentant la masse du prélèvement fécal.

On doit également tenir compte de l'extrême variation de l'excrétion des œufs par les grandes douves adultes ; celle-ci varie d'un jour à l'autre chez un même bovin et chez les bovins infestés d'un même groupe (Duwel & Reisenleiter 1990). Quelle que soit la méthode, la sensibilité de l'analyse coprologique est d'autant plus faible que l'excrétion des œufs est plus faible (15 œufs par gramme, seuil de sensibilité des méthodes courantes).

Par ailleurs, les œufs de paramphistomes sont habituellement excrétés en plus grand nombre que ceux de grandes douves, en moyenne 24 fois plus d'après une enquête coprologique récente dans le département de la Creuse. Ils peuvent donc masquer les rares œufs de grandes douves, alors que ces derniers expriment un plus grand danger pour la santé des bovins. A ce sujet, Chauvin et Mage (1998) ont rappelé les critères qui permettent de différencier les œufs de *Fasciola hepatica* de ceux de *Paramphistomum daubneyi*.

La sensibilité du diagnostic coprologique varie de 33 % à 92 % selon les méthodes, la prévalence et l'intensité de l'infestation chez les bovins (**tableau 3**).

Pour l'améliorer, trois stratégies peuvent être adoptées :

- répéter les analyses à partir d'un même prélèvement fécal (Rapsch *et al.* 2006) ;
- augmenter la masse du prélèvement fécal (30 ou 50 g au lieu de 5 g) (Conceição *et al.* 2002 ; Courouble & Meissonnier, 2005 ; Salem *et al.* 2007) ;
- multiplier des analyses à partir de plusieurs animaux d'un même lot (Courouble & Meissonnier, 2005).

Auteurs	Nombre de bovins	Masse du prélèvement fécal	Sensibilité	Technique
Happich & Boray, 1969	23	3 g	39,8 - 42,3 %	Sédimentation
Lafay & Mage, 1976	227	5 g	50 %	Flottaison
Conceição <i>et al.</i> 2002	230	10 g	33,3 %	Sédimentation
	25	30 g	83,3 %	Sédimentation
Braun <i>et al.</i> 1995	204	6 g	68 %	Sédimentation
Anderson <i>et al.</i> 1999	92	5 g	66,7 %	Sédimentation
Rapsch <i>et al.</i> 2006	203	10 g	69 % (57,3 %-79,7 %)	Sédimentation
	256	10 g x 3	91,9 % (87,2-95,2 %)	Sédimentation

Tableau 3 : Comparaison de la sensibilité des différentes techniques coprologiques. Les méthodes de référence choisies varient selon les auteurs : dénombrement des douves adultes par dissection des foies à l'abattoir, dénombrement des œufs par examen microscopique d'échantillons de bile (Braun *et al.* 1995 ; Rapsch *et al.* 2006), inclusion de différents nombres d'œufs dans des fèces négatives, traitées par la même méthode coprologique de sédimentation que les échantillons de même poids, provenant d'animaux infestés (Happich & Boray, 1969 ; Conceição *et al.* 2002).

Si la quantité d'œufs de *F. hepatica* comptés par gramme de fèces, dans un lot de bovins, apparaît en relation avec le nombre moyen de douves adultes identifiés dans les canaux biliaires, en

déduire le degré d'infestation du foie par les grandes douves est source d'erreur d'interprétation par défaut, du fait de la large dispersion de leur nombre (**tableau 4**) (Malone & Craig, 1990).

Œufs dans 2 g de fèces	Nombre de bovins	Moyenne et écarts des nombres de douves adultes	Interprétation de l'excrétion
1 - 5	16	19,4 (3 - 107)	Variable ; habituellement faible
5 - 10	14	29,3 (1 - 242)	Modérée ; perte économique possible
10 - 40	15	60,3 (3 - 160)	Perte économique effective
> 40	30	171,2 (19 - 460)	Etat clinique

Tableau 4 : Excrétion fécale d'œufs de grandes douves chez des jeunes veaux sevrés et d'un an (d'après Malone & Craig, 1990).

Pour toutes ces raisons, le diagnostic coprologique est de moins en moins adapté pour la détection de l'infestation par *F. hepatica*, notamment dans les zones de faible prévalence, et doit être remplacé par le diagnostic sérologique.

Diagnostic sérologique à l'aide d'un produit antigénique d'excrétion-sécrétion (ES)

Boulard *et al.* (1985) appliquent une méthode ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) sur des sérums et des laits individuels de vaches laitières de quatre troupeaux infestés par *Fasciola hepatica*. L'antigène sélectionné est un produit d'excrétion-sécrétion (ES) de grandes douves recueillies en abattoir. Leurs premiers résultats constituent un progrès considérable : alors que les analyses coprologiques sont rarement positives, la fréquence des résultats séropositifs varie de 42 à 100 % dans les neuf troupeaux signalés à l'abattoir par une seule saisie de foie pendant les mois antérieurs à l'analyse sérologique ; elle est de 69 à 100 % dans les dix-neuf troupeaux signalés pour plusieurs saisies de foie.

Dans neuf autres troupeaux sans saisie de foie, les auteurs observent cependant de 0 à 65 % de bovins séropositifs, ce qui laisse suspecter une plutôt faible valeur prédictive négative du test sérologique.

Ultérieurement, Boulard et Régnault (1989) montrent que les réponses sérologiques individuelles chez les bovins expérimentalement infestés par des doses répétées de métacercaires sont variables, d'un bovin à l'autre, mais précoces (2 à 4 semaines après l'infestation expérimentale), et atteignent un plateau à partir de la 10^{ème} semaine après l'infestation. Le seuil de positivité est fixé à 20 % par rapport à un sérum négatif (0 %) et un positif (100 %) de référence.

