

Université
de Liège



ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE
UNIVERSITE DE LIEGE
FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE
DEPARTEMENT DES MALADIES INFECTIEUSES ET PARASITAIRES
SERVICE DE PARASITOLOGIE ET PATHOLOGIE DES MALADIES
PARASITAIRES

Aspects malacologiques du cycle de *Fasciola hepatica* en Belgique et en Equateur

Malacological aspects of the lifecycle of *Fasciola hepatica* in Belgium and Ecuador

Yannick CARON

THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR EN SCIENCES VETERINAIRES
ANNEE ACADEMIQUE 2015 - 2016.

Université
de Liège



**ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE
UNIVERSITE DE LIEGE
FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE
DEPARTEMENT DES MALADIES INFECTIEUSES ET PARASITAIRES
SERVICE DE PARASITOLOGIE ET PATHOLOGIE DES MALADIES
PARASITAIRES**

Aspects malacologiques du cycle de *Fasciola hepatica* en Belgique et en Equateur

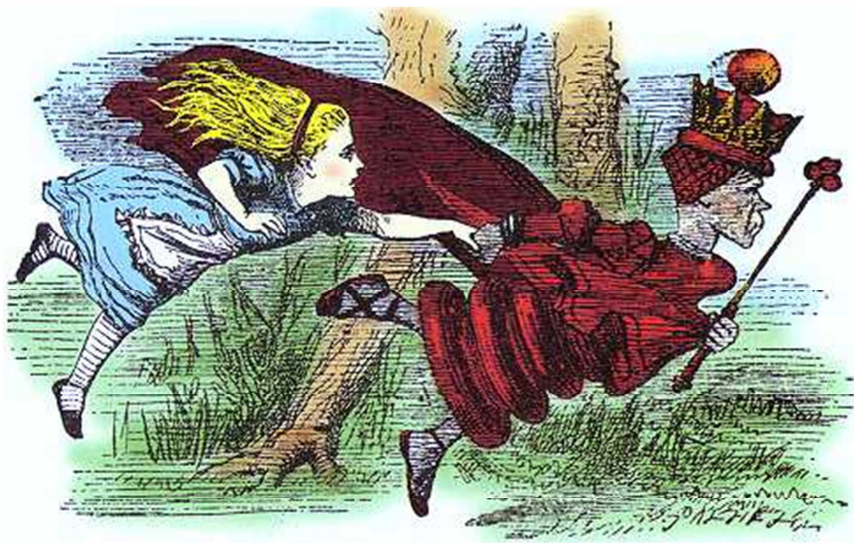
Malacological aspects of the lifecycle of *Fasciola hepatica* in Belgium and Ecuador

Yannick CARON

**THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR EN SCIENCES VETERINAIRES
ANNEE ACADEMIQUE 2015 - 2016**

(...)
*Caminante, son tus huellas el camino
Y nada más ;
Caminante, no hay camino,
Se hace camino al andar.
Al andar se hace camino,
Y al volver la vista atrás
Se ve la senda que nunca
Se ha de volver a pisar.
Caminante, no hay camino,
Sino estelas en la mar.*
(...)

Antonio Machado (1875 – 1939)



L'Hypothèse de la Reine Rouge (van Valen, 1973)
« In this place, it takes all the running you can do, to keep in the same place »
Lewis Carroll « Throw the Looking Glass »

A Richard,

REMERCIEMENTS

Il est temps de mettre un terme à cette grande aventure que constitue l'élaboration d'une thèse de doctorat. Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont accompagné le long de ce chemin et sans lesquelles ce manuscrit n'aurait jamais vu le jour.

Merci tout d'abord au Professeur Bertrand Losson, promoteur de ce projet, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Ses encouragements et son soutien bienveillant m'ont permis d'avancer et de persévérer année après année.

Un tout grand merci au Professeur Daniel Rondelaud de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Limoges (France). Sa rencontre au tout début de ce périple a été souveraine. Sa passion, sa grande rigueur, sa disponibilité, son amitié, sa capacité de travail incroyable ont été, pour moi, des balises solides sur lesquelles m'appuyer.

Merci au Professeur Jean-Pierre Pointier de l'Université de Perpignan pour sa grande disponibilité, ses conseils amicaux et ses relectures et au Professeur Sylvie Urtrez-Boussès de l'Université de Montpellier pour ses conseils avisés et ses relectures attentives.

Merci à tous les membres du service de Parasitologie et aux nombreuses personnes qui y sont passées. Elles ont contribué à la bonne ambiance de ce service « pas comme les autres ». Je pense à Saadia Lasri avec qui ce long projet a commencé. Merci pour ton soleil et ton aide. Merci aussi à Mireille Lekimme pour ses conseils pertinents, sa grande rigueur et son amitié. Je pense bien sûr à Françoise Maréchal et à son aide constante et précieuse. Comme a dit Moïse (que je remercie en passant) « Tu mérites et tu conviens ». Merci aussi à Lionel Hartert. On se rappellera tous les deux les longues campagnes d'échantillonnages. Merci à Laurent Gohy. Merci à Jean-Pierre Duchatel pour sa grande expérience, sa passion et sa sagacité. Merci à Céline Cavadino pour sa bonne humeur et son soutien. Merci à Marie-Laure Doppagne pour son amitié et sa joie de vivre. Merci à Audrey Depas et à Jessica Collard pour leur support. Merci à Chantal Rettigner pour son humour dévastateur, à Catherine Généreux pour ses couinements, à François Smeets pour son humour et ses neurones, à Caroline Portaels qui venait assurément d'une autre planète, à Caroline Vanvinckenroye pour son humour et sa rafraîchissante innocence. Merci aussi à Romain Abos, Elodie Renard, Laetitia Lempereur, Nancy Robert, Etienne Baise, et tous les autres.

Merci à la fondation Huynen pour avoir financé six mois de mission scientifique en Equateur. Ces moments resteront gravés dans ma mémoire pour longtemps. Merci à tous les membres du

Centre International des Zoonoses de Quito (Equateur). En particulier au Professeur Washington Benítez-Ortís pour m’avoir accueilli pendant plusieurs mois et à plusieurs reprises et à Maritza Celi-Eraza pour son support efficace, son humour et son espagnol parfait. Un grand merci à Elizabeth Minda pour son aide et sa joie de vivre, à Paulina Correa López pour ses cours d’espagnol, à Gustavo pour son amitié et ses conseils, à Alon Warburg, à Lenin Ron Garrido, à Angel Mosquera Simbaña pour sa conduite prudente, à Richar Hidalgo-Rodriguez et à Franklin Vaca Moyano. Merci au propriétaire de la ferme « *La Fontana* » Marcelo Rivera pour son aide et sa patience. Merci aussi à Angel Villavicencio. Un grand merci à Maria-Fernanda et à Gustavo pour les sorties (y por la michelada muy fresca). Merci aussi à Freddy Proaño et à Jorge Ron Roman. Un énorme merci à Johana Rosero, Jorge Luis Cáceres, et à Pancho pour leur générosité, leur gentillesse et leur aide.

Merci à tous les étudiants et stagiaires qui m’ont accompagné : Dung Bui Thi, Souad Righi, Fayçal Aymeur, Sita Bennema, et Michel Counotte.

Merci à Marie-France Humblet pour ses conseils touristiques et à Ludovic Martinelle.

Merci au service de Mycologie avec le Professeur Bernard Mignon, Ludivine Cambier, Aline Baldo, Anne Mathy, Marie-Pierre Heinen et Sandy Vermout.

Merci à tous les membres du service d’Histologie. Je pense particulièrement au Professeur Nadine Antoine, à Maryse Mine pour sa trop grande disponibilité, à Vinciane Toppets pour son soutien et sa gentillesse et à Céline Tonus.

Merci à Nathalie Guillaume pour son œil bionique.

Le plus grand des mercis à mes parents, pour leur confiance sans faille et pour avoir compris relativement tôt mon goût pour les études.

Enfin, merci à toi qui te reconnaîtras.

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	1
Préliminaires.....	2
1. L'agent étiologique	4
2. Cycle biologique	5
3. Morphologie.....	8
4. La fasciolose chez les ruminants.....	12
4.1. Pathogénie.....	12
4.2. Diagnostic	15
4.3. Gestion thérapeutique et agronomique	16
4.4. Immunité et essais vaccinaux	21
4.5. Epidémiologie en Belgique et en Europe tempérée.....	22
4.6. Epidémiologie en Equateur et en Amérique du Sud.....	26
5. Les mollusques hôtes intermédiaires.....	29
5.1. Classification.....	32
5.2. Détection de l'infestation chez le mollusque.....	37
5.3. En Belgique et en Europe tempérée.....	46
5.4. En Equateur et en Amérique du Sud.....	60
CHAPITRE 2 : OBJECTIFS ET PLAN DE TRAVAIL.....	66
CHAPITRE 3 : PRÉSENTATION SYSTÉMATIQUE DES ÉTUDES.....	69
Étude 1	70
Étude 2	91
Étude 3	110
Étude 4	133
CHAPITRE 4 : DISCUSSION GÉNÉRALE.....	157
CHAPITRE 5 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	170
CHAPITRE 6 : RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	173
ANNEXES	199
Étude 5	200
Étude 6	211
Étude 7	216
Étude 8	224

AVIS AU LECTEUR

Les chapitres de ce travail se succèdent de la manière suivante :

Le premier chapitre est consacré à l'introduction et situe l'infestation parasitaire dans son contexte actuel. La littérature qui a servi de base scientifique à nos travaux est revue en fonction des objectifs que nous nous sommes fixés. Le cycle du parasite et sa biologie sont rappelés. La fasciolose chez l'hôte définitif est décrite et l'épidémiologie en Europe (Belgique) et en Amérique du Sud (Equateur) est abordée. Une part importante de cette introduction est consacrée à l'hôte intermédiaire. Les problèmes relatifs à la taxinomie de celui-ci sont abordés avant que ne soient exposées les différentes techniques permettant la détection de l'infestation chez les mollusques. Cette dernière partie a fait l'objet d'une publication (**étude 5**) que l'on peut retrouver en annexe. L'accent est ensuite mis sur les différents hôtes intermédiaires rencontrés en Europe (Belgique) et en Amérique du Sud (Equateur) et l'évaluation de leur rôle potentiel lors d'infestations naturelles ou expérimentales.

Le second chapitre expose l'objectif de ce travail et le plan suivi pour son élaboration.

Le troisième chapitre reprend systématiquement nos recherches sous la forme d'articles originaux publiés ou en cours de soumission. Un préambule précède chaque article ; il introduit la première étude et assure ensuite la liaison avec les suivantes.

Le quatrième chapitre est consacré à une discussion générale des principaux résultats obtenus et remis dans le contexte actuel de la littérature.

Le cinquième chapitre expose les conclusions de ce travail et les perspectives.

Le sixième chapitre rassemble les références bibliographiques citées tout au long de ce manuscrit.

Enfin, la dernière partie de ce manuscrit est consacrée aux annexes et reprend toutes les publications sur les hôtes intermédiaires de *Fasciola* spp. liées aux différentes collaborations internationales mises en place au sein du service de Parasitologie et Pathologie des Maladies Parasitaires de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège. Celles-ci ont été exclues de ce travail de doctorat dans la mesure où je n'étais pas le principal initiateur du projet de recherche.

ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomal
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
CAT	Cathepsines
CART	<i>Classification and regression tree analysis</i> ; analyse par arbres de classification et de régression
CERVA	Centre d'Etude et de Recherches Vétérinaires et Agrochimiques
COX-1	<i>Cytochrome oxidase subunit 1</i> ; sous-unité 1 de la cytochrome oxydase
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> ; méthode de dosage Immuno-enzymatique
ES	<i>Excretory/secretory</i> ; excrétoire/sécrétoire
FABP	Fatty acid binding protein ; protéine de liaison aux acides gras
FREP	<i>Fibrinogen related protein</i> ; protéine associée au fibrinogène
γ-GT	γ-glutamyl transférase
GLDH	Glutamate déshydrogénase
GPI	Glucose phosphate isomérase
GQM	Gain quotidien moyen
GIS	<i>Geographic information system</i> ; Système d'information géographique
GST	Glutathion S-transférase
HD	Hôte définitif
HI	Hôte intermédiaire
HRP	<i>Horse radish peroxydase</i> ; peroxydase du raifort
ITS-1	<i>Internal transcribed spacer 1</i> ; espaceur interne transcrit 1
ITS-2	<i>Internal transcribed spacer 2</i> ; espaceur interne transcrit 2
JPE	Jour post exposition
LAMP	<i>Loop-Mediated Isothermal Amplification</i> ; amplification isotherme induite par une boucle
OPG	Œufs par gramme de matière fécale
LAP	Leucine aminopeptidase

PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i> ; motif moléculaire associé à un agent pathogène
pb	Paire de base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ; Réaction de polymérisation en chaîne
PCR-RFLP	<i>Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism</i> ; Réaction de polymérisation en chaîne avec polymorphisme de longueur des fragments amplifiés
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> ; réaction de polymérisation en chaîne quantitative
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> ; espèces réactives de l'oxygène
SDH	Sorbitol déshydrogénase

RÉSUMÉ

La fasciolose est une maladie zoonotique touchant principalement les ruminants et due à deux espèces parasitaires du genre *Fasciola*. Si *Fasciola gigantica* est une espèce tropicale, la distribution géographique de *F. hepatica* est beaucoup plus large. *Fasciola hepatica* est responsable de pertes économiques conséquentes comme par exemple la réduction de la production laitière ou la saisie du foie des ruminants à l'abattoir. Le cycle de vie de ce plathelminthe nécessite un hôte intermédiaire, un mollusque gastéropode de la famille des *Lymnaeidae*. En Europe tempérée, *Galba truncatula* est le principal hôte intermédiaire de *F. hepatica*. Un vaste projet en réseau (MANSCAPE) a montré, en réalisant des prélèvements dans plus de 125 mares, que d'autres mollusques lymnaeidés (appartenant au genre *Radix*) pouvaient intervenir en Belgique dans le cycle du parasite comme hôte intermédiaire accessoire ou alternatif. Des infestations expérimentales de mollusques et de rats ont permis de mettre en évidence plus précisément quelques-unes de ces espèces (*Radix balthica*, *R. labiata*). Le complexe d'espèces « *R. peregra* » semble ainsi contenir plusieurs candidats potentiels. Plusieurs techniques existent pour mettre en évidence le parasite dans le mollusque : des techniques microscopiques et des techniques faisant appel à la biologie moléculaire. Une technique de biologie moléculaire (PCR Multiplex) très sensible (100 pg d'ADN du parasite restent détectables) et spécifique a été mise au point. Cette technique a ensuite été utilisée de manière qualitative et quantitative pour établir dans quelle mesure les espèces pouvant faire office d'hôte intermédiaire alternatif en Belgique étaient, en effet, infestées. C'est ainsi que, dans le cadre du projet PONDSCAPE, il a été montré que *G. truncatula* était infesté à hauteur de 1,31 % (30/2747) et que *R. balthica* pouvait héberger le parasite selon une prévalence de 0,16 % (7/4629). La technique a ensuite été utilisée en Equateur pour apporter de la même façon des éclaircissements sur les espèces impliquées dans le cycle. *Galba schirazensis*, une espèce invasive en Amérique du Sud a été identifiée comme pouvant héberger une partie du cycle de *F. hepatica* puisque 8,15 % (86/1055) des mollusques prélevés contenaient de l'ADN du parasite et 2,46 % (26/1055) des rédies vivantes. Ces études montrent que *Radix balthica* pourrait avoir un impact sur l'épidémiologie de *F. hepatica* en Belgique et que le rôle de *G. schirazensis* en Equateur mérite d'être éclairci. Ceci sera discuté lors de ce travail et notamment en termes d'adaptation et de coévolution.