Une analyse plus détaillée des antigènes ES de *F. hepatica* a été réalisée par la technique de l'immuno-empreinte (Chauvin *et al.* 1995). Elle permet d'évaluer qualitativement l'intensité de la réaction immunitaire due à chaque antigène. Parmi les 17 antigènes ES, huit induisent des anticorps qui reconnaissent aussi des antigènes autres que ceux de *F. hepatica*, chez les moutons infestés expérimentalement. Il s'agit des protéines de 12, 15, 27, 28,5, 30, 41 et 56 kDa. Les réactions les plus constantes concernent la protéine de 28,5 kDa contre laquelle les animaux réagissent spontanément dès le jour de l'ingestion des métacercaires et de manière beaucoup plus intense, à partir de la 6^{ème} ou 7^{ème} semaine après l'infestation.

Différentes équipes de recherche ont réalisé des tests sérologiques à l'aide d'antigènes ES, en général, sur des effectifs limités de bovins infestés expérimentalement ou naturellement par des grandes douves adultes, excrétrices d'œufs (**tableau 5**). Mais, étalonner les résultats obtenus dans des troupeaux infestés où existent des proportions variables de bovins indemnes et infestés, à l'aide de ceux recueillis dans des troupeaux totalement indemnes ou totalement infestés, est contestée sur le plan méthodologique (Leefflang *et al.* 2005).

Auteur	Effectif	Sensibilité	Spécificité	Seuil de positivité
Ibarra <i>et al.</i> (1998)	88	96,5 %	98,8 %	50 %
Anderson <i>et al.</i> (1999)	92	86,1 %	70 %	36 %
Bossaert <i>et al.</i> (2000)	225	94 %	92 %	26 %
Salami-Bejestani <i>et al.</i> (2005)	514	98 % (96 – 100 %)	95 % (93 – 98 %)	15 %

Tableau 5 : Sensibilité et spécificité des tests ELISA utilisant des antigènes ES, calculées par rapport à des méthodes de référence (cf. références bibliographiques).

Cette méthode révèle une excellente sensibilité, mais sa spécificité est limitée par les possibles réactions croisées des antigènes ES avec des anticorps induits par des trématodes (*Paramphistomum sp.* et *Dicrocoelium lanceolatum*), autres que *F. hepatica*, lorsque le seuil de positivité est faible, sensibilité et sensibilité variant en sens inverse, en fonction du choix du seuil de positivité (**figure 2**, Bossaert *et al.* 2000). Optimiser le test avec un seuil de positivité de 50 % n'est concevable que s'il est réalisé chez des animaux indemnes de toute infestation parasitaire et expérimentalement infestés par *F. hepatica* (Ibarra *et al.* 1998).

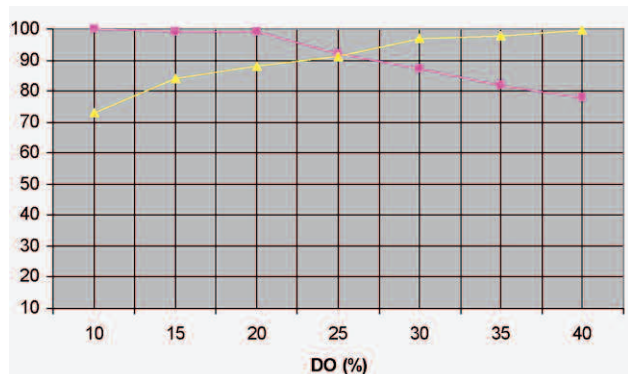


Figure 2 : Sensibilité (Δ) et spécificité (□) de la méthode ELISA à différents seuils de positivité, exprimés en pourcentage de la densité optique (d'après Bossaert *et al.* 2000). DO = densité optique mesurée par spectrophotométrie.

Diagnostic sérologique à l'aide de l'antigène f2

Sélection et identification de l'antigène f2

Biguet *et al.* (1962) publient une des premières études sur le diagnostic sérologique de la fasciolose chez l'homme. Ils préparent un produit antigénique de *Fasciola hepatica* à partir d'un broyat de grandes douves adultes, prélevées à l'abattoir, et l'utilisent comme antigène dans une réaction d'hémagglutination sur globules rouges de lapin. Appliqués à des sérums de patients atteints de fasciolose, les résultats de ce test d'hémagglutination sont comparés à ceux de l'immuno-électrophorèse sur gélose. Malgré l'excellente sensibilité de ce test, leur produit antigénique provoque des réactions croisées avec des sérums de patients atteints d'ascaridose, de bilharziose, de paragonimose

et/ou de clonorchose. L'analyse immuno-électrophorétique du produit antigénique confirme les parentés antigéniques avec les antigènes hydatiques pour sa fraction 10, avec *Schistosoma mansoni* pour sa fraction 11 et avec *Taenia saginata* et *Dicrocoelium lanceolatum* pour sa fraction 12. Seules cinq fractions antigéniques sont spécifiques de *F. hepatica* parmi les 15 identifiées dans l'antigène standard. Finalement, après une inoculation expérimentale chez des lapins, ils constatent que la fraction antigénique f2 apparaît très tôt, (dès la deuxième semaine après l'infestation) et persiste jusqu'à la quinzième semaine dans l'organisme de ce trématode.

Tailliez et Korah (1970a) purifient et identifient l'antigène f2 par différentes méthodes physico-chimiques et immunologiques: cette protéine spécifique de *Fasciola hepatica*, n'est détectée par immunoprécipitation en gel d'agarose dans aucun des helminthes susceptibles d'infester l'homme, à l'exception de *F. gigantica* (Tailliez & Korah, 1970b). Par immunofluorescence indirecte, ces auteurs localisent la protéine dans le tissu subcuticulaire de la grande douve grâce à un sérum de lapin anti-antigène spécifique.

Application à la fasciolose bovine

Sur la base de ces études, Levieux *et al.* (1992a, b) développent une méthode sérologique quantitative pour détecter les anticorps anti-protéine f2, témoins spécifiques de l'infestation des bovins par *Fasciola hepatica*.

La méthode choisie consiste à mesurer le taux d'anticorps par une hémagglutination passive sur des globules rouges de mouton, qui est une méthode manuelle quantitative. Ultérieurement, l'Institut Pourquier met au point une méthode ELISA de type « double sandwich » indirect que nous décrivons brièvement, mais conserve l'hémagglutination passive comme méthode de référence. Pour chaque puit de la plaque ELISA, l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'antiglobuline liée à l'enzyme qui, elle-même, est proportionnelle à la quantité d'anticorps présents dans le sérum à tester. La densité optique (DO) de la coloration est mesurée par un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 450 nm. Elle est comparée à la DO d'un sérum de référence négatif (sans anticorps) et de deux sérums de référence positifs P (titrant respectivement 150 et 600 unités hémagglutinantes) (Levieux *et al.*, 1992 a,b).

Pour un échantillon E de sérum à tester, le rapport E/P indique son pourcentage d'anticorps, exprimé par le rapport: DO corrigée de E/DO corrigée de P_{150 UHAP} x 100.

Pourquier *et al.* (1995) publient les premiers résultats obtenus par cette méthode sur des sérums de bovins atteints de fasciolose clinique, diagnostiquée par coproscopie. Ils recommandent alors d'appliquer comme seuil de positivité la DO du sérum positif de référence (100%). Le taux d'anticorps spécifiques de ce sérum a été étalonné par la méthode d'hémagglutination passive de Levieux *et al.* (1992 a, b) et équivaut à 150 unités hémagglutinantes (UHA). Pour doser les anticorps dans le sérum san-

guin d'un échantillon E en comparaison d'un sérum positif P de référence, ces auteurs proposent l'interprétation qualitative suivante:

- DO corrigée du sérum E > P_{600 UHAP}: infestation forte,
- DO corrigée du sérum E > P_{150 UHAP}: infestation moyenne ou forte,
- DO corrigée du sérum E < P_{150 UHAP}: infestation faible (prévalence < 20%) ou nulle.

A partir de 1998, le fabricant diminue le seuil de positivité de sa méthode d'abord à E/P_{150 UHA} ≥ 50 %, puis en 2002 à E/P_{150 UHA} ≥ 30 % et le sérum P_{600 UHA} est supprimé.

En 2002, Reichel publie une nouvelle validation de la méthode ELISA à partir de sérums de bovins et d'ovins infestés expérimentalement ou naturellement. Il recommande d'abaisser le seuil de positivité chez les ovins et chez les bovins selon des méthodes statistiques paramétriques et non paramétriques. En acceptant de légères baisses de sensibilité et de spécificité de la méthode, Molloy *et al.* (2005) montrent que le seuil de positivité de 30% est acceptable. Cependant, en appliquant ce même seuil, Rapsch *et al.* (2006) observent que le test est moins sensible et moins spécifique (**tableau 6**).

Auteur	Effectif de bovin	Sensibilité	Spécificité	Seuil de positivité
Reichel (2002)	296	100 %	100 %	54,3 %
Molloy <i>et al.</i> (2002)	167	98,2 % (94,4 - 99,5 %)	98,3 % (94,6 - 99,6 %)	30 %
Rapsch <i>et al.</i> (2006)	960	91,7 % (87,2 - 95,2 %)	93,7 % (91,7 - 95,2 %)	30 %

Tableau 6 : Sensibilité et spécificité des tests ELISA utilisant l'antigène Pourquier, calculées par rapport à des méthodes de référence (cf. références bibliographiques).

Meissonnier *et al.* (2007) ont appliqué le même seuil de 30% pour l'interprétation de résultats obtenus à partir des sérums individuels (SI) de 1 040 génisses et vaches allaitantes, élevées dans le département de la Vendée, et de 80 sérums de mélange (SM), chacun d'eux résultant du mélange de 13 fractions aliquotes de sérums individuels (SI) (**figure 3**). Ils ont vérifié l'intérêt d'une expression semi-quantitative des résultats sérologiques tant sur les sérums individuels que les sérums de mélange.

Les résultats des analyses réalisées sur les sérums de mélange (SM) ont été validés par rapport à ceux obtenus sur les sérums individuels correspondants: il existe une corrélation significative entre la valeur des SM et la fréquence de bovins séropositifs dans ces échantillons (R = 0,76 pour les génisses de 2 ans, R = 0,86 pour les vaches adultes) (Espinasse, 2006). En effet, la méthode ELISA semi-automatisée offre une précision et une reproductibilité suffisantes pour une telle interprétation. Les moyennes E/P des SM négatifs sont de 5,8 et 7,9 % chez les génisses (n = 40) et les vaches allaitantes (n = 40), tandis que les moyennes E/P des SM positifs sont de 179,5 et 178,4 %.

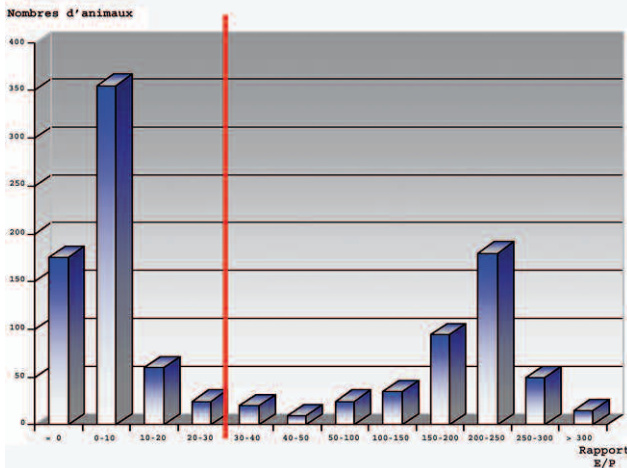


Figure 3 : Distribution bimodale des réactions sérologiques individuelles de bovins adultes dans des troupeaux de race allaitante en Vendée (n = 1 040) (Espinasse 2006).