ABSTRACT

Fasciolosis is a zoonotic disease of ruminants and other herbivorous due to two parasite species of the genus *Fasciola*. If *Fasciola gigantica* is a tropical species, *F. hepatica* has a much wider geographic distribution. *Fasciola hepatica* is responsible for important economic losses such as a marked reduction of milk yield and liver condemnation at the slaughterhouse. The life cycle of this platyhelminth involves an intermediate host, a gastropod mollusc belonging to the *Lymnaeidae* family. In temperate Europe, *Galba truncatula* acts as the main intermediate host of *F. hepatica*. A wide network project called MANSCAPE allowed the implementation of a sampling campaign conducted in more than 125 ponds throughout Belgium which revealed that other lymnaeid snails (belonging to the genus *Radix*) could act as secondary or alternative intermediate hosts. Some experimental infections of snails and rats permitted to study the host-parasite relationships in some of these species (*Radix balthica*, *R. labiata*). Sibling species very similar to «*R. peregra*» seem to contain several potential candidates. Several techniques are available to detect the parasite in the snail: they are based either on microscopy or on molecular biology. A very sensitive (100 pg parasite DNA still detectable) and specific technique based on molecular biology (Multiplex PCR) was developed. This technique was used qualitatively and quantitatively to determine the intermediate host species involved in the life cycle of the liver fluke in Belgium. This study was performed in the frame of the PONDSCAPE project and prevalences of 1.31% (30/2747) and 0.16% (7/4629) were recorded for *G. truncatula* and *R. balthica* respectively. This technique was then used in Ecuador to bring some information on the intermediate host species involved in the life cycle of *F. hepatica*. *Galba schirazensis*, an invasive species in South America, was identified as a lymnaeid that could harbour a part of the life cycle of the parasite as 8.15% (86/1055) of the collected snail contained parasite DNA and 2.46% (26/1055) living larvae. These studies showed that *R. balthica* could have an impact on the epidemiology of *F. hepatica* in Belgium and that the role of *G. schirazensis* in Ecuador needs to be clarified. This will be discussed in this work and specially in term of co-evolution and adaptation way.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

PRÉLIMINAIRES

Parmi les pathologies parasitaires rencontrées fréquemment chez les ruminants domestiques dans le monde, la fasciolose est l'une des plus insidieuses. En effet, son expression clinique peut-être frustrante alors que les pertes économiques induites par le parasite sont souvent considérables. De plus, si l'agent responsable *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 a besoin d'un hôte définitif vertébré pour héberger sa multiplication sexuée, il a aussi besoin d'un hôte intermédiaire invertébré (un mollusque) pour sa multiplication asexuée. Cette dualité est essentielle pour la compréhension de l'épidémiologie du parasite et sa gestion agronomique. De la même façon, l'hôte intermédiaire est fortement inféodé aux conditions climatiques (précipitations, températures) et à son environnement (prairies humides, fossés, mares). Deux contextes épidémiologiques différents (Belgique et Equateur) seront ainsi abordés dans ce travail où la triangulation « hôte – parasite – environnement » sera étudiée.

Fasciola hepatica est un parasite majeur des bovins en Belgique et les dernières études publiées font état d'une séro-prévalence de 40,2 % en 2008 lors d'une étude réalisée via des prélèvements sur des laits de tank (Bennema et al., 2010). Peu de données épidémiologiques existent en Equateur sur la douve du foie mais 12,28 % des foies ont été saisis lors de l'abattage de 1319 bovins à Machachi (Equateur) (Egas-Dávila et al., 2006). L'étude de cette pathologie présente un intérêt supplémentaire puisqu'il s'agit d'une zoonose connue pour être en recrudescence ces dernières années dans plusieurs régions du globe (Mas-Coma et al., 1999). L'homme paie un lourd tribut à cette parasitose en Amérique du sud où un foyer d'hyperendémie a été mis en évidence en Bolivie et où plus de 50 % des habitants d'une communauté avaient des anticorps dirigés contre *F. hepatica* (Parkinson et al., 2007). Les rares cas décrits en Europe se présentent, quant à eux, plutôt sous la forme de cas sporadiques très localisés dans l'espace et dans le temps (Dauchy et al., 2006).

Le caractère subclinique de cette infestation chez les bovins s'accompagne ainsi de pertes économiques substantielles tant par la saisie des foies à l'abattoir que par une réduction des performances de l'animal sous la forme de diminution du gain de poids et de l'efficacité de la conversion alimentaire (Genicot et al., 1991), de baisses quantitatives et qualitatives de la production laitière (Ross, 1970) et de problèmes d'infécondité (Mage, 1989). Des tentatives de

quantification de ces pertes ont été réalisées dernièrement et une réduction moyenne de 9% du gain quotidien moyen (GQM) (Schweizer et al., 2005) ainsi qu'une réduction moyenne de la production laitière de 0,7 kg de lait par vache et par jour ont été mises en évidence (Charlier et al., 2007).

La perspective de changements climatiques amène à évaluer d'éventuelles variations de prévalence et de distribution géographique du parasite. En Europe, une augmentation de la prévalence chez les bovins a été détectée au Royaume-Uni (Charlier et al., 2014b) mais il est difficile de l'associer au réchauffement de la planète. Toutefois, il est clair que les mollusques faisant office d'hôtes intermédiaires de *F. hepatica* sont fortement sous la dépendance des conditions environnementales.

Ce premier maillon mérite une analyse poussée pour plusieurs raisons : son infestation expérimentale est plus « simple » à mettre en œuvre, il permet une amplification parasitaire déterminante puisqu'il est le siège d'une multiplication asexuée de *F. hepatica*, il détermine par sa présence (ou son absence) les zones de transmission du pathogène et enfin, ses capacités adaptatives à son environnement et aux parasites qu'il héberge sont très importantes.

1. L'AGENT ÉTIOLOGIQUE

Fasciola hepatica, encore appelée grande douve du foie, est l'agent étiologique de la distomatose hépatique ou fasciolose en régions tempérées. Ce parasite fait partie de la famille des *Fasciolidae*, classe des *Digenea*. Les digènes appartiennent au phylum des plathelminthes ou vers plats. Les digènes (deux hôtes) sont des endoparasites ayant un cycle de vie complexe et aux stades larvaires nombreux qui nécessitent un ou plusieurs hôte(s) intermédiaire(s) dont l'un au moins est un mollusque. De nombreuses espèces de mammifères peuvent jouer le rôle d'hôtes définitifs ; citons les ruminants domestiques et sauvages, les rongeurs et les lagomorphes. L'homme, quant à lui, est un hôte définitif accidentel. Il s'agit, néanmoins d'une zoonose plus ou moins fréquente en fonction de la localisation géographique et des comportements alimentaires (Schepens et al., 2002). Le genre *Fasciola*, très largement répandu, contient deux espèces. *Fasciola hepatica* est présente dans les régions tempérées mais aussi, en altitude, en régions tropicales. *Fasciola gigantica*, quant à elle, occupe les zones tropicales de basse altitude (Bergeron et Laurent, 1970; Graber et al., 1978).

Fasciola hepatica aurait été observée pour la première fois par Jean de Brie, en 1379, qui mentionne le premier la maladie du « foie pourri » mais l'origine de sa découverte est controversée. Linnaeus (1758) pensait qu'il s'agissait d'une sangsue avalée et modifiée dans l'hôte (Pantelouris, 1965). Les stades larvaires (cercaires, rédies, miracidium) ont été décrits comme des formes indépendantes par Johan Swammerdam (1758) en disséquant la structure interne d'un mollusque (*Paludina vivipara*) (Andrews, 1999; Bossaert, 2000). Ce n'est que plus tard que l'idée vint de les connecter entre eux et d'envisager ainsi la complexité du cycle parasitaire (Steenstrup, 1845). Mais le cycle complet n'a été décrit qu'à la suite de l'identification de l'hôte intermédiaire principal en Europe, le gastéropode *Galba truncatula* O.F. Müller, 1774 (anciennement *Lymnaea truncatula*) indépendamment par Leuckart (Leipzig) et Thomas (Oxford) en 1882. Néanmoins, en dehors du continent européen d'autres *Lymnaeidae* peuvent jouer le rôle d'hôte intermédiaire (Boray, 1969) et en Europe, des données indiquent que d'autres espèces de mollusques (autres que *G. truncatula*) pourraient jouer ce rôle également (Torgerson et Claxton, 1999).

2. CYCLE BIOLOGIQUE

L'hôte définitif héberge le parasite adulte et sa multiplication sexuée, alors que l'hôte intermédiaire héberge les différents stades larvaires de la multiplication asexuée. Le passage de l'un à l'autre se réalise grâce à deux phases libres. Le cycle se compose de cinq phases (Andrews, 1999) (**Figure 1**) bien que d'autres n'en voient que quatre : (1) Passage des œufs de l'hôte définitif vers l'environnement extérieur, (2) éclosion de l'œuf, puis localisation de l'hôte intermédiaire et pénétration du miracidium dans ce dernier, (3) succession des stades larvaires dans le mollusque (sporocyste, rédie) jusqu'au stade cercaire, (4) émergence des cercaires qui, hors de l'hôte, vont s'enkyster sur des végétaux sous forme de métacercaires, (5) ingestion par l'hôte définitif, désenkystement, traversée de la paroi de l'intestin, de la cavité péritonéale, puis migration intra-hépatique jusqu'aux canaux biliaires.

Si les phases *in vivo* sont régulées par des mécanismes immunitaires, les phases libres sont essentiellement sous la dépendance de facteurs environnementaux et notamment climatiques.

La **Figure 1** illustre les cinq phases du cycle :

(1) L'hôte définitif héberge, au niveau des canaux biliaires, les parasites adultes qui produisent, par fécondation croisée, des œufs non embryonnés. Les œufs sont évacués vers le duodénum par le canal cholédoque, puis sont éliminés via les matières fécales. L'œuf subit une incubation en dehors de l'hôte sous l'influence de plusieurs facteurs physico-chimiques (Andrews, 1999). Une température idéale de 23 à 26° C permet à l'embryon de se former en deux à trois semaines (Pêcheur, 1966). Le développement optimal de l'œuf et l'éclosion doivent avoir lieu en dehors des déjections. L'action mécanique de la pluie, le ruissellement et le piétinement des bovins permettront le délitage des bouses et la séparation des œufs (Bossaert, 2000). Les œufs semblent être le stade le plus résistant (Shaka et Nansen, 1979) et sont capables de passer l'hiver et de poursuivre leur développement au printemps suivant (Ross, 1967, 1968; Ross et Todd, 1970; Urquhart et al., 1970).

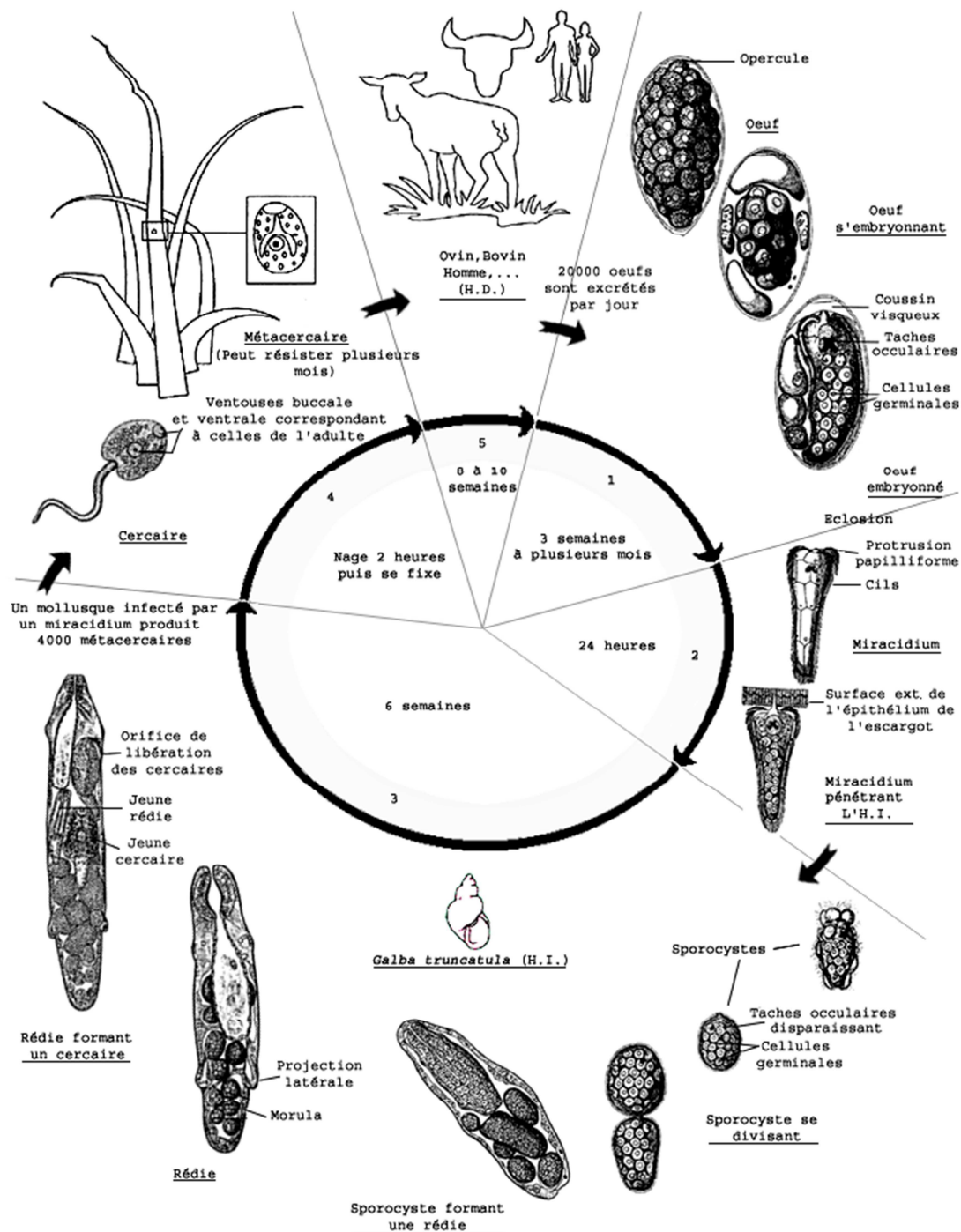


Figure 1 - Cycle biologique de *Fasciola hepatica* (d'après Andrews, 1999, modifié). Les phases 1, 2 et 4 se déroulent dans l'environnement. La phase 5 se déroule dans l'hôte définitif (HD). La phase 3 se déroule dans l'hôte intermédiaire (HI). ext.: extérieur. Les dessins ne sont pas à l'échelle.

(2) Le développement de l'œuf dans le milieu extérieur conduit à la libération d'une larve ciliée, mobile, phototrope positive dénommée miracidium qui dispose d'environ 24 heures (en fait jusqu'à l'épuisement de ses réserves en glycogène) pour trouver un hôte intermédiaire adéquat, un mollusque gastéropode. Cette phase libre est sujette à une mortalité très importante, car sa durée dépend de la température. Au laboratoire, l'éclosion est favorisée par la lumière et une baisse de température (Andrews, 1999).

(3) Un des facteurs les plus favorables à la propagation de *F. hepatica* est sa multiplication asexuée (jusqu'à un facteur multiplicateur de 500) à l'intérieur du mollusque hôte. Cette phase dépend de la disponibilité en nourriture pour les escargots et des facteurs climatiques qui déterminent directement leur survie et leur reproduction. Le miracidium pénètre le mollusque en général au niveau du manteau grâce à des sécrétions enzymatiques. Une fois à l'intérieur du mollusque, le miracidium se transforme en sporocyste dans la région réno-péricardique et migre via les vaisseaux sanguins ou lymphatiques vers la glande digestive située sous le sommet de la coquille. Les cellules germinales du sporocyste se divisent pour former des rédies. Suite à la distension du sporocyste, les rédies sont libérées. Il y a généralement trois générations rédiennes pour *F. hepatica*. Chaque génération comprend deux groupes de rédies (ou cohortes) qui évoluent de manière différente dans le temps (Augot, 1998). Ces rédies sont mobiles et provoquent beaucoup de dégâts dans la glande digestive du mollusque. En cas d'infestation importante, elles peuvent même le tuer. Chaque rédie donnera naissance, par multiplication asexuée, à des cercaires. On compte environ six semaines entre l'entrée du miracidium et l'émergence des cercaires. Les cercaires quittent le gastéropode sous l'effet inducteur d'un choc thermique (Bossaert, 2000).

(4) Dans les régions tempérées d'Europe occidentale, la transmission du parasite par son hôte intermédiaire s'effectue principalement entre les mois de mai et d'octobre (Ollerenshaw, 1959, 1971; Ross, 1977) et l'excrétion des cercaires a lieu lorsque la température moyenne dépasse les 10° C (Luzon-Pena et al., 1994). Elles nagent près de la surface pendant près de deux heures, puis se fixent, s'enkystent et perdent leur queue. Les cercaires, comme la forme adulte du parasite, ont une ventouse buccale et une autre ventrale qui leur permettent de se fixer à un support végétal. Les cercaires constituent donc la deuxième phase libre. Après la perte de leur queue, les cercaires vont s'enkyster : on parle alors de métacercaires. Celles-ci correspondent à la

forme infestante pour l'hôte définitif. Les métacercaires survivent plus ou moins bien dans le milieu extérieur en fonction des conditions de température et d'humidité. Si elles supportent bien le froid et le gel, elles résistent peu à la chaleur et pas du tout à la dessiccation (Bossaert, 2000).