La production individuelle d'anticorps spécifiques (de type IgG1), induite par l'antigène f2 est quasi-indépendante de l'intensité de l'infestation parasitaire (nombre de larves migrantes ou de douves adultes par bovin). Chaque sérum de bovin infesté exprime essentiellement trois types de réaction immunitaire (Levieux *et al.* 1992 ; Reichel, 2002) :

- les valeurs E/P élevées correspondent à des taux d'anticorps atteints à partir de 6 semaines après l'infestation (E/P > 90 %) et qui se stabilisent en plateau jusqu'à 20 semaines,
- les valeurs E/P sont très basses lorsque les taux d'anticorps sont inférieurs au seuil de positivité et proches de la valeur du sérum négatif de référence (0 % < E/P < 30 %),
- les valeurs E/P intermédiaires expriment en début d'hiver une synthèse croissante d'anticorps, 2 à 6 semaines après l'infestation (30 % < E/P < 90 %).

Le même seuil de positivité (E/P \geq 30%) a été utilisé pour interpréter les résultats obtenus à raison d'un sérum de mélange par troupeau, au cours de l'enquête sérologique réalisée en collaboration avec 131 cabinets vétérinaires et 20 laboratoires d'analyses départementaux pendant l'hiver 2004-05 (Espinasse 2006 ; Meissonnier & Boutet, 2007). La séroprévalence de l'infestation par *F. hepatica* est très variable parmi les troupeaux d'une même clientèle et d'une clientèle à une autre, au sein d'un même département. Ceci résulte de la fréquence et de la répartition des gîtes de limnées infestées dans les prairies ou sur les parcours, mais aussi des programmes anthelminthiques pluri-annuels.

Dans les grandes exploitations de bovins, la séroprévalence de l'infestation, chez les génisses de renouvellement ou les vaches laitières ou allaitantes, varie en fonction des lots de pré car leurs risques d'infestation sont directement liés à la présence de parcelles humides et de cours d'eau infestées par des limnées (*Galba truncatula*) (Blondel 2002 ; Salaun 2005). En conséquence, dans ces grands troupeaux, lorsque la prévalence de l'in-

festation par *F. hepatica* est présumée faible, les analyses de sérums de mélange doivent être réalisées dans chaque groupe de bovins et non de manière randomisée sur la totalité du troupeau comme dans d'autres enquêtes sérologiques.

Diagnostic immunologique à partir du lait

Les méthodes sérologiques ont été également utilisées en France par Boulard *et al.* (1985), puis par Pourquoiier *et al.* (1995) à partir des laits individuels et des laits de tank, selon des techniques d'analyses et d'interprétation très comparables à celles indiquées précédemment pour les sérums sanguins. Boulard *et al.* (1985) soulignent le progrès de cette démarche dans les élevages laitiers par rapport à l'inspection des foies en abattoirs et au diagnostic coproscopique, bien que la sensibilité des tests réalisés sur le lactosérum soit un peu inférieure à celle des tests sur le sérum (Boulard & Régnault, 1989 ; Pourquoiier *et al.* 1995). Cette démarche analytique a été rapidement appliquée en contrôles de routine par les laboratoires interprofessionnels laitiers, pour dépister les troupeaux laitiers infestés par la grande douve, et pour informer les éleveurs de la présence de cette infestation dans leur troupeau.

Il convient cependant d'être vigilant sur l'interprétation des résultats pour deux raisons essentielles. D'une part, la taille moyenne des troupeaux laitiers a beaucoup augmenté au cours des dernières années (notamment par les créations de GAEC) et la répartition des groupes de bovins (vaches génisses, bovins à l'engrais) dans les exploitations les soumettent à des risques parasitaires différents. D'autre part, la prévalence de la fasciolose régresse dans les régions laitières.

Reichel *et al.* (2005) attirent l'attention sur le manque de sensibilité des analyses effectuées sur les laits de tank, lorsque la séroprévalence de la fasciolose est faible chez les vaches laitières. Cette situation est également constatée par Salaun (2005) dans le département de la Mayenne : la recherche d'anticorps anti-f2 réalisée sur des laits de tank est très souvent négative, malgré des situations enzootiques de fasciolose dans les troupeaux laitiers. Le mélange et la dilution des laits individuels diminuent la valeur prédictive positive des analyses immunologiques. Le résultat négatif de l'analyse d'un lait de tank ne doit pas être interprété dans l'absolu, mais en fonction des résultats antérieurs dans le troupeau. En cas de doute, deux démarches diagnostiques sont possibles : soit l'analyse d'un ou plusieurs sérums sanguins de mélange par lot de vaches laitières randomisées, soit celle d'un ou plusieurs lactosérums de mélange issus des mêmes vaches.

Discussion : comparaison des différentes méthodes de diagnostic

Il est important de connaître les forces et les faiblesses de chaque méthode de diagnostic utilisées sur le terrain (Thrusfield, 1986). Concernant la détection de *F. hepatica* par les quatre méthodes précédentes (tableau 7), les principales erreurs ou biais possibles (faux-positifs et faux-négatifs) concernent surtout les résultats sérologiques individuels. Ceux obtenus à partir des sérums de mélange pondèrent les écarts individuels et

expriment la réaction sérologique moyenne de l'échantillon de bovins soumis au prélèvement de sang ou de lait, à condition que l'échantillon soit homogène et représentatif du troupeau ou du sous-troupeau (selon la conduite d'élevage).

Il n'existe pas de méthode de référence (*gold standard* des anglo-saxons) qui permette d'estimer la prévalence réelle de cette affection. Des auteurs ont comparé les résultats de différentes méthodes de détection (Ibarra *et al.* 1998; Gimard 2001; Blondel, 2002; Rapsch *et al.* 2006, Salem *et al.* 2007). Rapsh *et al.* (2006) ont intégré une démarche statistique bayésienne dans l'analyse statistique de leurs données : elle consiste à confronter, grâce à un logiciel informatique, des résultats issus d'autres méthodes de diagnostic, indépendantes de celle évaluée.

Les bilans des inspections des foies à l'abattoir donnent des informations imparfaites, mais restent très utiles à l'éleveur et à son vétérinaire sanitaire qui n'y accèdent cependant que dans quelques départements. Le diagnostic coproscopique individuel doit être amélioré pour atteindre une sensibilité acceptable. Il doit être considéré comme un outil complémentaire, notamment dans les situations pathologiques critiques.

Les études comparées des deux tests ELISA Boulard et Pourquier ont été publiées d'abord par Reynal *et al.* (1992), puis par Gimard (2001), Blondel (2002) et Salem *et al.* (2007). Elles soulignent les difficultés d'interprétation qualitative des deux tests pour des raisons différentes, à chaque époque. Dans les années 1990, lorsque la prévalence de la fasciolose était élevée dans de nombreuses régions d'élevage, les deux tests permet-

Méthodes de détection	Résultats positifs		Résultats négatifs	
	Vrai	Faux	Vrai	Faux
Inspection des foies à l'abattoir.	Présence détectée de grandes douves vivantes (<i>F. hepatica</i>) dans les canaux biliaires avec ou sans cholangite	Confusion avec des petites douves vivantes (<i>D. lanceolatum</i>) dans les canaux biliaires avec ou sans cholangite	Absence de grandes douves vivantes ou mortes et absence de cholangite due à <i>F. hepatica</i>	Présence non détectée de douves vivantes. Présence de douves immatures (< 10 sem. pi), souvent invisibles macroscopiquement.
Coproscopie (après sédimentation ou flottaison).	Présence d'œufs de <i>F. hepatica</i>	Absence d'œufs de <i>F. hepatica</i> mais confusion avec ceux de <i>P. daubneyi</i> (erreur possible en cabinet vétérinaire)	Absence d'œufs de <i>F. hepatica</i> sur plusieurs prélèvements fécaux sur un même animal, sur plusieurs bovins du même groupe, avec une méthode très sensible	Absence d'œufs de <i>F. hepatica</i> sur : - un seul prélèvement fécal, - un prélèvement fécal < 30 g - lecture réduite sur la lame de McMaster, - avec liquide de flottaison à faible densité (< 1,40), - seuil de sensibilité > 10 ou 15 opg. Infestation trop récente (pendant 10-12 sem. pi).
Immunologie dans le sérum sanguin. (Méthode ELISA Boulard et/ou Pourquier)	<ul style="list-style-type: none"> • Réaction spécifique \geq seuil validé de positivité. • Réaction immunitaire active et spécifique. • Réaction immunitaire active du veau de moins de 6 mois infesté par voie transplacentaire. 	<ul style="list-style-type: none"> • Réaction < seuil de positivité trop faible. • Réaction immunitaire active non spécifique (réactions croisées due à d'autres trématodes). • Réaction immunitaire active : - après traitement adulticide (2 à 6 mois), - après la mort naturelle des grandes douves (2 à 6 mois). Réaction immunitaire passive (anticorps d'origine colostrale) : uniquement chez le veau < 6 mois. 	<ul style="list-style-type: none"> • Réaction < seuil validé de positivité • Absence de réaction active et spécifique 	<ul style="list-style-type: none"> • Réaction < seuil de positivité trop élevé (seuil non validé). • Bovins infestés mais anergiques (immuno-dépression). Délétion du %. Mauvais étalonnage du lecteur de DO
Immunologie dans le lait. (Méthode ELISA Boulard et/ou Pourquier)	Réaction \geq seuil validé de positivité	<ul style="list-style-type: none"> Réaction < seuil de positivité trop élevé. Réaction non spécifique - réactions croisées dues à d'autres trématodes - lait « mammiteux » ou colostrums (riches en IgG) 	<ul style="list-style-type: none"> • Réaction < seuil validé de positivité. • Absence de réaction active et spécifique. 	<ul style="list-style-type: none"> • Absence de réaction par dilution des Ac (faible prévalence/lait de tank). • Mauvais étalonnage du lecteur de DO

Tableau 7 : Principales interprétations possibles dans l'analyse des résultats en fonction des méthodes de détection directe ou indirecte de *F. hepatica* chez les bovins. (Semaines pi = semaines après l'infestation ; opg = nombre d'œufs par gramme de fèces ; DO = densité optique).

taient d'identifier efficacement les sujets et les cheptels bovins atteints de fasciolose clinique, surtout en cas de défaillance de la coproscopie. Aujourd'hui, la fasciolose étant devenue essentiellement subclinique, la prévalence de la fasciolose a diminué dans les troupeaux de plusieurs départements, mais aussi de plusieurs clients au sein d'une même clientèle vétérinaire ou d'un même groupement de producteurs.