(5) Dès le début du printemps, du fait de la survie hivernale des stades intra-mollusques de *F. hepatica* et des métacercaires de l'année précédente, l'hôte définitif se contamine par ingestion de végétaux hygrophiles sur lesquels les métacercaires se sont fixées. Une heure après leur ingestion, elles se désenkystent dans l'intestin grêle au niveau du canal cholédoque. Les douves immatures traversent alors la paroi de l'intestin et migrent dans la cavité péritonéale. Elles mettront quatre à six jours pour aller de l'intestin au foie via la cavité péritonéale. Les douves immatures transpercent alors la capsule de Glisson et poursuivent leur migration à travers le parenchyme hépatique en se nourrissant d'hépatocytes et de globules rouges. Après huit semaines de migration intra-hépatique, elles rejoignent les canaux biliaires. Les adultes commencent à pondre une à deux semaines plus tard. La période prépatente est donc de huit à dix semaines (Bossaert, 2000).

3. MORPHOLOGIE

Les adultes du genre *Fasciola* ont un corps en forme de feuille de sauge, revêtu d'une cuticule épineuse et muni de deux ventouses, l'une buccale et l'autre ventrale (**Figures 2 et 3**). *Fasciola hepatica* mesure environ 3 cm de long pour 1 cm de large et pond des œufs elliptiques jaune-brunâtre, operculés, non segmentés, pouvant atteindre 145 µm de long sur 90 µm de large (Pantelouris, 1965). Le miracidium mesure environ 130 µm. Il est triangulaire et recouvert d'une cuticule ciliée. La partie antérieure effilée constitue un rostre. Le sporocyste mesure 600 µm et possède une cuticule lisse (**Figure 4**). Il renferme des cellules embryonnaires indifférenciées qui se multiplient activement et se groupent en massifs pour former les futures rédies. Contenue dans le sac sporocyttaire, la rédie mesure 300 µm. Quand elle est libre, elle mesure entre 500 µm et 2 mm (**Figure 4**). Elle a une forme allongée, cylindrique et présente un collier circulaire au niveau de la jonction pharynx-intestin. A l'extrémité antérieure se trouve un pharynx dont la structure permet l'identification du type de rédie (Augot et al., 1998; Vignoles et al., 2002a). Les cercaires prennent leur origine dans la rédie et se forment à partir de cellules germinales indifférenciées (**Figure 4**).



Figure 2 - *Fasciola hepatica* adulte, d'après Fürst et al., 2012.

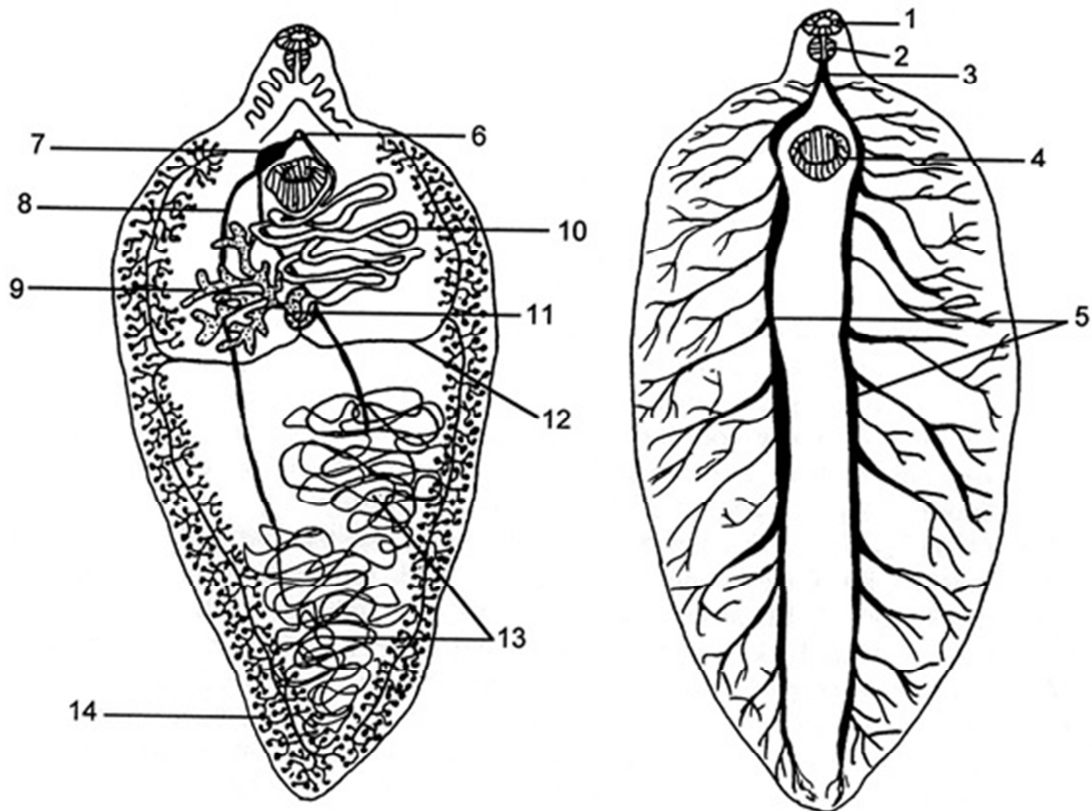


Figure 3 - Structure interne de *Fasciola hepatica* adulte (Andrews, 1999).1: Ventouse buccale ; 2: Pharynx ; 3: Œsophage; 4: Ventouse ventrale ; 5: Caeca ; 6: Pore génital ; 7: Sac du cirrus; 8: Canal déférent ; 9: Ovaire ; 10: Utérus ; 11: Ootype ; 12: Canal vitellin ; 13: Testicules ; 14: Glandes vitello-gènes.

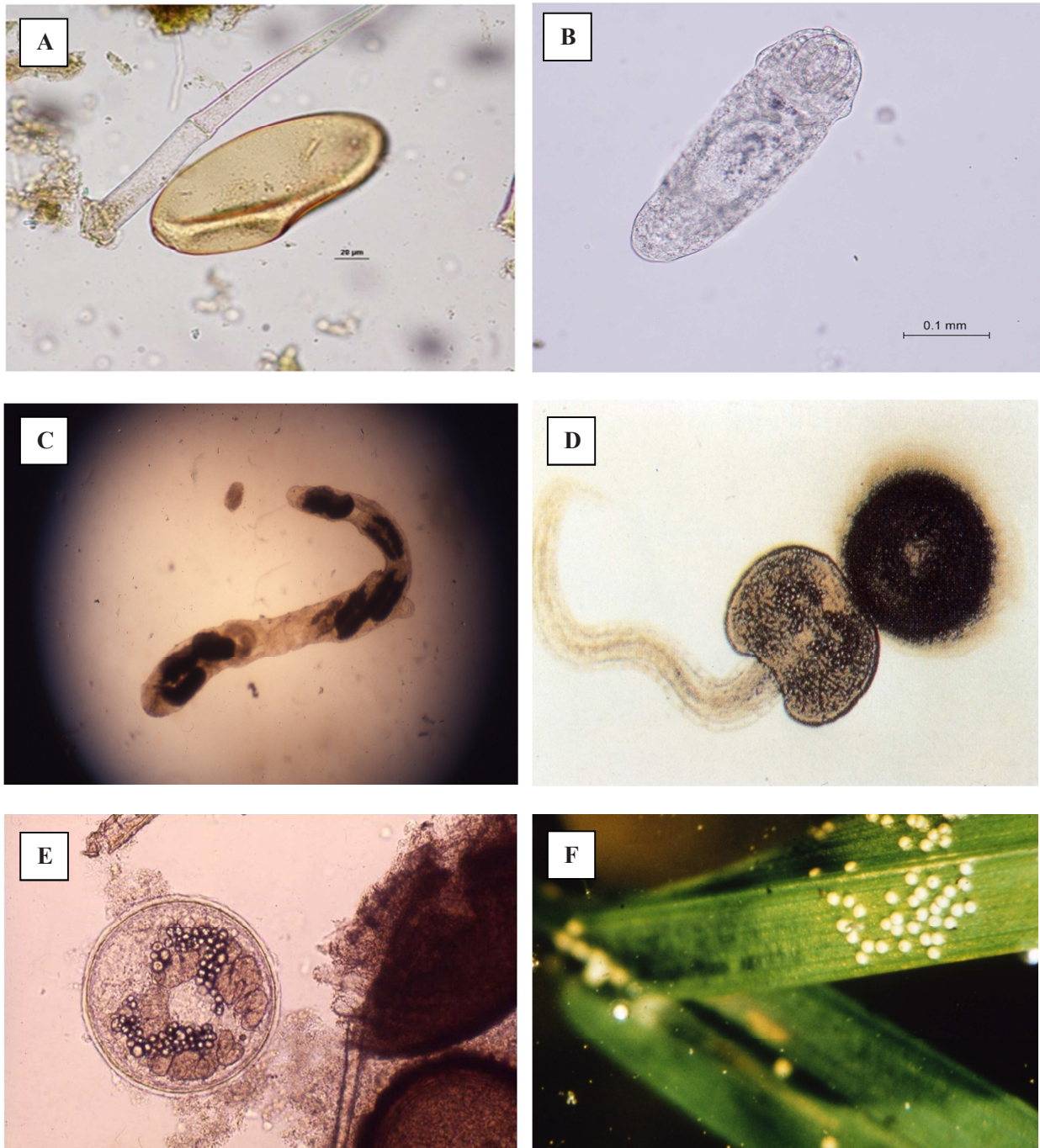


Figure 4 – **A** : Œuf de *Fasciola hepatica* non embryonné (x 20) ; **B** : Jeune rédie (x 40) ; **C** : Rédie (x 20) ; **D** : Cercaire (x 40) ; **E** : Métacercaire (x 40) et **F** : Métacercaires enkystées.

Les cercaires ont un corps de 300 µm et leur appendice caudal est trois fois plus long. L'organisation du corps est celle d'une douve adulte. La métacercaire est une sphère de 0,2 à 0,3 mm de diamètre dont la paroi est composée de plusieurs couches protéiques (**Figure 4**).

4. LA FASCIIOLOSE CHEZ LES RUMINANTS

La fasciolose peut être due à *F. hepatica* ou *F. gigantica*. La douve géante du foie (jusqu'à 7,5 cm de long) (*F. gigantica*) se rencontre principalement dans certaines régions tropicales de l'Afrique et de l'Asie. On notera que les deux espèces cohabitent dans certaines régions du monde (par exemple au Vietnam), ce qui peut aboutir à la formation d'hybrides viables (Wannasan et al., 2014). Les phases parasitaires sont plus longues et la période prépatente est de 13 à 16 semaines pour l'espèce tropicale. Un mollusque lymnaeidé est aussi impliqué dans le cycle mais est plus aquatique que la limnée tronquée (amphibie). La pathogénie ainsi que les principes de traitement et de contrôle sont comparables à ceux de la grande douve du foie (*F. hepatica*) (Torgerson et Claxton, 1999). L'infestation par les deux espèces concerne notamment les bovins et les ovins/caprins.

Dans le reste de l'exposé, seule *F. hepatica* sera concernée. L'infestation est subclinique et chronique chez les bovins alors qu'elle peut entraîner rapidement la mort chez les petits ruminants (Armour et al., 1970). Il faut noter ici que de nombreux mammifères peuvent faire office d'hôtes définitifs, par exemple les cervidés peuvent être impliqués (Rehbein et Visser, 2007), de la même façon que les lagomorphes (comme *Oryctolagus cuniculus* par exemple) (Menard et al., 2000; Rondelaud et al., 2001a), les rongeurs dont le rat noir (*Rattus rattus*) (Valero et al., 1998) et le ragondin (*Myocastor coypus*) (Menard et al., 2001) et les sangliers (*Sus crofa*) (Mezo et al., 2013). Leur rôle dans l'épidémiologie du parasite reste à préciser.

4.1. Pathogénie

Chez les bovins, la migration des douves immatures au travers du parenchyme hépatique provoque des lésions d'hépatite interstitielle aiguë évoluant vers un stade subaigu à chronique à dominance éosinophilique (Doy et Hughes, 1984). Au stade chronique, la fibrose hépatique s'installe et des zones nécrotiques sont observées sur le trajet emprunté par les douves immatures. Suite à leur installation dans les canaux biliaires, les formes adultes provoquent une angiocholite

hyperplasique, suivie de fibrose et de calcification. Ces canaux présentent alors une forme caractéristique dite en « tuyau de pipe » (Ross, 1968) (**Figure 5**). Alors que la douve immature est histophage, la douve adulte est hématophage et ingère près de 0,2 ml de sang par jour (Malone, 1986).

Chez les petits ruminants, cas d'atteinte aiguë, l'étape de migration intra-hépatique s'accompagne de la destruction du parenchyme hépatique et d'hémorragies sévères qui peuvent être fatales (**Figure 5**), surtout si elles sont compliquées par *Clostridium novyi* (*Black Disease*). Les types subaigus et chroniques, moins sévères, s'accompagnent aussi d'anémie hémorragique avec hypoalbuminémie (œdème de l'auge ou signe de la bouteille) (Taylor et al., 2007). On notera qu'aucune immunité ne se développe chez les moutons.

Chez l'homme, des lésions inflammatoires avec infiltrations éosinophiliques apparaissent le long du trajet des parasites juvéniles. L'installation des adultes dans les canaux biliaires provoque un œdème, une réaction inflammatoire et une hyperplasie réactionnelle de l'épithélium des voies biliaires qui, associés à l'obstruction liée au parasite lui-même, contribuent à des manifestations de type angiocholite ou pseudo-lithiase. Les signes cliniques associés chez l'homme sont principalement de la fièvre, une altération de l'état général et des douleurs au niveau de l'hypochondre droit (Ashrafi et al., 2014).

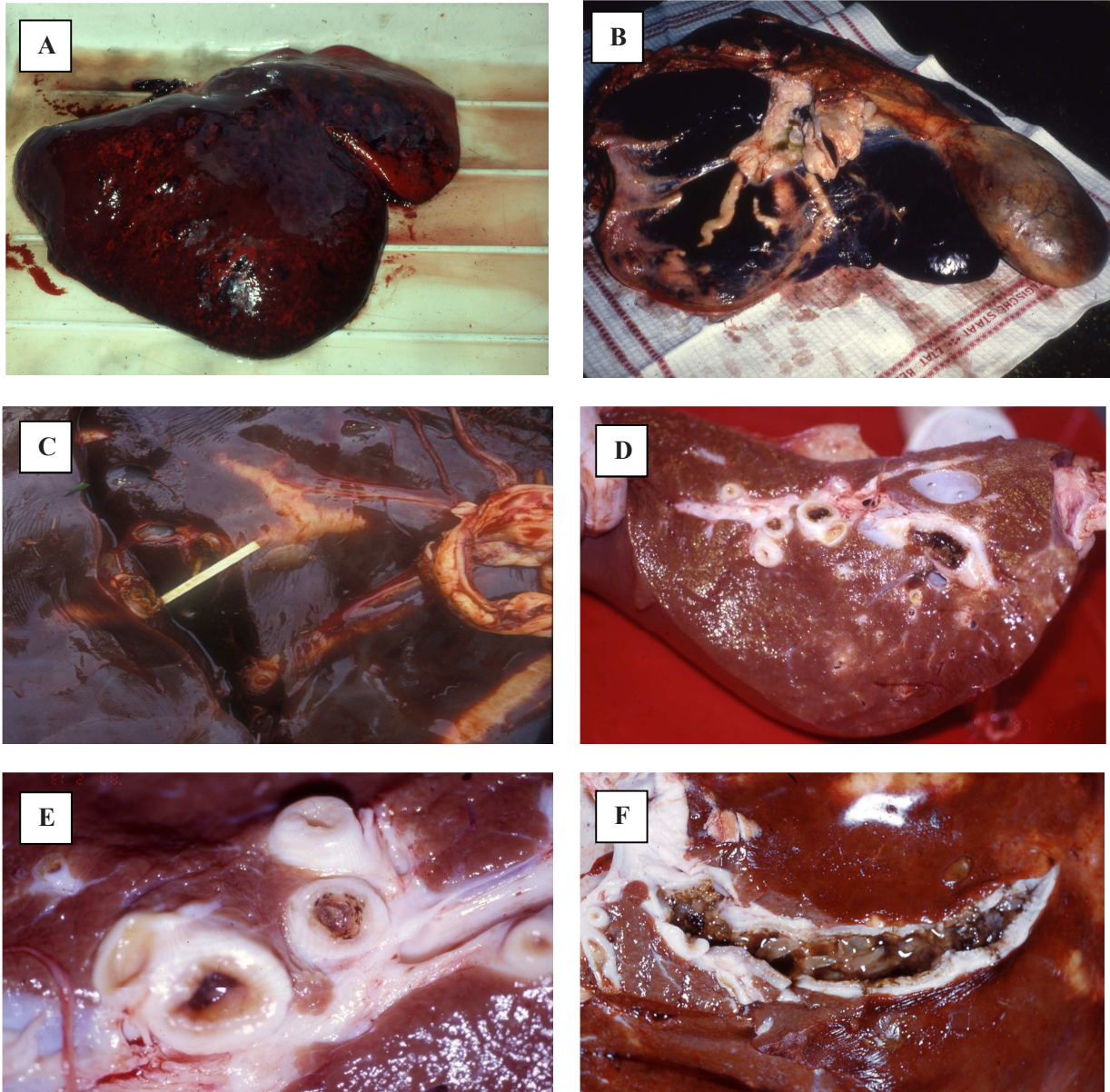


Figure 5 – Lésion hépatique de fasciolose ; **A** : Hépatite aiguë hémorragique (Ovin) ; **B, C, D, E,** et **F** : Lésions hépatiques chroniques de fasciolose (Bovin) ; **B** et **C** : Canaux biliaires bien visibles en surface du fait de la cholangite ; **D** et **E** : Coupes transversales des canaux biliaires montrant l’aspect en « tuyau de pipe » la fibrose hépatique et les calcifications ; **F** : Coupe longitudinale d’un canal biliaire montrant les parasites adultes et l’épaississement de la paroi des canaux biliaires.

4.2. *Diagnostic*

Plusieurs méthodes de diagnostic existent avec des sensibilités, des spécificités et des applications différentes (Alvarez Rojas et al., 2014; Charlier et al., 2014b). Le diagnostic clinique n'a que peu d'intérêt car, chez les bovins, la fasciolose est souvent subclinique. Les retours d'informations des abattoirs concernant la saisie des foies sont souvent aléatoires et tardifs, ce qui ne permet pas la mise en place rapide des mesures de contrôle au niveau du troupeau (vermifugation, drainage des pâtures, ...). L'examen coprologique par sédimentation/flottaison grâce à une solution saturée ($d = 1,5$) en chlorure de sodium et en chlorure de zinc (enrichissement) permet de mettre en évidence les œufs de *F. hepatica* dans les matières fécales. C'est une méthode très spécifique mais peu sensible (30-70 %) du fait de l'excrétion irrégulière des œufs (Charlier et al., 2014b). Toutefois des études récentes ont démontré que la sensibilité des techniques de détection dépendait en grande partie du volume de matière fécale analysé (Conceicao et al., 2002; Rapsch et al., 2006; Charlier et al., 2008) et que répéter l'analyse ou analyser 30 g de matières fécales pouvait augmenter la sensibilité jusqu'à 90 % (Rapsch et al., 2006). Des avancées importantes ont été réalisées via des techniques basées sur la détection d'anticorps spécifiques de *F. hepatica* dans le sérum ou dans le lait et la détection d'antigènes spécifiques de *F. hepatica* ou d'ADN dans les matières fécales. La détection d'anticorps spécifiques de *F. hepatica* se fait surtout par ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) et ceux-ci peuvent être dirigés contre des produits d'excrétion-sécrétion (ES) du parasite mais des réactions croisées ont été décrites (*Dictyocaulus viviparus*, *Dicrocoelium dendriticum*) ou contre des protéines purifiées plus spécifiques (f2, MM3, cathepsine (CAT) L1). Lors d'une comparaison directe entre ces trois protéines, la sensibilité et la spécificité du test basé sur la CAT L1 ont été plus basses que pour les tests basés respectivement sur les protéines f2 (ELISA Pourquier) et MM3 (Kuerpick et al., 2013b). L'immunodiagnostic peut aussi s'appliquer au lait de tank et facilite ainsi la collecte des données. La détection d'antigènes dans les matières fécales (MM3) présente des avantages intéressants (mise en évidence du succès thérapeutique) mais la détection d'ADN par PCR n'offre que peu d'avantages comparée à celle des œufs. La récente technique de *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) pourrait être une alternative intéressante puisqu'elle peut se réaliser en une étape et à température ambiante (Ai et al., 2010) et qu'elle est plus sensible et spécifique que la PCR (Charlier et al., 2014b). Le diagnostic

enzymologique, quant à lui, consiste en un dosage sérique (ou plasmatique) des enzymes hépatiques, notamment de la sorbitol déshydrogénase (SDH) et de la glutamate déshydrogénase (GLDH) qui sont toutes deux des indicateurs de lésions des hépatocytes et aussi de la γ -glutamyl transférase (γ -GT) qui indique plutôt la destruction des cellules épithéliales des canaux biliaires (Bossaert et al., 1999). On notera que le diagnostic économique constitue sans doute une nouvelle étape dans le contrôle de cette pathologie car les résultats des tests diagnostiques ont été directement corrélés avec les paramètres de production et les réponses de production après un traitement douvicide (Charlier et al., 2007; Charlier et al., 2009; Mezo et al., 2011; Charlier et al., 2012; Kuerpick et al., 2012). En pratique vétérinaire, une détection des anticorps dans le sang sur 5 à 10 % des animaux ou dans le lait de tank à la fin de l'été ou au début de l'automne est indicatrice du niveau d'infestation du troupeau (que l'on peut coupler avec une détection des anticorps dirigés contre *Ostertagia ostertagi* et un dosage du pepsinogène). De la même façon, des coproscopies individuelles réalisées en décembre sur la même proportion d'animaux pourront donner des informations intéressantes quant au statut du troupeau.

4.3. *Gestion thérapeutique et agronomique*

La gestion de la fasciolose dans une exploitation présentant un historique de fasciolose doit être effectuée à deux niveaux pour augmenter au maximum les chances de réussite. Les traitements médicamenteux permettront de couper le cycle à court terme en éliminant les parasites dans le foie. Une intervention à plus long terme est indispensable et elle consistera en la mise en place de techniques agronomiques diverses comme, par exemple, le drainage des pâtures humides.

L'arsenal thérapeutique est assez vaste dans la mesure où sept spécialités existent sur le marché belge et sont élaborées à partir de quatre familles pharmacologiques : les benzimidazoles (albendazole, triclabendazole), les dérivés monophénoliques halogénés (nitroxinil), les salicylanilides (oxyclozanide et closantel) et enfin les sulfamidés (clorsulon). Le choix reposera sur plusieurs éléments et notamment sur l'activité du principe actif contre les formes immatures (< 6 semaines) et/ou pré adultes et adultes (> 6 semaines). En effet, seul le triclabendazole a une activité contre les immatures (plus de 90 % d'efficacité sur les formes immatures âgées de sept jours ou moins et 100 % au-delà). Cet avantage décisif a conduit à son usage massif et par conséquent à l'apparition rapide de résistances d'abord chez les moutons (Mitchell et al., 1998)

puisque'ils payent un lourd tribut à la pathologie, puis chez les bovins aussi bien en Europe (Moll et al., 2000) qu'en Amérique du Sud (Ortiz et al., 2013). Des résistances chez l'homme ont elles aussi été documentées récemment aux Pays-Bas (Winkelhagen et al., 2012). Les délais d'attente pour le lait et la viande doivent aussi être pris en considération, d'autant plus que seules deux spécialités sont autorisées chez les bovins dont le lait est destiné à la consommation humaine (albendazole et oxyclozanide) mais avec des délais d'attente qui atteignent quatre jours pour l'albendazole et 60 heures pour l'oxyclozanide obligeant souvent les fermiers à traiter en période de tarissement. La toxicité locale ou générale devra aussi être considérée (nitroxylinil). On notera que l'albendazole et l'oxyclozanide sont les deux molécules les moins écotoxiques (Wardhaugh et al., 2001; Beynon, 2012). L'activité sur d'autres parasites sera aussi un élément clé d'autant plus que les associations sont de plus en plus favorisées par les firmes pharmaceutiques (association de plusieurs principes actifs, comme par exemple le Closamectin® (closantel + ivermectine)). Ceci peut être désavantageux dans la mesure où la pharmacologie des principes actifs est fort différente (rémanence) et du fait du traitement de maladies parasitaires dont l'épidémiologie n'est pas comparable, ce qui nécessite souvent des traitements spécifiques à des moments bien précis au cours de l'année (par exemple les verminoses gastro-intestinales et la fasciolose). Enfin, la voie d'administration sera aussi un élément décisif car elle déterminera la main-d'œuvre nécessaire. Ces différents éléments sont repris dans le **Tableau I**. Les traitements doivent être utilisés de façon stratégique notamment pour limiter l'excrétion des œufs sur les pâturages au printemps, saison durant laquelle les limnées se reproduisent de façon optimale. Les bovins sont donc traités à l'étable, avant le pâturage. Du fait du manque d'efficacité sur les stades larvaires de l'ensemble des molécules à l'exception du triclabendazole, les bovins ne sont traités qu'à partir du mois de janvier, lorsque la plupart des douves ont atteint le stade adulte et sont donc sensibles aux différents produits adulticides. Un deuxième traitement peut être envisagé en mars-avril afin de supprimer les rares douves restantes qui n'avaient pas encore atteint leur maturité lors du premier traitement. On notera que les produits combinés à l'ivermectine doivent être évités dès le mois de décembre dans les pays où l'hypodermose n'a pas fait l'objet d'une éradication (cas de la Belgique qui n'est pas officiellement indemne) en raison de possibles infestations à *Hypoderma* spp. et des complications que cela peut entraîner (paralysie).

Tableau I – Spécialités douvicides avec autorisation de mise sur le marché en Belgique à destination des bovins.

Principe actif	Voie d'administration	Dose en mg/kg (dose en mg/kg du principe actif associé)	Activité (Immature (I) / Adulte (A))	Temps d'attente	Activités sur d'autres parasites
Albendazole 10%	Orale	15	A	Viande : 5J Lait : 84h	Vers gastro-intestinaux <i>Dictyocaulus</i> spp., <i>Moniezia</i> spp.
Closantel	Injectable	5	A	Viande : 11 semaines Lait : interdit	Vers gastro-intestinaux (hématophages)
Oxyclozanide	Orale	10	A	Viande : 10 J Lait : 60 h	Paramphistomes
Nitroxinil	Injectable	10	A	Viande : 60 J Lait : interdit	Vers gastro-intestinaux (hématophages)
Clorsulon (associé à l'ivermectine)	Injectable	2 (0,2)	A	Viande : 66 J Lait : Interdit	(Poux, agent de gale, varron, vers gastro-intestinaux) <i>Dictyocaulus</i> spp.
Closantel (associé à l'ivermectine)	Injectable Injectable Pour-on	5 5 (0,2) 20 (0,5)	A	Viande : 77 J Viande : 49 J Viande : 28 J Lait : Interdit	(Poux, agent de gale, varron, vers gastro-intestinaux) <i>Dictyocaulus</i> spp.
Triclabendazole (associé à la moxidectine)	Pour on	20 (0,5)	I + A	Viande : 143 J Lait : Interdit	Vers gastro-intestinaux <i>Dictyocaulus</i> spp.

Des mesures à plus long terme sont indispensables pour limiter l'impact économique de la distomatose dans l'exploitation. Celles-ci visent principalement les biotopes des limnées de façon à les supprimer ou à éviter que les hôtes définitifs n'y aient accès. Il convient de repérer les mollusques dans les zones humides en mai - juin ou en septembre. La cyanamide calcique peut être utilisée pour tuer les hôtes intermédiaires. Elle sera répandue à raison de 300 kg par hectare au printemps lorsque l'herbe est encore courte mais les limnées déjà actives ($> 10^{\circ} \text{C}$). On notera cependant que cet engrais est une véritable bombe écologique car il a un effet létal sur bon nombre d'invertébrés et vertébrés associés aux zones humides. De plus, le coût à la tonne est estimé à 600 € ; il faut aussi traiter les pâtures avoisinantes et l'épandage est à répéter régulièrement. Certaines plantes (par exemple *Solanum nigrum*) ont des activités molluscicides et d'autres, comme les ombellifères, des activités répulsives ; elles pourraient constituer une alternative intéressante (Hammami et al., 2011; Khan et al., 2013). Par le passé, on a aussi décrit l'utilisation de prédateurs naturels vertébrés (palmipèdes tels que canards et oies) (Levine, 1970) ou invertébrés (par exemple le Gastéropode Stylomatophore *Zonitoides nitidus*) (Rondelaud, 1975). Il est plus intéressant mais nettement plus cher de réaliser des travaux de drainage de façon à assécher les biotopes à limnées (zone hydromorphe) et ce de façon définitive. On convient que le drainage est à privilégier si la zone d'infestation est supérieure à 0,5 ha et le captage si la surface est inférieure à 0,5 ha. Certains exploitants préfèrent nettoyer régulièrement les fossés entourant les pâtures mais cette technique nécessite une main-d'œuvre importante et une fréquence assez élevée. On notera ici qu'il est important d'entretenir une mare dans une pâture en la creusant régulièrement pour éviter qu'elle ne se comble et qu'elle favorise donc l'implantation de limnées sur toute sa surface. D'autres solutions sont très prisées : elles consistent à limiter l'accès aux zones humides en posant une clôture autour d'une mare, en supprimant les vastes zones humides des aires pâturées, ou en comblant les zones boueuses autour des abreuvoirs avec des graviers ou du sable. Il ne s'agit néanmoins pas de solutions idéales au niveau de l'environnement puisque les zones humides sont garantes d'une biodiversité élevée. Si l'exploitation présente des pâtures saines sans zones humides, il est possible d'y faire pâturer une partie du troupeau. Le choix des animaux qui pâturent en zone saine dépend de la nature de l'élevage : en élevage laitier, il convient de privilégier les vaches en production, car il est difficile et coûteux de les traiter correctement contre la douve. Des stratégies de contrôle

basées sur un arbre à décision ont été développées récemment (Knubben-Schweizer et al., 2010; Knubben-Schweizer et Torgerson, 2015) (Figure 6).

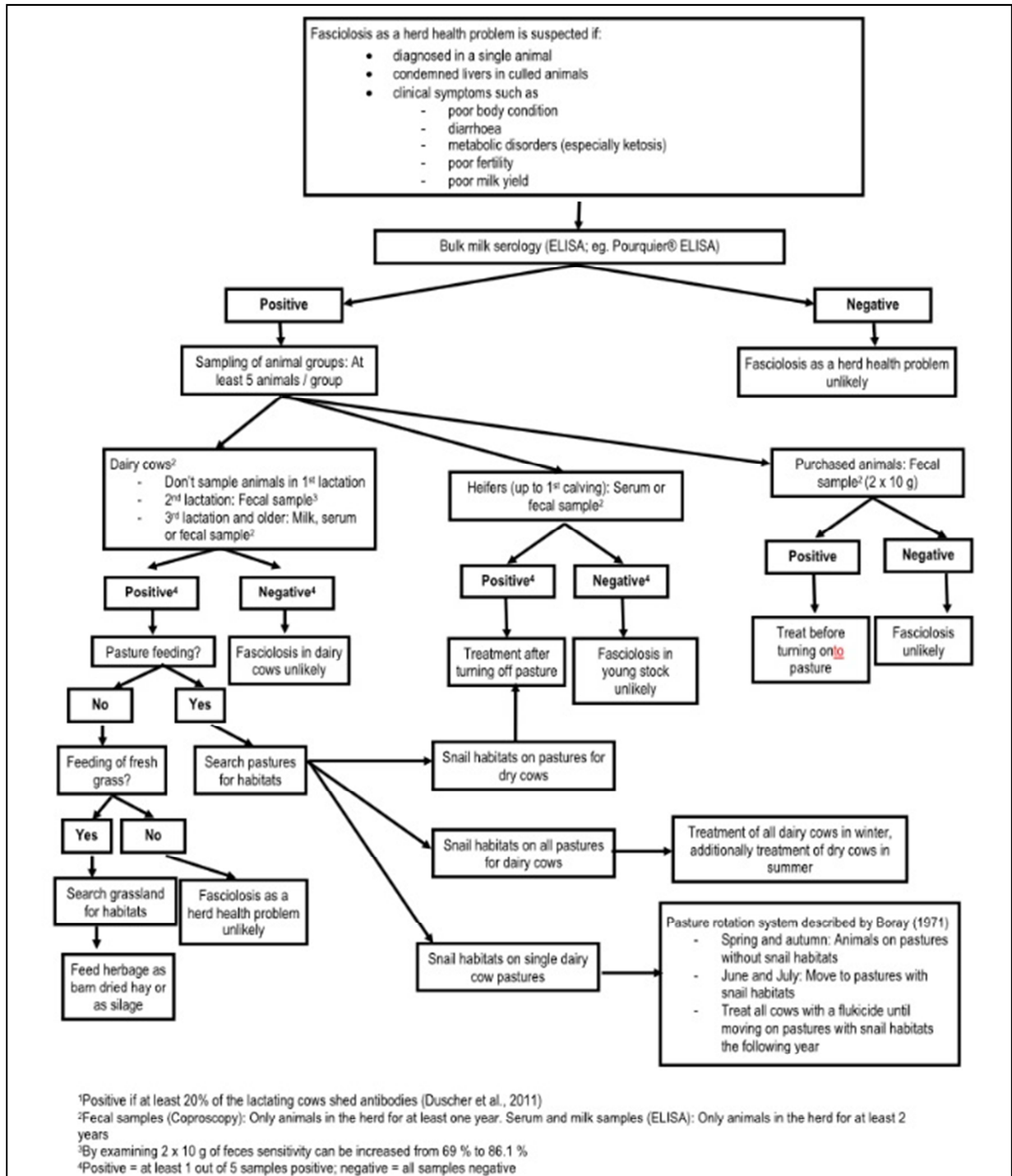


Figure 6 – Fascioloze bovine : arbre de décision (Knubben-Schweizer et Torgerson, 2015).