Concernant le test ELISA Boulard, son faible seuil de positivité ($\geq 15\%$) et son manque de spécificité, liés à la diversité des antigènes ES, se sont traduits dans les enquêtes sérologiques par une faible discrimination entre les résultats individuels négatifs et positifs (Chauvin, 1997; Blondel, 2002; Salem *et al.* 2007) ou des résultats trop systématiquement positifs. Par ce test, Gimard (2001) constate la positivité de 40 sérums des bovins dont les foies sont apparemment sains à l'abattoir, alors que 34 d'entre eux sont négatifs avec le test Pourquier (E/P moyen de 0,7%, valeur très inférieure au seuil de positivité).

Les études récentes de Reichel (2002, 2005), puis de Molloy *et al.* (2005) ont montré que, grâce à la haute spécificité de l'antigène f2, le seuil de positivité du test Pourquier pouvait être diminué (à E/P $\geq 30\%$), ce qui lui confère une meilleure sensibilité. En effet, il ressort de l'analyse rétroactive des résultats sérologiques qualitatifs, obtenus par ce test dans différentes enquêtes sérologiques, que la fréquence de bovins infestés était sous-estimée lorsqu'elle était fondée sur des résultats des analyses des sérums individuels ou de mélange (Pourquier *et al.* 1995; Dulau 1998; Gimard 2001; Blondel 2002). Mais comme les troupeaux fortement infestés étaient facilement détectés, les vétérinaires pouvaient entreprendre leurs démarches thérapeutiques et prophylactiques. Inversement, dans les troupeaux où la prévalence de fasciolose était effective (20 à 30%) mais non détectée par un seuil élevé et où les résultats des copro-

scopies étaient négatifs, l'obtention de résultats sérologiques négatifs ne motivait ni les vétérinaires, ni les éleveurs à traiter spécifiquement les bovins contre *Fasciola hepatica*.

Avec la méthode ELISA Pourquier, l'abaissement récent du seuil de positivité à 30% du sérum positif de référence (au lieu de 100% et 50% recommandés dans le passé), offre une meilleure cohérence des résultats avec ceux de la dissection des foies en abattoir et des techniques coproscopiques les plus sensibles, qu'ils aient été obtenus sur les sérums individuels ou sur les sérums de mélange (Rapsch *et al.* 2006; Salem *et al.* 2007).

CONCLUSIONS

Cette revue des principales méthodes met en évidence les nombreux écueils auxquels le vétérinaire est confronté dans le dépistage de la fasciolose. Dans les zones à risque, il peut maintenant réaliser un diagnostic sérologique précis dans chaque catégorie de bovins troupeaux de races allaitantes et laitières: génisses de 1 à 2 ans, vaches tarées, vaches gestantes ou en lactation. Les caractéristiques hydrobiologiques de chaque circuit de pâturage et la climatologie annuelle doivent être intégrées par le vétérinaire dans le choix des moyens de diagnostic. En début de période de stabulation hivernale, le dépistage réglementaire ou non de diverses maladies infectieuses (brucellose, rhinotrachéite infectieuse) lui donne l'opportunité de demander aux laboratoires d'analyses de rechercher parallèlement les anticorps anti-*F. hepatica*: une analyse ELISA de sérum ou de lait de mélange par catégorie de bovins est maintenant fiable et économique. Les autres méthodes évoquées dans cette communication sont des compléments insuffisants, mais utiles pour objectiver l'importance réelle de cette parasitose.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient chaleureusement Michel Boutet, François Courouble, Alain Chauvin, Didier Levieux, Lucien Martain, Jean-Noël Péculier et Jean-Michel Quillet pour leurs conseils et leur précieuse collaboration.