4.4. *Immunité et essais vaccinaux*

La douve du foie oriente la réponse immunitaire vers le type Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 et IL-10). C'est une réponse basée plutôt sur la production de certains isotopes d'immunoglobulines (IgE et IgG1) au détriment d'une réponse de type Th1 (IL-2, IL-12, IFN- γ), laquelle est une réponse basée plutôt sur l'intervention de différents types cellulaires (macrophage activé, cellule NK). Ceci peut être problématique vis-à-vis de co-infections virale ou bactérienne comme par exemple la tuberculose (Claridge et al., 2012). Les différents mécanismes d'immunomodulation très axés sur le type Th2 (renouvellement du glycocalyx, clivage des immunoglobulines (cathepsines (CAT), induction d'anticorps bloquants, neutralisation de molécules toxiques (glutathion S-transférase)) induits par le parasite sont autant de possibilités d'échappement que de pistes pour l'élaboration d'un vaccin (McNeilly et Nisbet, 2014). De nombreux essais vaccinaux ont été réalisés. Plusieurs protéines de *F. hepatica* ont été identifiées, caractérisées et évaluées dans des essais vaccinaux (Toet et al., 2014; Molina-Hernandez et al., 2015). Une synthèse est présentée dans le **Tableau II**. La protection vaccinale est estimée en termes de réduction de la charge parasitaire en comparant les animaux vaccinés et les contrôles. Si les protéines de liaison aux acides gras (FABP) et la glutathion S-transférase (GST) ont une efficacité limitée, les CAT L semblent les plus intéressantes. L'efficacité de vaccins basée sur la leucine aminopeptidase (LAP) n'a pas été testée chez le bovin malgré d'excellents résultats chez le mouton. La combinaison de ces protéines dans un seul vaccin pourrait aussi être prometteuse (Molina-Hernandez et al., 2015) mais les résultats peuvent être contradictoires selon les essais (cfr. la combinaison CAT L2 + hémoglobine dans le **Tableau II** par exemple). De plus le vaccin trivalent est moins efficace que le vaccin basé sur la LAP seule, suggérant l'absence de synergie. Des protéines du tégument des juvéniles de la grande douve (annexine, tétraspanine) seraient des bons candidats pour des futurs vaccins (Toet et al., 2014) et il pourrait aussi être utile qu'un futur vaccin cible les substances parasitaires qui annihile la réponse de type Th1 (Molina-Hernandez et al., 2015).

Tableau II – Efficacité de différents vaccins contre *F. hepatica* (Toet et al., 2014) (FABP : protéine de liaison aux acides gras ; GST : glutathion S-transférase ; CAT L1/L2 : cathepsine L1/L2 ; LAP : leucine aminopeptidase).

Antigènes	Hôtes	Protection vaccinale	Références
FABP	Bovin	55 %	(Hillyer et al., 1987)
GST	Bovin	43 %	(Spithill et al., 1999)
CAT L1	Bovin	42-69 %	(Dalton et al., 1996)
LAP	Ovin	89 %	(Piacenza et al., 1999)
Hémoglobine	Bovin	43 %	(Dalton et al., 1996)
Paramyosine	Bovin	47 %	(Spithill et al., 1999)
CAT L2 + Hémoglobine	Bovin	72 %	(Dalton et al., 1996; Mulcahy et al., 1998)
CAT L2 + Hémoglobine	Bovin	29 %	(Mulcahy et al., 1999)
CAT L1 + CAT L2	Bovin	55 %	(Mulcahy et al., 1999)
CAT L1 + CAT L2 + LAP	Ovin	79 %	(Piacenza et al., 1999)

4.5. *Epidémiologie en Belgique et en Europe tempérée*

Seule l'espèce *F. hepatica* est abordée ici.

4.5.1 Fasciolose humaine

Il n'existe pas de données sur la prévalence de la douve du foie chez l'homme en Belgique et/ou en Europe. L'Europe est néanmoins le continent où le plus de cas importés ont été enregistrés (Ashrafi et al., 2014). Il est estimé que 91,1 millions de personnes en Amérique du Sud, au Moyen Orient et en Europe sont exposés au risque de fasciolose et que plus de 2,4 millions de

personnes sont infestées dans le monde (Keiser et Utzinger, 2005). Les habitudes alimentaires en Europe ne montrent pas une importante consommation de produits aquatiques crus bien que la consommation de cresson (*Nasturtium officinale*), de pissenlit (*Taraxacum* spp.), ou de mâche (*Valerianella locusta*) ait été décrite comme responsable de cas en France (Dauchy et al., 2006; Houin, 2009). Même si plus de 10.000 cas ont été recensés par le passé en France (Gaillet, 1983) et que la pathologie a été décrite dans pratiquement tous les pays d'Europe tempérée, il s'agit toujours de cas sporadiques, autochtones ou allochtones (hypoendémie) (Mas-Coma et al., 2009). Quelques cas humains de fasciolose ont été identifiés récemment en Belgique sans que l'origine en soit clairement précisée (Orlent et al., 2007; Vanheste et al., 2008; Pilet et al., 2010).

4.5.2 Fasciolose chez les bovins

Une étude sérologique réalisée en Belgique au début de ce siècle (Lonneux et al., 2000) rapporte une séro-prévalence chez les bovins de 17,3 %, avec une moyenne de 20,3 % en Wallonie et de 15 % en Flandre. Des études plus récentes, basées sur la détection d'anticorps dans le lait de tank, font état de prévalences situées entre 30 et 34 % en Flandre (Charlier et al., 2013). La taille du cheptel bovin en Belgique (plus de 2.700.000 têtes en mai 2005 selon l'Institut National de Statistique), la fréquence élevée de l'infestation et sa symptomatologie chronique et subclinique expliquent l'impact économique important de cette parasitose dans notre pays. On estime que les pertes de productions chez le bovin sont significatives dès que la charge parasitaire atteint 30 à 40 douves (Vercruysse et Claerebout, 2001). Peu de données existent sur la prévalence de la fasciolose chez le mouton en Belgique. On peut estimer qu'elle est relativement faible vu que les moutons sont souvent sur-traités vu l'impact de la maladie sur cette espèce.

Le risque d'infection des bovins augmente en Europe (Charlier et al., 2014b). Ce risque s'exprime notamment par des variations de la distribution de la pathologie et de l'augmentation de la prévalence. Par exemple, la fasciolose a été décrite dans des régions précédemment indemnes comme l'Ecosse et l'est de l'Angleterre (Pritchard et al., 2005; Kenyon et al., 2009). En Angleterre, la séro-prévalence de l'infestation chez les bovins laitiers est passée de 48 % en 2003 à 72 % en 2006 (McCann et al., 2010b). Pour ces exemples, les auteurs établissent une corrélation entre l'augmentation de la prévalence, les températures hivernales douces et l'augmentation des précipitations. Les différentes techniques de diagnostic utilisées rendent

compliquée la comparaison des différentes études de prévalence dans l'espace et dans le temps. Toutefois, dans certaines régions, des études répétées avec des méthodologies comparables ont été effectuées durant la précédente décennie. En Espagne (Nord-Ouest), une séro-prévalence de 65 % a été mise en évidence en 2010 (Arias et al., 2010) et le contrôle de la fasciolose n'a pas été amélioré en comparaison avec une étude réalisée 10 ans plus tôt (Sanchez-Andrade et al., 2000). En Suisse, une étude menée en abattoir sur des carcasses de bovins a montré une prévalence plus importante en 2006 (18 %) que celle précédemment rapportée (8-15 %) entre 1975 et 2003 (Rapsch et al., 2006). Cependant, les auteurs concluent que cette augmentation était principalement due à une meilleure sensibilité des techniques diagnostiques utilisées. En Irlande, les prévalences estimées chez le bétail laitier via l'analyse d'échantillons de lait sont comprises entre 65 % et 82 % pour l'automne 2012 (Selemetas et al., 2015a; Selemetas et al., 2015b). En Belgique, entre 38,6 et 82,6 % des exploitations bovines étaient séropositives pour *F. hepatica* selon un rapport du Centre d'Etude et de Recherches Vétérinaires et Agrochimiques (CERVA) de 1999-2000 et aucune diminution de la prévalence n'a été observée entre 2006 - 2008 (Bennema et al., 2010) et 2009 – 2011 (Charlier et al., 2013). Les études dans d'autres régions ne permettent pas de déduire une tendance particulière mais montrent des prévalences modérées à hautes du Sud au Nord de l'Europe et il est probable que la fasciolose affecte les bovins dans tous les états membres de l'Union. Une augmentation de prévalence n'est renseignée qu'en Angleterre où malgré les tentatives de contrôle de ces dernières années, aucune baisse n'y a été observée (Charlier et al., 2014b).

Les pertes économiques ont été estimées notamment en 2005 et font état, par exemple, d'une perte moyenne de 9 % au niveau du gain de poids chez des bovins en croissance et de 10 % de réduction au niveau de la production laitière (Schweizer et al., 2005). Le coût annuel médian d'une vache infestée a été estimé à plus de 300 € (Charlier et al., 2014b).

Les stades libres du parasite ainsi que les populations d'hôtes intermédiaires sont fortement sous la dépendance du climat (humidité, température), ce qui implique une saisonnalité dans l'épidémiologie de l'affection chez l'hôte définitif. La longue période patente (8-10 semaines) et la forte prolificité du parasite impliquent que l'animal parasité représente la principale source d'infection. La pâture sera donc régulièrement contaminée par des œufs durant la belle saison

(des mois d'avril-mai à novembre-décembre). Deux modalités sont décrites en Europe tempérée (**Figure 7**) :

Les œufs émis au printemps suite à la sortie des bovins (ou ceux qui ont survécu à l'hiver) vont s'embryonner et le miracidium va infester le mollusque (et particulièrement la nouvelle génération G1 de mollusques) à la fin du printemps. Suite à la multiplication asexuée dans l'hôte intermédiaire, un pic de métacercaires sera présent sur la pâture à la fin de l'été (d'août à octobre). On parlera d'infestation d'été pour les mollusques, ce qui conduira ainsi à une infestation d'hiver chez les bovins (la plus fréquente) une fois rentrés à l'étable (**Figure 7**).

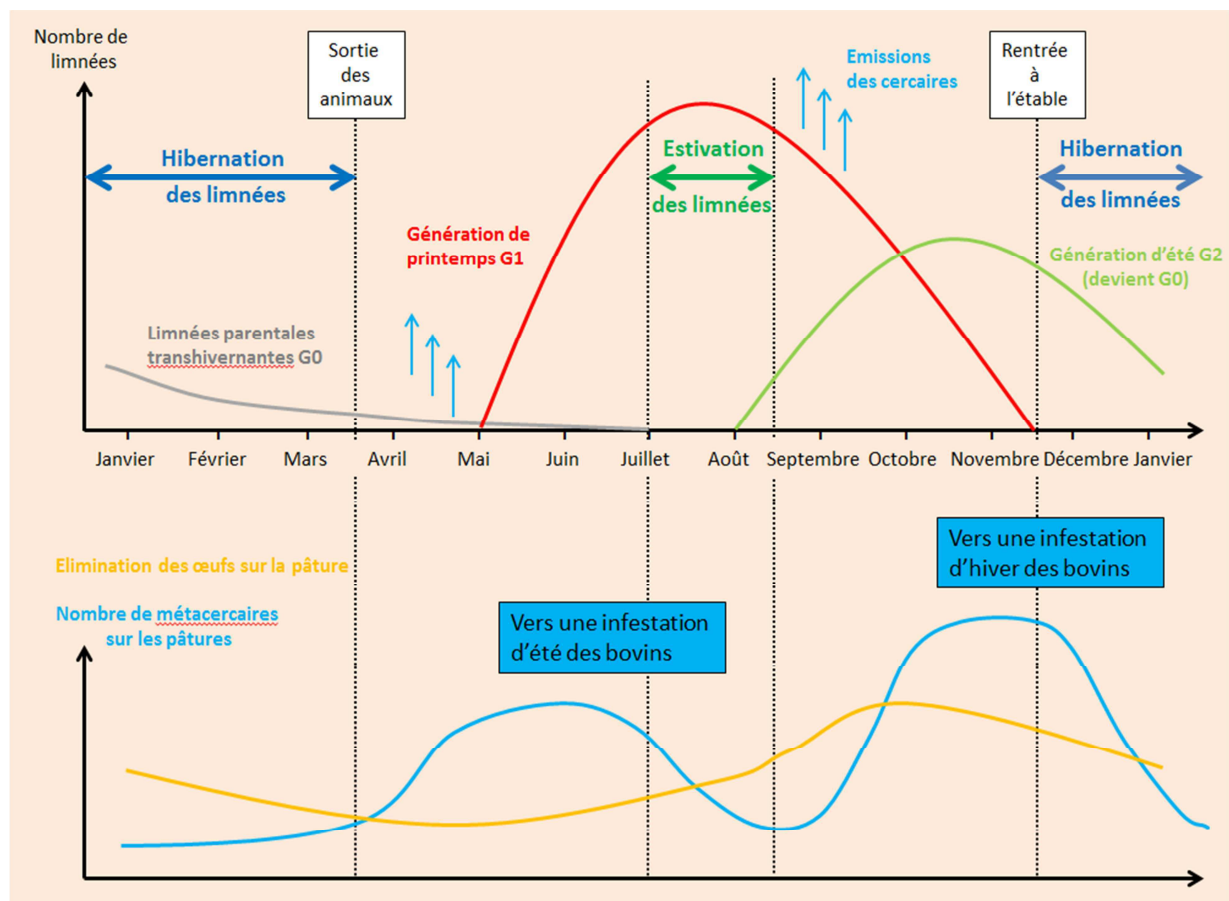


Figure 7 – Modalités d'infestation des mollusques et des bovins en Europe tempérée (GDS Creuse Modifié).

Les limnées hibernent sous une température de 10° C mettant aussi en repos le parasite durant cette période. Les limnées infestées l'année passée et ayant survécu à l'hiver (G0) vont reprendre

leur développement au printemps et excréter des métacercaires (mai-juin) qui seront (avec, dans une moindre mesure, les métacercaires enkystées qui ont elles aussi résisté à l'hiver) à l'origine de la contamination des bovins très tôt dans la saison de pâture. Il s'agit donc ici d'une infestation d'hiver pour les mollusques qui conduira à une infestation d'été pour les bovins. On notera que le pic de métacercaires présentes sur la pâture au printemps sera de plus faible ampleur que le pic décrit à la fin de l'été (**Figure 7**).

Ce lien important entre l'infestation et les conditions climatiques a conduit à l'élaboration de modèles prévisionnels et d'autant plus dans le contexte actuel de changement climatique. A la fin des années 60, le premier modèle basé sur un calcul d'index permettait d'aider à prédire le risque de fasciolose dans différentes parties du Royaume-Uni (Ollerenshaw et Rowlands, 1959). C'est ensuite Malone qui a introduit l'utilisation de systèmes d'informations géographiques (GIS) pour quantifier et prédire spatialement le risque (Malone, 1986). La moyenne annuelle du nombre de jours-pluie semble un facteur de risque important (Selemetas et al., 2014; Selemetas et de Waal, 2015; Selemetas et al., 2015a; Selemetas et al., 2015b). Des facteurs de risques autres que les précipitations et la température ont été ajoutés : pH du sol (McCann et al., 2010a) et longueur de la saison de pâture (Bennema et al., 2010) par exemple. Ces modèles prévisionnels sont très spécifiques d'une région donnée et sont difficilement exportables (Kuerpick et al., 2013a). Ils nécessitent encore beaucoup d'améliorations, notamment dans l'établissement des paramètres clés (Smith, 2011; Charlier et al., 2014b). La collecte d'informations à l'échelle la plus fine (c'est-à-dire à celle de la ferme) augmente la précision du modèle (Charlier et al., 2014a; Selemetas et al., 2015c).