BIBLIOGRAPHIE

- Alzieu, J.-P. & Courouble, F. 2004. La hiérarchisation des trématodose des bovins: fasciolose, paramphistomose, dicrocoeliose. In *Comptes Rendus des journées nationales des GTV*, Tours, 26-28 mai, pp 611-618, Ph. Camuset, éditeur.
- Anderson, N., Luong, T.T., Vo, N.G., Bui, K.L., Smoker, P.M., Spihill, T.W. 1999. The sensitivity and specificity of two methods for detecting *Fasciola* infections in cattle. *Vet Parasitol.* 83: 15-24.
- Bichet H., Jacquet F., Ducos de Lahitte J. 1998. Estimation du taux de prévalence de la grande et de la petite douve en Midi-Pyrénées. *Point Vét.* 29 (194) : 813-819.
- Biguet, J., Capron, A., Tran Van Ky, P. 1962. Les antigènes de *Fasciola hepatica*: étude électrophorétique et immuno-électrophorétique. Identification des fractions et comparaison avec les antigènes correspondant à sept autres helminthes. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 37: 221-231.
- Blondel, S. 2002. *Epidémiologie de la fasciolose en troupeaux bovins allaitants en Vendée*. Thèse méd. vét. Nantes, n° 130, 92 p.
- Bossaert, K., Farnir, F., Leclipteux Th., Protz M. Lonneux J.-F., Losson B. 2000. Humoral immune response in calves to single-dose, trickle and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol.* 87: 103-123.
- Bosquet, G., Alzieu, J.-P., Chauvin, A., Camuset, Ph., Dorchie, Ph., Heskia, B. 2007. L'Observatoire de la grande douve: évaluation des mesures à mettre en place dans les élevages pour maîtriser la fasciolose et premiers résultats. *Bull Acad Vét de France* 160: 101-106.
- Boulard, C., Bouvry, M, Argenté, G. 1985. Comparaison de la détection des foyers de fasciolose par test ELISA sur lactosérum et sérum et par coproscopie. *Ann Rech Vét.* 16: 363-368.
- Boulard, C., Régnauld, A. 1989. Immunodiagnostic de la fasciolose bovine par la technique ELISA. *Bulletin des GTV*, 59-68.
- Boulard, C., Carreras, F., Van Gool, F. 1995. Evaluation of nitroxylnil and closantel activity using ELISA and egg counts against *Fasciola hepatica* in experimentally and naturally infected cattle. *Vet Res.* 26: 249-255.
- Braun, U., Wolfensberger, R., Hertzberg, H. 1995. Diagnosis of liver flukes in cows – a comparison of the findings in the liver, in the feces and in the bile. *Schweitz Arch Tierheilk.* 137: 438-444.
- Casartelli, A. & Bonfanti, M. 2005. Les attentes des éleveurs italiens en matière de transport, de qualité génétique, sanitaire et alimentaire des broutards exportés. In *Comptes Rendus des Journées nationales des GTV*, Nantes, 25-27 mai, pp 835-843, Ph. Camuset, éditeur.
- Charlier, J., De Meulemesteer, L., Claerebout, E., Williams, D., Vercruyse, J. 2007. Towards a quantitative interpretation of the existing coprological and serological techniques for the diagnosis of fasciolosis in cattle. In *Proceedings of the 21st International conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*, Gand, 19-23 août, 135, E. Claerebout & J. Vercruyse, éditeurs.
- Chauvin, A., Bouvet, G., Boulard, C. 1995. Humoral and cellular immune responses to *Fasciola hepatica* experimental primary and secondary infection in sheep. *Intern J Parasitol.* 25: 1227-1241.
- Chauvin, A. & Mage, C. 1998. Conduite à tenir devant une suspicion de fasciolose en élevage bovin. *Point Vét.* 29 (291) : 329-334.
- Chauvin, A., Moreau, E., Boulard, C. 1997. Diagnostic de la fasciolose bovine par sérologie de mélange. Interprétation dans les conditions de terrain. *Vet Res.* 28: 37-43.
- Conceição, M.A.P., Duraó, R.M., Costa, I.H., Da Costa, J.-M. 2002. Evaluation of a simple sedimentation method (modified McMaster) for diagnosis of bovine fasciolosis. *Vet Parasitol.* 105: 337-343.
- Courouble, F. 2003. Résultats comparés d'une méthode de coproscopie utilisant le sulfate de zinc comme liquide de flottaison et facile à mettre en œuvre en cabinet vétérinaire et la méthode de référence utilisant l'iodo-mercure de potassium. In *Comptes Rendus des journées nationales des GTV*, Nantes, 14-16 mai, p 737, Ph. Camuset, éditeur.
- Courouble, F. & Meissonnier, E. 2007. Choice of sera in large Charolais cattle herds for the serological diagnosis of liver fluke – Approach per pasture group. In *Proceedings of the 21st International conference of World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*, Gand, 19-23 août, p 423 E. Claerebout & J. Vercruyse, éditeurs.
- Courouble, F. & Meissonnier, E. 2004. Diagnostic et épidémiologie de la fasciolose bovine dans des troupeaux charolais en Bourgogne. In *Comptes Rendus de la Journée Bovine Nantaise*, Nantes, 7 octobre, p 121, H. Seegers, éditeur.
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Veneziano, V., Capelli, G., Scala, A. 2004. The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique on estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Vet Parasitol.* 123: 121-131.
- Dorchie, Ph., Ducos de Lahitte J., Pangui, L.J., Alzieu, J.-P. 1988. Recherche de *Fasciola hepatica*, *Dicrocoelium lanceolatum*, *Linguatula dentriculata*, dans les foies de bovins saisis à l'abattage de Pamiers. *Rev Méd Vét.* 139: 307-309.
- Ducommun, D., Pfister, K. 1991. Prevalence and distribution of *Dicrocoelium dendriticum* and *Fasciola hepatica* infections in cattle in Switzerland. *Parasitol. Res.* 77: 364-366.
- Dulau, E. 1998. *Diagnostic de la fasciolose bovine: intérêt des méthodes immunologiques. Applications en élevage limousin*. Thèse méd. vét. Alfort n° 92, 48 p.
- Duwel, D. & Reisenleiter, R. 1990. *Fasciola hepatica*: coprological diagnosis in comparison to the worm burden in sheep and cattle. *Angew Parasitol.* 31: 211-217.
- Espinasse Ch. 2006. *Diagnostic sérologique de la fasciolose bovine: intérêt de la méthode ELISA Pourquier en troupeaux allaitants*. Thèse méd. vét. Alfort, 138 p.
- Gimard, G. 2001. *Fasciolose bovine: enquête épidémiologique en abattoir et évaluation de la sensibilité des tests sérologiques*. Thèse méd. vét. Nantes, n° 114, 96 p.
- Happich, F.A. & Boray, J.-C. 1969. Quantitative diagnosis of chronic fasciolosis. 1-Comparative studies on quantitative faecal examinations for chronic *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Aust Vet J.* 45 (7) : 326-328. 2- The estimation of daily total egg production of *Fasciola hepatica* and the number of adult flukes in sheep by faecal egg counts. *Aust Vet J.* 45 (7) : 329-31.
- Ibarra, F., Montenegro, N., Vera, Y., Boulard, C., Quiroz, H., Flores, J., Ochoa, P. 1998. Comparison of three ELISA tests for seroepidemiology of bovine fasciolosis. *Vet Parasitol.* 77: 229-236.
- Lafay, E. & Mage, C. 1976. Valeur de la coproscopie parasitaire dans le dépistage de la fasciolose bovine. In *Comptes Rendus du 9^{ème} Congrès sur les Maladies du bétail*, Paris, 6-9 sept., pp 110-111. E. Meissonnier, éditeur.
- Leeflang M.M.G., Bossuyt P.M.M. 2005. Test accuracy is likely to vary depending on the population it is used in. *Vet. Parasitol.* 134: 189.
- Le Net J.-L., Courouble F., Besognet B. 2005. Lésions hépatiques induites par *Dicrocoelium dendriticum* dans l'espèce bovine. In *Comptes Rendus des journées nationales des GTV*, Nantes, 25-27 mai 2005, p 908, Ph. Camuset, éditeur.
- Levieux, D., Levieux, A., Venien, A. 1992a. An improved passive hemagglutination test for the serological diagnosis of bovine fasciolosis using the specific antigen f2. *Vet Parasitol.* 42: 53-66.