4.6. *Epidémiologie en Equateur et en Amérique du Sud*

4.6.1 Fasciolose humaine

Contrairement à ce qui se passe en Europe tempérée, la fasciolose en Amérique du Sud est un réel problème de Santé Publique puisque de nombreuses personnes (principalement des femmes et des enfants) excréant plus de 400 œufs par gramme de matières fécales (OPG) sont régulièrement rencontrées dans des zones hyperendémiques comme en Bolivie (altiplano), ou au Pérou (Mas-Coma et al., 2009; Gonzalez et al., 2011). L'épidémiologie de la fasciolose humaine est gouvernée par le contexte socio-écologique (Fürst et al., 2012), les comportements

alimentaires (consommation de certains végétaux crus) jouant également un rôle important. On notera par exemple qu'au Pérou, la consommation de jus d'alfa-alfa comme herbe médicinale (*Medicago sativa*) a été identifiée comme un facteur de risque de la fasciolose (Marcos et al., 2006). L'Amérique du Sud est une région où la fasciolose humaine est considérée comme émergente et où les plus hautes prévalences humaines ont été observées (Hillyer et al., 1992; Esteban et al., 1999). Néanmoins, la prévalence de la fasciolose chez l'homme est relativement basse en Equateur (Mas-Coma, 2007), bien que la population à risque soit estimée à 20,6 % (Keiser et Utzinger, 2005). La première étude établissant la présence de la maladie dans une communauté équatorienne a été publiée en 2000 (Trueba et al., 2000) où 6 % (9/150) des personnes d'une communauté andine se sont révélées sérologiquement positives à *F. hepatica*. Plus tard, une étude coprologique dans ce pays a montré une prévalence de 0,5 % dans un groupe d'enfants (Gozalbo et al., 2004).

4.6.2 Fasciolose chez les bovins

En Amérique du Sud, relativement peu de données existent chez le bovin. En 2005, une étude réalisée à l'abattoir de Machachi (Equateur) a montré que 12,25 % (162/1319) des foies de bovins subissaient une saisie pour cause de lésions de fasciolose (Egas-Dávila et al., 2006). De même au Brésil en 2009, la saisie des foies dans un abattoir a concerné 28,24 % (9568/33870) des carcasses, ce qui correspond approximativement à une perte de 132.000 \$ américains (Bernardo et al., 2011). D'autres études au Pérou (Espinoza et al., 2010) ont estimé les pertes annuelles dues à la saisie des foies à environ 50 millions \$ américains.

La situation géographique de l'Equateur lui confère un climat équatorial atténué par la présence de la cordillère des Andes. La province de Pichincha (Quito est à 3000 m d'altitude) se situe dans la région montagneuse (Sierra) qui traverse le pays du Nord au Sud. La saison des pluies s'étale d'octobre à mai et la saison sèche de juin à septembre. En raison de l'altitude, les températures oscillent toute l'année entre 12 et 18° C. Les aspects saisonniers de l'infestation des bovins en Equateur ne sont, à notre connaissance, pas connus et le nombre de générations annuelles de limnées non plus. Néanmoins, plusieurs études au Brésil apportent des éléments de réponse. En effet, Bernardo et al. en 2011 ont mis en évidence plusieurs éléments : la saisie des foies à l'abattoir avait lieu durant toute l'année mais avec un pic en avril et mai et la prévalence était

statistiquement plus élevée pendant la saison sèche. De plus, une précédente étude sur une limnée locale, *Pseudosuccinea columella* (Amato et al., 1986) a montré que la densité de population diminuait de septembre à février et augmentait de mars à septembre. Ils ont aussi mis en évidence que les métacercaires étaient présentes en quantité plus importante sur la pâture entre juin et octobre et entre mars et avril. Les inondations par le lessivage qu'elles induisent, pourraient être responsables des réductions de densité de populations observées durant la saison humide (Coelho et Lima, 2003). Une autre étude (Faria et al., 2005) a montré que l'élimination des œufs du parasite par les bovins avait lieu toute l'année mais qu'elle augmentait pendant la saison sèche avec un pic en septembre. Ces auteurs émettent l'hypothèse que la densité de population de *P. columella* augmenterait pendant la saison sèche, accroissant de la même façon la quantité de métacercaires sur la pâture (Faria et al., 2005). Ces données sont reprises dans la **figure 8**. Il a été observé au Pérou que les bovins s'infestaient principalement de décembre à mai avec pas ou peu d'infestation entre juin et août. Un pic dans l'excrétion des œufs était alors aussi observé en août-septembre (Khan et al., 2013). Au Mexique, l'infestation était aussi plus importante de septembre à mai que de juillet à août (Rangel-Ruiz et al., 1999).

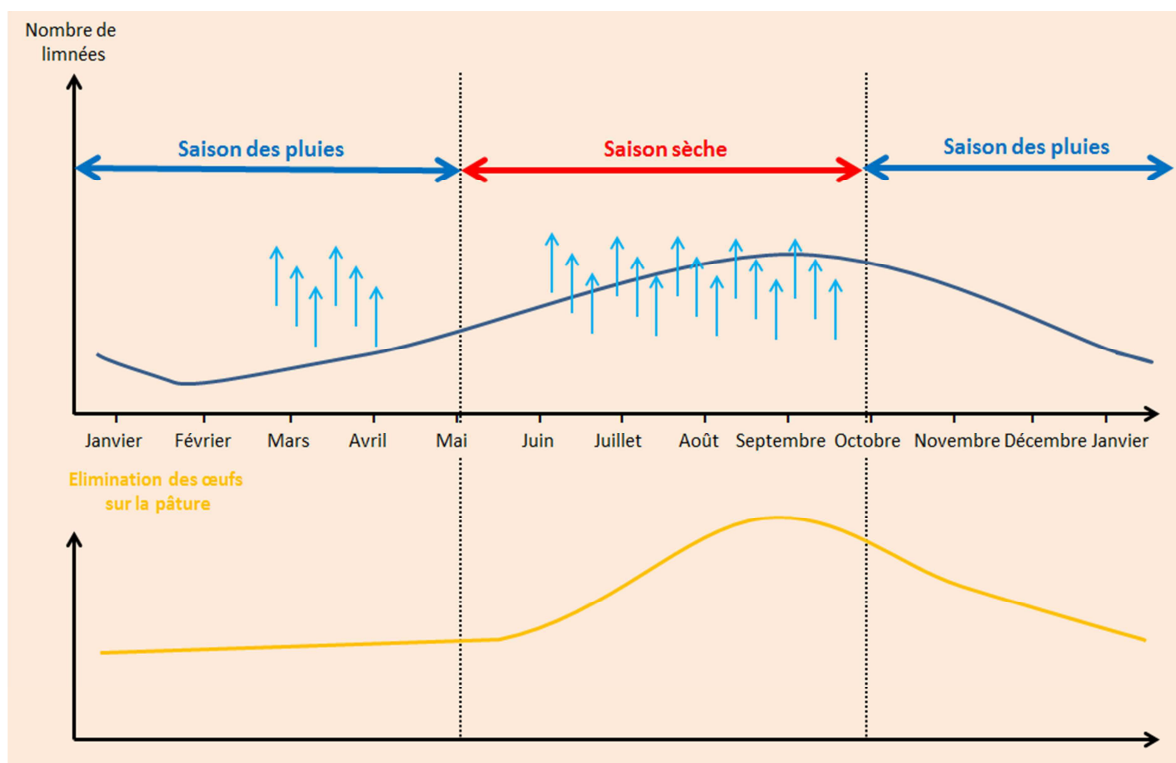


Figure 8 – Éléments sur les modalités d'infestation des mollusques et des bovins en Amérique du Sud.

Depuis la fin des années 1990, un GIS a été mis en place (sur base de données climatiques) pour étudier l'épidémiologie humaine et animale de *F. hepatica* dans les Andes (Fuentes et al., 2005). Néanmoins, ce système ne permet pas d'expliquer la totalité de la transmission de la fasciolose dans les zones étudiées. Des données de télédétections (notamment les index de végétation normalisés) ont été ajoutées au modèle, permettant ainsi de générer des cartes de risques au niveau régional mais, une fois encore, le modèle n'explique pas la totalité de la transmission de la fasciolose animale (Fuentes et Malone, 1999). La mise en place d'un vaste réseau de recherche (GNOSIS) a permis d'établir une base minimale de données médicales spécifiques à chaque région étudiée, complétant et rendant exploitable en partie le précédent GIS (Fuentes et al., 2005). En plus de régions en Bolivie et au Pérou, le modèle a permis l'étude des provinces équatoriennes d'Azuay, Cotopaxi et Imbabura (on notera que la province Pichincha se trouve entre la province Cotopaxi et la province Imbabura). Le modèle a ainsi mis en évidence une période de haut risque d'infestation d'octobre à juin pour ces trois provinces (Fuentes et al., 2005). Toutefois, contrairement aux régions boliviennes et péruviennes, le modèle n'a pas pu être validé pour les provinces de l'Equateur du fait, entre autres, de l'absence de données concernant la présence d'hôte(s) intermédiaire(s) adéquats pour le parasite (Fuentes et al., 2005).

5. LES MOLLUSQUES HÔTES INTERMÉDIAIRES

Les hôtes intermédiaires de *Fasciola* spp. sont des mollusques dulçaquicoles de la famille des *Lymnaeidae* (Gastéropode, Basommatophore) (**Figure 9**). Cette famille participe au cycle biologique de pas moins de 71 espèces de trématodes appartenant à 13 familles différentes. La grande capacité adaptative de cette famille explique la distribution mondiale de la fasciolose. On reconnaît facilement les mollusques de cette famille sur le terrain car l'ouverture de la coquille est à droite quand on la regarde de face (**Figure 10**), et les yeux se situent à la base d'antennes triangulaires. Ces mollusques ont la faculté de survivre à de longues périodes de sécheresse (estivation) et à des basses températures (hibernation), même si leur développement est fortement ralenti sous ces conditions. Ils hibernent quand la température est inférieure à 10° C, vivent en général un an, et sont hermaphrodites (auto-fécondation ou fécondation croisée). Qu'ils soient amphibies ou aquatiques, ces mollusques sont inféodés à l'eau, en général légèrement acide, bien qu'ils puissent survivre 12 mois à une estivation artificielle (Soulsby, 1982). Ils sont phytophages

et se nourrissent aussi de cyanobactéries (*Oscillatoria* spp.) ou, de façon plus générale, de végétaux herbacés.

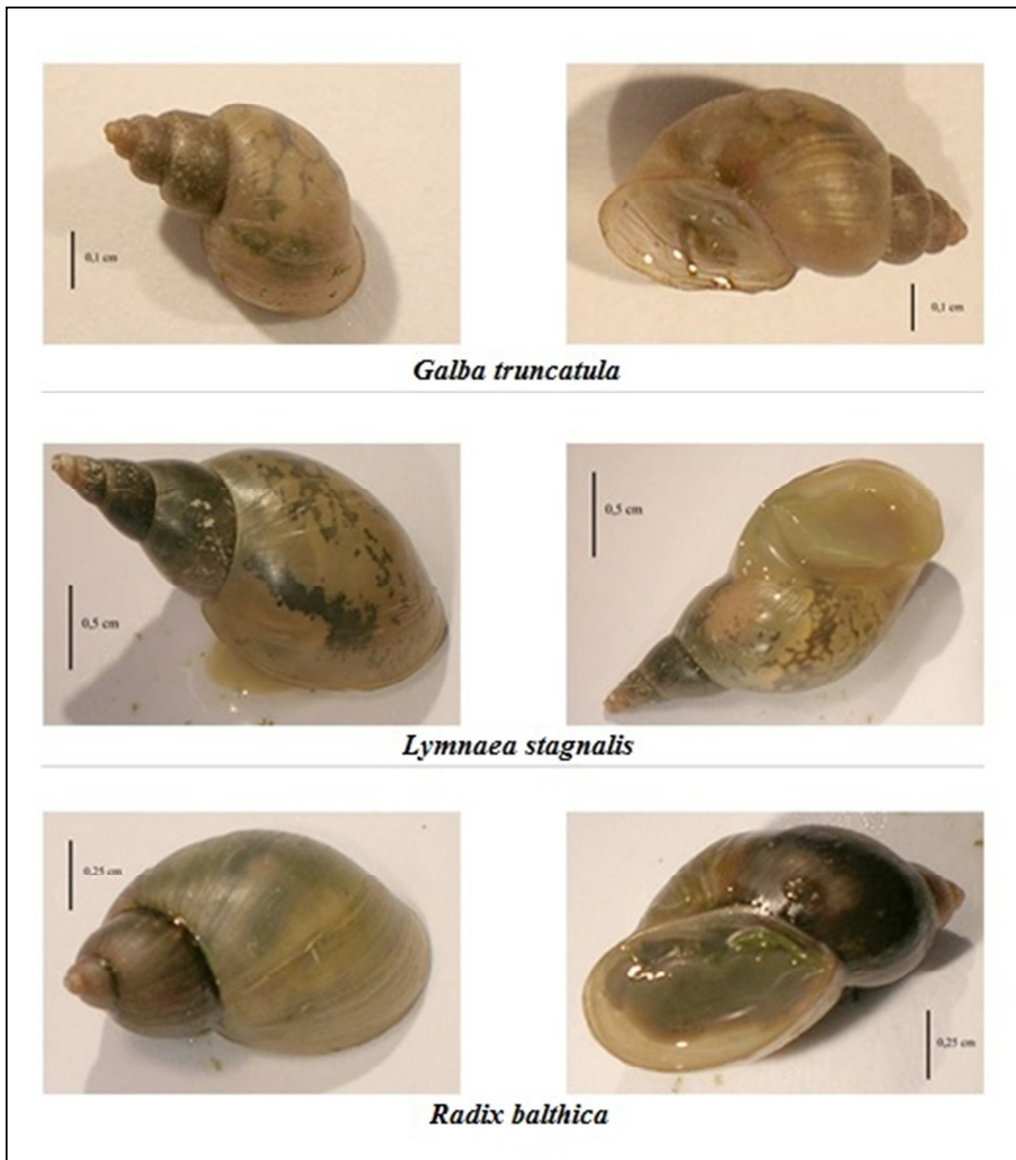


Figure 9 – Principaux mollusques *Lymnaeidae* en Belgique.

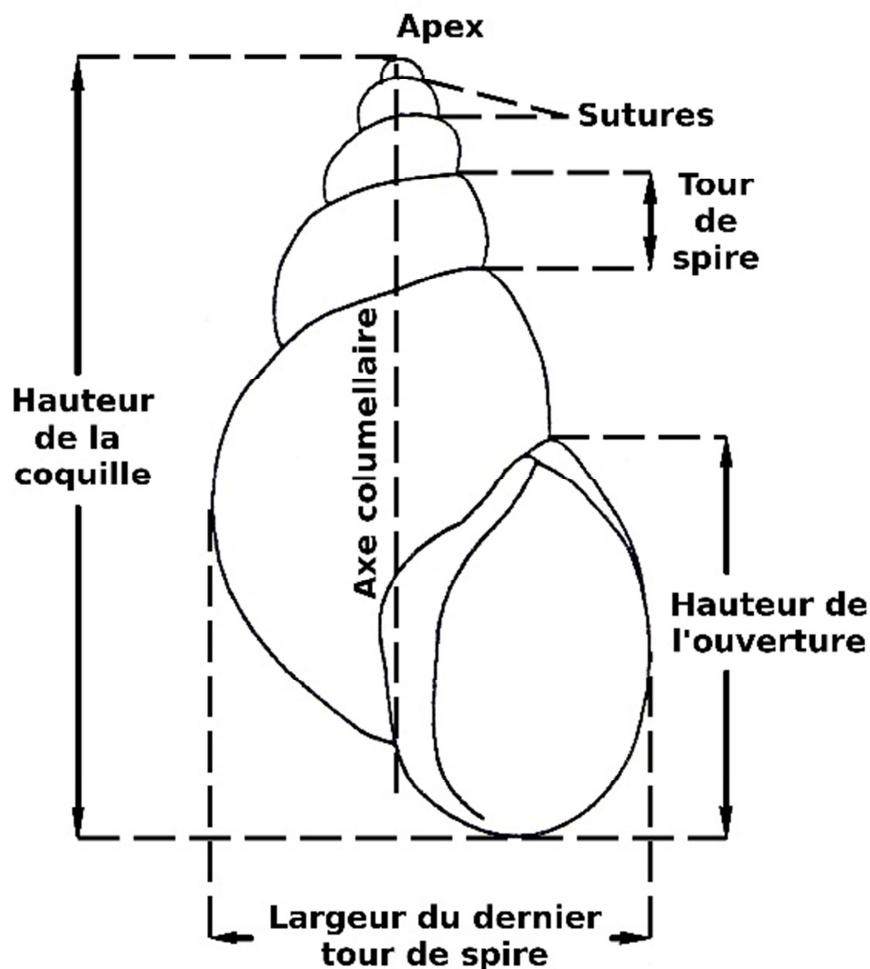


Figure 10 – Morphologie de la coquille de *G. truncatula* (Rondelaud et al., 2003).