- Levieux, D., Levieux, A., Mage, C., Garel, J.-P. 1992b. Immunological detection of chemotherapeutic success in bovine fasciolosis using the specific antigen f2. *Vet Parasitol.* 45 : 81-88.
- Malone, J.-B. & Craig, T.M. 1990. Cattle liver flukes: risk assessment and control. *Comp Cont Educ Pract.* 12 : 747-754.
- McKenna, S.L.B. & Dohoo, I.R. 2006. Using and interpreting diagnostic tests. *Vet Clin Food Anim.* 22 : 195-205.
- Meissonnier, E. Boutet M. 2007a. Seroprevalence of bovine fasciolosis in herds of beef breeds in France. In *Proceedings of the 21st International conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Gand*, 19-23 août, p 424, E. Claerebout & J. Vercruyse, editors.
- Meissonnier, E., Quillet, J.-M., Ogier de Baulny, M. 2007b. The value of pooled sera for the estimation of seroprevalence of liver fluke in a herd of beef cattle. In *Proceedings of the 21st International conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Gand*, 19-23 août, p 424, E. Claerebout & J. Vercruyse, editors.
- Mekroud, A., Titi, A., Benakhala, A., Rondelaud, D. 2006. The proportion of liver excised in Algerian abattoirs is not a good indicator of *Fasciola hepatica* infections in local cattle breeds. *J Helminthol.* 80 : 319-321.
- Molloy, J.-B., Anderson, G.R., Fletcher, T.I., Landmann, J., Knight, B.C. 2005. Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* in cattle, sheep and buffaloes in Australia. *Vet Parasitol.* 130 : 207-212.
- Pourquier, Ph., Caquineau, L., Galaup, M., Le Moal, Y., Martain, L., Salingardes, F., Turmel, R. 1995. Evaluation de l'infestation naturelle de cheptels bovins par *Fasciola hepatica* d'après le titrage d'anticorps du sang ou du lait avec un réactif ELISA utilisant l'antigène spécifique F2. *Bull Soc Vét Prat.* 79 : 285-307.
- Rapsch, C., Schweitzer, G., Grimm, F., Kohler, L., Bauer, C., Deplazes, P., Braun, U., Togerson, P.R. 2006. Estimating the true prevalence of *Fasciola hepatica* in cattle slaughtered in Switzerland in the absence of an absolute diagnostic test. *Intern J. Parasitol.* 36 : 1153-1158.
- Raynaud, J.-P., Lafay, E., Leimbacher, F., Brunault, G., Nicolas, J.A. 1974. Détection et numération des œufs de *Fasciola* chez les ruminants. *Rev Méd Vét.* 125 : 847-878.
- Reichel, M.P. 2002. Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in sheep and cattle. *Vet Parasitol.* 107 : 65-72.
- Reichel, M.P., Vanhoff, K., Baxter, B. 2005. Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay in milk for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in cattle. *Vet. Parasitol.* 129 : 61-66.
- Reynal, Ph., Chasteloux, F., Mage, C. 1992. Diagnostic de *Fasciola hepatica* chez les bovins limousins selon plusieurs techniques sérologiques. *Bulletin des GTV*, 419 : 75-84.
- Salaun, K. 2004. *La fasciolose bovine en Mayenne : évaluation du risque d'infestation en troupeaux laitiers*. Thèse méd. vét., Nantes, n° 113, 114 p.
- Salem A., Jacquet P., Chauvin A., Dorchies P. 2007. Estimating the prevalence of *Fasciola hepatica* in cattle: which method in the best diagnostic test? Estimating the prevalence of *Fasciola hepatica* in cattle: which method is the best diagnostic test? In *Proceedings of the 21st International conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Gand*, 19-23 août, p 136, E. Claerebout & J. Vercruyse, editeurs.
- Salimi-Besjestani, M.R., McGarry, J.W., Felstead, S., Ortiz, P., Akca, A., Williams, D.J.L. 2005. Development of an antibody-detection ELISA for *Fasciola hepatica* and its evaluation against a commercially available test. *Res Vet Sci.* 78 : 177-181.
- Schweizer, G., Braun, U., Deplazes, P., Togerson, P.R. 2005. Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *Vet Rec.* 157 : 188-193.
- Tailliez, R. & Korah, S. 1970a. Les antigènes de *Fasciola hepatica*. I. Isolement et caractérisation d'un antigène spécifique du genre. *Ann Inst Pasteur* 118 : 61-78.
- Tailliez, R. & Korah, S. 1970b. Les antigènes de *Fasciola hepatica*. II. Etude immunologique et localisation in situ d'un antigène spécifique du genre. *Ann Inst Pasteur* 118 : 330-339.
- Thienpont, D., Rochette, F., Vanparijs, O. 1979. Le diagnostic des verminoses par examen coprologique. 188 p, Janssen Research Foundation, Beerse (Belgique).
- Thrusfield, M. 1986. Serological epidemiology. In *Veterinary epidemiology*, pp 179-184. Butterworths, Londres.
- Vera Montenegro, Y., Ibarra Velarde, F., Quiroz Romero, H., Hernandez Campos, A., Castillo, R. 2003. Field trial on the efficacy of an experimental fasciolicide compared with some commercial compounds in naturally infected cattle. *Parasitol Res.* 91 : 1-4.