Les hôtes intermédiaires de *Fasciola* spp. sont souvent considérés comme des vecteurs dans la littérature scientifique et il n'est pas rare de leur voir appliquer les termes de compétences ou de capacités vectorielles. A l'origine, le terme de vecteur fait référence à des arthropodes hématophages responsables d'une transmission biologique et active d'un agent pathogène, d'un hôte vertébré à un autre hôte vertébré. S'il s'applique parfaitement aux tiques ou aux moustiques, son utilisation est plus sujette à discussion concernant les mollusques puisqu'il ne s'agit pas d'arthropodes hématophages et que, s'il y a une transmission biologique (impliquant une multiplication), elle n'est pas active (le mollusque ne recherche pas activement l'hôte définitif du

parasite). Toutefois, par commodité, ces termes seront employés notamment pour différencier les notions de compétence et de capacité vectorielle, la compétence illustrant le fait que la multiplication du parasite est possible dans le mollusque alors que la capacité vectorielle illustre le fait que de nombreuses cercaires infestantes peuvent être émises dans des conditions environnementales données.

5.1. *Classification*

Une très vaste confusion taxinomique règne dans la famille des *Lymnaeidae*. A peu près 1800 espèces et 34 genres ont été décrits dans le passé (Hubendick, 1951). Certaines des classifications actuelles prennent en compte un, deux, ou plus de deux genres (Vinarski, 2013). La présence de six genres dans la famille des *Lymnaeidae* était généralement acceptée : *Lymnaea*, *Galba*, *Omphicola*, *Pseudosuccinea*, *Stagnicola* et *Radix* (Rondelaud, 1998). Différents types d'approches ont été utilisés pour démêler cet écheveau et établir des relations dans cette famille : la morphologie, la paléontologie, la caryologie, les croisements expérimentaux, l'électrophorèse enzymatique et l'immunologie (Bargues et al., 2001). Un consensus n'a toujours pas été atteint de façon unilatérale et de nombreuses incertitudes demeurent. Toutefois, l'avènement de la biologie moléculaire, du *barcoding* et de la phylogénie tendent à résoudre, au moins en partie, ces relations.

5.1.1 Morphologie

L'identification des différents mollusques de la famille des *Lymnaeidae* sur seule base de leur morphologie s'avère pour le moins compliquée si pas impossible. La forme de la coquille ou l'organisation du tractus génital (**Figure 11**) ont, entre autres, été utilisés dans ce but. De nombreuses publications d'anatomistes européens (Jackiewicz, 1998) ou latino-américains (Paraense, 2004) ont essayé de clarifier cet état de fait. En effet, ces mollusques présentent de fortes variations intra-spécifiques (coquille) et en même temps de faibles variations inter-spécifiques (tractus génital).

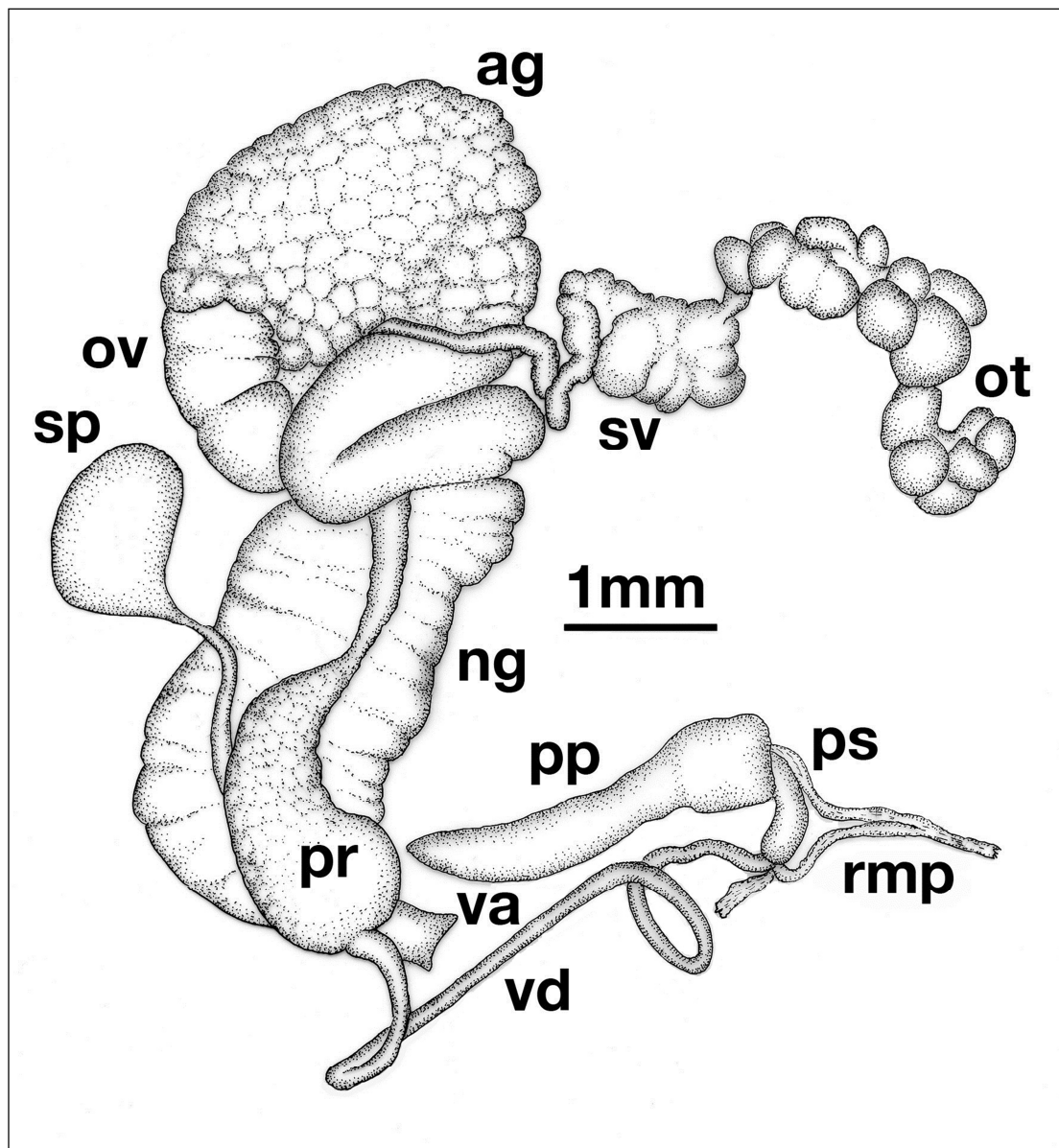


Figure 11 – Organes reproducteurs de *G. truncatula* : **ag** : glande de l’albumen ; **ng** : glande nidamentaire ; **ot** : ovotesticule ; **ov** : oviducte ; **pp** : preputium ; **pr** : prostate ; **ps** : gaine pénienne ; **rmp** : complexe du muscle rétracteur pénien ; **sp** : spermathèque ; **sv** : vésicule séminale ; **va** : vagin ; **vd** : canal déférent. D’après Pointier (Pointier et al., 2009).

Ainsi, les résultats d’études morphologiques et anatomiques de la coquille, de la radula et de la prostate suggèrent une homoplasie morphologique parmi cette famille (Bargues et al., 2001). Il a été montré, par exemple, que l’analyse morphométrique de la coquille ne permettait pas de

définir des entités homogènes reconnaissables car la variation était continue (Samadi et al., 2000; Pfenninger et al., 2006). Cette plasticité phénotypique est liée à l'environnement pour *R. balthica*. Par exemple, la présence de poissons prédateurs de mollusques conduit à une morphologie de coquille plus résistante à l'écrasement (Bronmark et al., 2011). Si la morphologie et l'anatomie ne suffisent pas à identifier certains complexes d'espèces (complexe « *Radix peregra* » et complexe « *Stagnicola palustris* » par exemple) (Rondelaud, 1998), il faut toutefois noter que certaines espèces peuvent s'identifier facilement par la morphologie et l'anatomie (*L. stagnalis*).

5.1.2 Séquences génomiques

Pour résoudre les problèmes de classification rencontrés au sein des deux complexes et de manière générale au sein de la famille des *Lymnaeidae*, des progrès récents en génétique moléculaire ont permis la mise au point d'outils visant à distinguer clairement ces espèces de *Lymnaeidae* et, plus généralement, la caractérisation des populations de mollusques. Des séquences d'ADN spécifiques et de différentes natures sont utilisées. Il s'agit de l'ADN codant pour la grande sous-unité 16S du ribosome mitochondrial, de l'ADN mitochondrial codant pour la cytochrome oxydase (COX-1), de l'ADN ribosomal nucléaire de la sous-unité 18S, ou encore des séquences ITS-1 et ITS-2 (*Internal Transcribed Spacer*) de l'ADN ribosomal nucléaire qui peuvent servir pour différencier plusieurs espèces de *Lymnaeidae* (Bargues et Mas-Coma, 2005; Mas-Coma et al., 2005). On notera que la PCR en temps réel a aussi été utilisée pour différencier quatre espèces de limnées en Amérique du Sud et, plus précisément, en utilisant les pics de la température de fusion d'une région particulière de l'ADN ribosomal (18S) (Duffy et al., 2009). Une étude récente a utilisé une base de données très complète puisqu'elle a construit une « super matrice » en concaténant les séquences 16S, ITS-1 et ITS-2 représentant ainsi 5054 paires de bases qui ont été analysées à la fois par maximum de vraisemblance (*Maximum likelihood*) et par inférence Bayésienne (*Bayesian inference*) (Correa et al., 2010). Le résultat de cette analyse, qui fournit la phylogénie la plus complète à ce jour, est illustré à la **Figure 12**. Un résumé reprenant la classification des principales espèces de limnées en Europe tempérée et en Amérique du Sud et qui sera utilisé dans ce travail, est repris à la **Figure 13**.

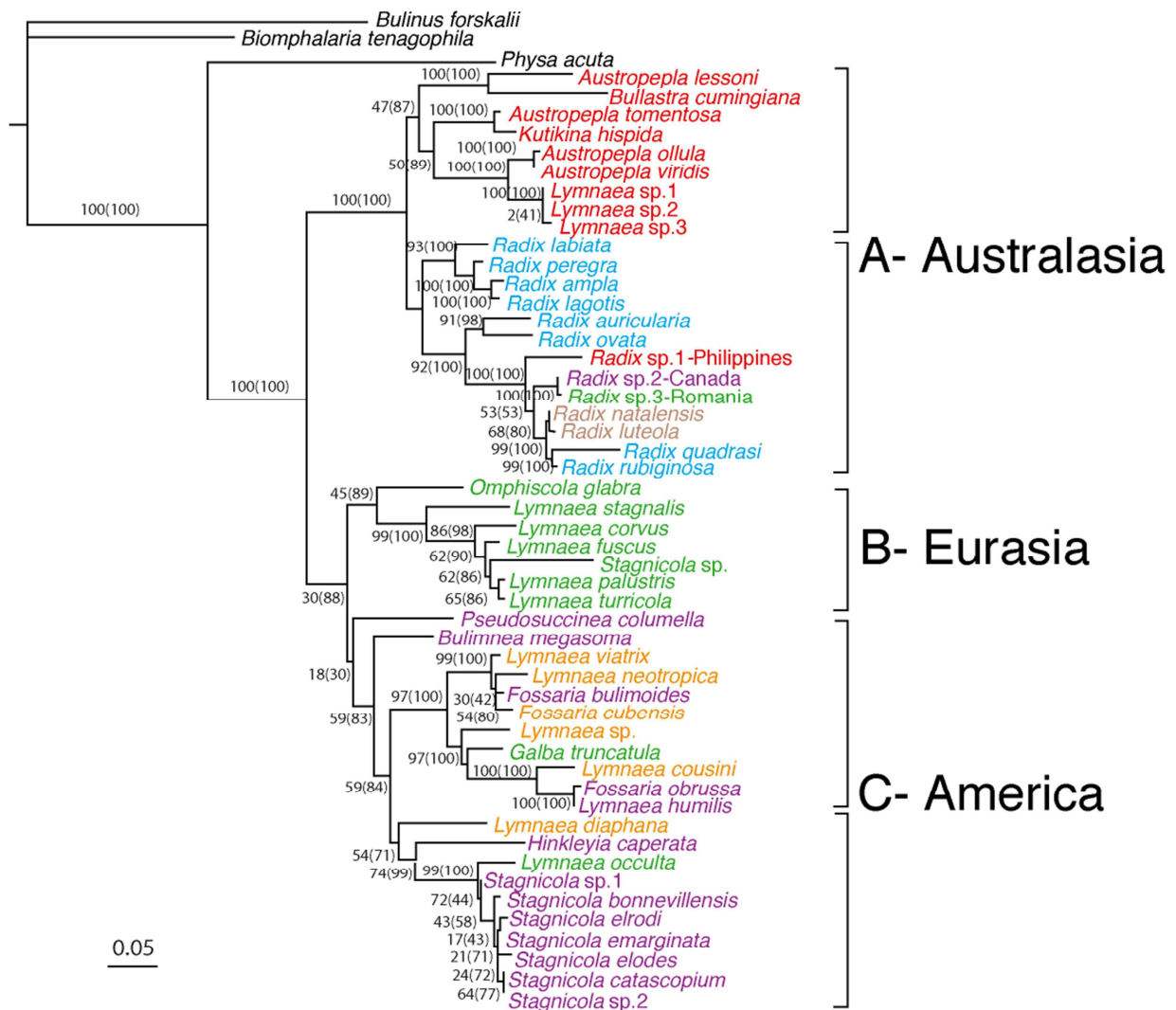


Figure 12 – Phylogénie moléculaire des *Lymnaeidae* (Correa et al., 2010; Pointier et al., 2015). L'arbre a été obtenu en concaténant les séquences 16S, ITS-1 et ITS-2 de 50 espèces de limnées. Les couleurs des noms représentent l'origine géographique ; rouge et bleu : Australasie ; vert : Eurasie ; brun : Afrique et Océan Indien ; Ocre : Afrique du Sud ; Violet : Amérique du Nord.

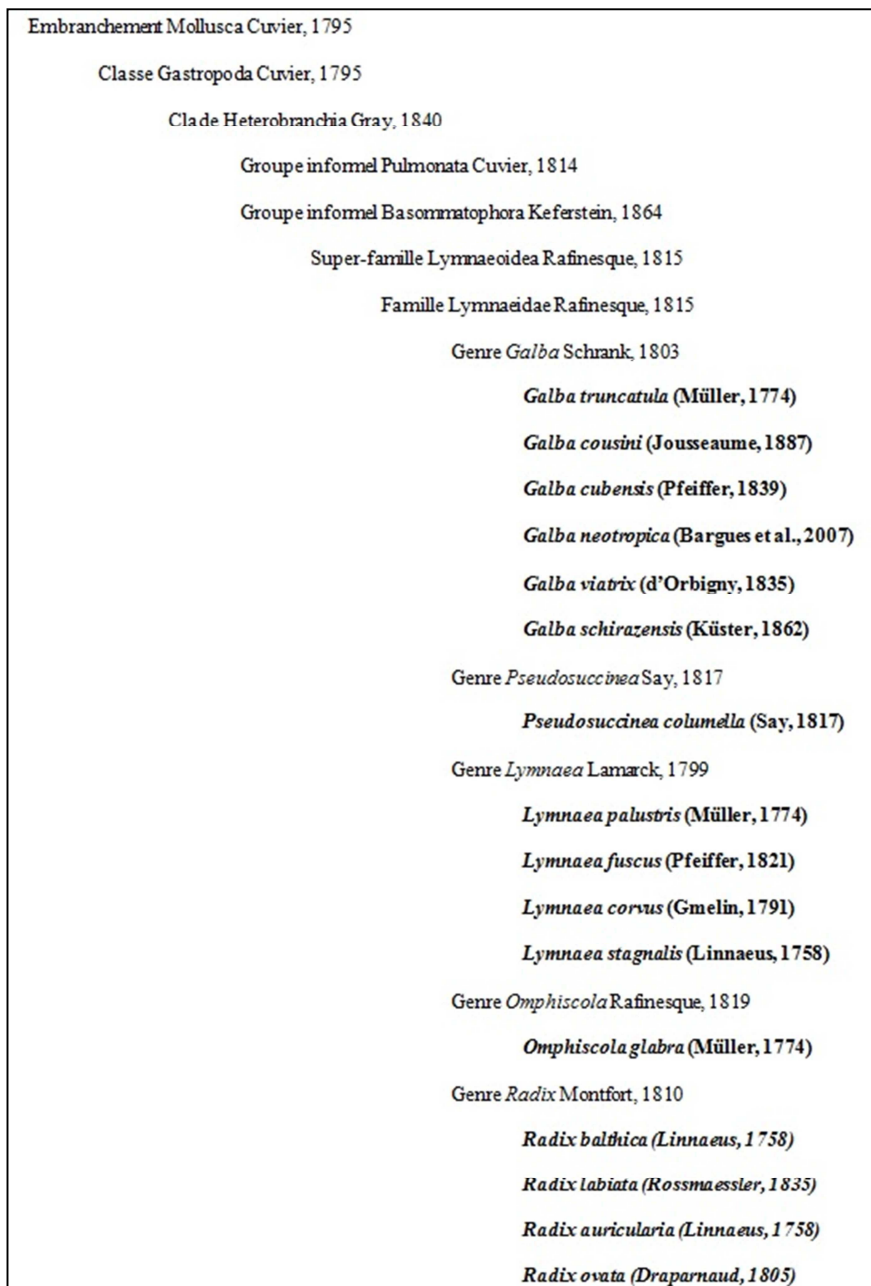


Figure 13 – Les principales limnées en Europe tempérée et en Amérique du Sud (Bouchet et Rocroi, 2005; Correa et al., 2010).

Il faut noter que *R. balthica* Linnaeus, 1758 et *R. peregra* désignent la même espèce. C’est à partir de 2001 que le nom *R. peregra* a été jugé obsolète (Bargues et al., 2001). La littérature récente utilise toutefois les deux noms sans consensus. Par commodité, le nom *R. balthica* sera préféré dans ce document.

5.2. Détection de l'infestation chez le mollusque

Cette partie consiste en la traduction résumée et actualisée d'une revue de la littérature qui a été effectuée en étroite collaboration avec le Prof. Daniel Rondelaud de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de l'Université de Limoges et publiée dans *Parasitology Research* en 2008 (étude 5).

Dans le cycle biologique de *Fasciola* spp., plusieurs espèces de mollusques peuvent intervenir comme hôtes intermédiaires. Néanmoins, l'aptitude des différentes espèces de mollusques pour maintenir le parasite pendant les infestations naturelles ou expérimentales varie en fonction de l'âge des mollusques quand ils sont exposés aux miracidia. Par exemple, dans le cas de *F. hepatica*, *G. truncatula* est le principal hôte intermédiaire dans l'ancien monde (Taylor, 1965; Torgerson et Claxton, 1999) mais la plupart des autres espèces de limnées de l'Europe de l'ouest peuvent aussi héberger le développement larvaire de la douve si elles sont exposées aux miracidia durant leurs premiers jours de vie (Boray, 1978). Pour déterminer la compétence et la capacité vectorielle d'une espèce ou d'une population de mollusques, il est nécessaire de mesurer plusieurs paramètres comme la prévalence et l'intensité de l'infection et la production de métacercaires (Graczyk et Fried, 1999).

5.2.1 Techniques microscopiques

L'écrasement (*snail crushing*) et/ou la dissection du mollusque avec examen des tissus mous sous une loupe binoculaire ou un microscope sont utilisés depuis longtemps (Taylor, 1965) et encore récemment (Rondelaud et al., 2015b). En effet, comme la coquille de *G. truncatula* est petite (≤ 12 mm) et très fine, le mollusque peut être écrasé dans une boîte de Petri pleine d'eau en appliquant une pression à l'aide d'une pince fine sur le dernier tour de spire de la coquille. Si des formes larvaires de *F. hepatica* sont présentes, elles seront facilement visibles et la prévalence de l'infestation des mollusques pourra être évaluée (Dreyfuss et al., 2005). Toutefois, l'intensité de l'infestation sera difficile à établir car seules les rédies et cercaires vivantes et libres à l'intérieur de l'hémocèle pourront être comptées. En effet, les sporocystes, les rédies immatures ou dégénérées et les quelques cercaires libres, souvent localisés à l'intérieur du pied du mollusque et du manteau, ne pourront pas être observées. C'est pourquoi la dissection est préférable. Après destruction de la coquille, la dissection des viscères et leur examen sous la loupe binoculaire ou le

microscope permettent la collecte du nombre de rédies et de cercaires vivantes ou dégénérées, quel que soit leur stade de maturité. Cette technique a été utilisée par de nombreux auteurs pour suivre l'intensité des infestations naturelles de mollusques *Lymnaeidae* par *F. hepatica* (Abrous et al., 1999; Abrous et al., 2000; Mage et al., 2002; Belfaiza et al., 2004b, c; Belfaiza et al., 2005; Pointier et al., 2007; Dreyfuss et al., 2014; Rondelaud et al., 2014; Rondelaud et al., 2015a).

L'excrétion des cercaires pendant la période patente est aussi utilisée (Taylor, 1965). Cette technique nécessite donc que les mollusques soient encore vivants suite à leur prélèvement sur le terrain. Il s'agit de comptabiliser l'excrétion des cercaires pendant six à sept semaines (à 20° C) (Kendall et McCullough, 1951; Hodasi, 1972; Audousset et al., 1989). Toutefois, l'excrétion des cercaires est intermittente et un nombre variable de mollusques infestés meurent sans avoir excrété de cercaires (Vignoles et al., 2002a), ce qui peut sous-estimer la prévalence. Celle-ci est sous-estimée en comparaison avec les prévalences obtenues par dissection (Born-Torrijos et al., 2014). De plus, ce genre d'expérimentation est long et la survie des mollusques implique un matériel plus conséquent que celui nécessaire à l'écrasement ou à la dissection.

L'analyse de coupes semi-fines de tissus des mollusques infestés peut aussi être utilisée pour déterminer le stade de développement des rédies et étudier la réponse des tissus infectés (Barber, 1962; Rondelaud et Barthe, 1980, 1983). Cette technique est réservée aux infestations expérimentales puisque l'identification de l'espèce de trématode n'est pas possible de cette manière. L'examen histologique des mollusques expérimentalement infestés permet un dénombrement précis des différentes formes larvaires (sporocystes, rédies, ou cercaires), l'évaluation de leur statut physiologique (vivant ou dégénéré) ainsi que leur localisation dans le mollusque.

Toutefois la sensibilité et/ou la spécificité de ces techniques classiques étant problématiques, le développement de techniques hautement sensibles et spécifiques pour détecter le parasite dans le mollusque s'est révélé nécessaire (Kaplan et al., 1995).

5.2.2 Techniques de biologie moléculaire

En 1982 déjà, l'électrophorèse enzymatique, une technique biochimique, a été développée (van Aken, 1982). Trois années plus tard, une technique novatrice permettant l'amplification de

séquences d'ADN via une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été décrite pour la première fois (Saiki et al., 1985). Des techniques basées sur des sondes ADN ou ARN permettent aussi l'étude du génome de *Fasciola* spp. et l'élaboration de différents protocoles PCR, comme la PCR multiplex ou la PCR en temps réel. Récemment, une technique basée sur des anticorps monoclonaux se liant spécifiquement à certains antigènes du parasite a aussi été développée.

Van Aken a utilisé une application pratique de l'électrophorèse en couche mince d'amidon pour révéler les isoenzymes de la glucose phosphate isomérase (GPI) des stades larvaires de *F. hepatica* dans *G. truncatula* (van Aken, 1982; van Aken et Brandt, 1987). Les mollusques infestés sont broyés, homogénéisés individuellement avec une solution enzymatique stabilisatrice et placés par l'intermédiaire d'un coton dans les puits du gel polymérisé. Celui-ci est placé dans une cuve contenant un tampon phosphate et du papier Whatman. L'électrophorèse dure trois heures et une couche supplémentaire d'agarose contenant la solution révélatrice est versée sur le gel d'amidon. Une incubation à 37° C suit jusqu'à l'apparition des bandes (van Aken, 1982). Dans le cas de mollusques infestés avec un ou deux miracidia, la présence de larves peut être détectée mais pas avant 12 jours post-infestation. Quand cinq ou sept miracidia sont utilisées, il est possible de mettre l'infestation en évidence à partir du jour 5 (Cancrini et Iori, 2004). Aucune expérience concernant la spécificité n'a été réalisée dans le cadre de cette technique.

L'utilisation d'acides nucléiques dans le diagnostic d'infestation parasitaire est devenue de plus en plus fréquente (Hubscher, 1991; Barker, 1994; Weiss, 1995; Prichard, 1997; Gasser, 1999; Ndao, 2009; Vasoo et Pritt, 2013). L'ARN ou l'ADN peuvent être séparés sur la base de la taille et ensuite transférés sur une membrane de nylon et exposés à une sonde marquée spécifiquement. Cette sonde se lie avec une séquence similaire. Cette technique dans laquelle un simple brin d'ADN s'hybride à un autre simple brin d'ADN suite à une électrophorèse s'appelle un *southern blot*. L'ADN peut provenir d'ARN par une réaction de transcription inverse et est appelé ADN complémentaire (ADNc). Au début des années 1990, des sondes d'acides nucléiques provenant d'ADN ribosomal (ADNr) de *F. hepatica* ont été synthétisées dans le but d'identifier le parasite au sein de *Pseudosuccinea columella* expérimentalement infestées (Shubkin et al., 1992). Une séquence (CS4) de 20 paires de base (pb) spécifique de *F. hepatica* a été ainsi identifiée et utilisée dans un *southern blot*. La technique a ensuite été améliorée et a montré une limite de détection de 10 fg (soit 10⁻¹⁵ g), ce qui a permis l'identification de mollusques infestés du premier

au 37^{ème} jour post-infestation (Rognlie et al., 1994) au sein des lots de 25 mollusques (Rognlie et al., 1996). Ce test est spécifique de la famille des *Fasciolidae* (Rognlie et al., 1994).

La première technique basée sur le transfert d'ADN a mis en évidence trois sondes spécifiques de *F. hepatica* (Heussler et al., 1993). Deux années plus tard, une équipe américaine mettait en évidence une séquence de 124 pb spécifique de *F. hepatica* suite à la construction d'une banque génomique (Kaplan et al., 1995). Suite à l'amélioration de la technique, 1 ng d'ADN génomique du parasite était détectable dans le mollusque et ce, immédiatement après l'infestation amenant ainsi la sensibilité à l'unité biologique minimale du parasite (un miracidium) (Kaplan et al., 1997). Des bandes à différentes hauteurs (multiples de 124 bp) sont observables sur le gel d'électrophorèse du fait de la nature répétitive de la séquence de 124 pb chez *F. hepatica* (séquence microsatellite) dans les mollusques infestés. La technique ne permet cependant pas de différencier une infestation par *F. hepatica* et *F. gigantica* ce qui peut être problématique dans des régions où les deux parasites co-existent (Krämer et Schnieder, 1998; Krämer, 1999).

La PCR permet d'amplifier de façon très spécifique de très petites quantités d'ADN ou d'ARN. Plusieurs équipes de recherche ont utilisé les recherches de Kaplan pour élaborer des protocoles basés sur la PCR et ont confirmé l'utilité de cet outil pour des infestations naturelles ou expérimentales (Krämer et Schnieder, 1998, 1999; Mostafa et al., 2003; Velusamy et al., 2004; Kozak et Wedrychowicz, 2010). On notera qu'une PCR classique a été développée dans le cadre de ma thèse (**étude 1**) et qu'elle est utilisée dans le chapitre 3. Par exemple en Egypte, la séquence de 124 pb a été amplifiée dès une heure après l'infestation de *Lymnaea natalensis* par un seul miracidium de *F. gigantica* et ceci avec une bonne spécificité (Mostafa et al., 2003). Une région de 405 pb de la COX-1 du parasite a aussi été utilisée dans le cadre d'un protocole PCR avec une limite de détection de 10 pg d'ADN de *F. hepatica* (Cucher et al., 2006; Relf et al., 2009). Toutefois, des inhibitions de PCR ont été rencontrées. Une équipe suédoise a amplifié quant à elle la région ITS-2 de *F. hepatica* (Novobilsky et al., 2013), une autre équipe égyptienne utilisait la région ITS-1 pour détecter *F. gigantica* (Grabner et al., 2014) et une équipe vietnamienne a utilisé les deux régions ITS (Kim et al., 2014).

Une technique PCR particulière PCR-RFLP (pour *restriction fragment length polymorphism*) a été développée en Iran (Imani-Baran et al., 2012). Celle-ci consiste à réaliser une PCR classique (amplification de l'ADNr 28S) et à digérer l'ADN amplifié par des enzymes de restriction.

L'analyse du profil des bandes obtenues conduit à la détection des mollusques infestés par *F. gigantea*.

La PCR multiplex amplifie pour sa part plusieurs séquences dans le même tube et en même temps. Cette technique nécessite autant de paires d'amorces qu'il y a de séquences à amplifier. De l'ADN mitochondrial a été utilisé dans une PCR multiplex pour identifier des stades larvaires de *F. hepatica* dans des mollusques infestés au Brésil (Magalhaes et al., 2004). Une paire d'amorces a été utilisée pour des mollusques expérimentalement infestés par *Fasciola* spp. en même temps qu'une autre paire d'amorces qui amplifiait la région ITS-2 de l'ADNr du trématode et du mollusque, agissant ainsi comme un contrôle interne (Magalhaes et al., 2004). Cette technique a permis la détection d'un seul miracidium de *F. hepatica* en présence d'ADN de mollusque dès le premier jour post-infestation et ce, de façon spécifique. La technique a aussi été améliorée et a permis l'identification de *F. hepatica* dans des coupes histopathologiques de mollusques infestés (Magalhaes et al., 2008). On notera qu'une PCR multiplex a aussi été développée dans le cadre de ma thèse (**étude 2**) et qu'elle est reprise dans le chapitre 3. A Cuba, une technique très similaire à cette dernière a été publiée récemment : un fragment de la région ITS-2 du parasite est amplifié ainsi qu'un segment conservé de l'ADN ribosomal du mollusque qui intervient comme un contrôle interne (Alba et al., 2015b). La limite de détection a été établie à 100 pg d'ADN du parasite. Il y a peu de temps, une PCR multiplex a été développée en Espagne et permet l'identification précoce et en une étape d'une infestation de *G. truncatula* par *F. hepatica* et/ou *Calicophoron (Paramphistomum) daubneyi* par l'amplification d'ADN mitochondrial (ADNm). La technique est sensible (limite de détection de 1 pg d'ADN de *F. hepatica*), précoce (dès le premier jour post-infestation), spécifique et permet l'analyse des mollusques par lots (Martinez-Ibeas et al., 2013). En Thaïlande, une PCR multiplex a aussi été développée pour amplifier l'ADN de *F. gigantea* (codant pour la cathepsine) et l'ADNr 16S du mollusque (Kaset et al., 2010). La technique a été confirmée par un *western blot* qui a consisté ici à faire réagir un anticorps anti-cathepsine sur une membrane de nylon où avait été transféré l'ensemble des protéines d'un mollusque infesté.

La PCR quantitative en temps réel est basée entre autres sur l'activité exonucléase 5'-3' de la polymérase ADN Taq qui conduit à la cassure d'une sonde TaqMan fluorescente pendant la PCR ; l'intensité de la fluorescence est ensuite mesurée par un système de détection puisque celle-ci est proportionnelle à la quantité de produit PCR formé. Assez récemment, une technique PCR

quantitative en temps réel a été développée et évaluée pour des *G. truncatula* expérimentalement infestées par *F. hepatica* en Suisse (Schweizer et al., 2007). La sensibilité de la technique n'a pas été évaluée.

La technique LAMP semble être une technique novatrice intéressante bien que pas encore appliquée à la détection de trématode chez l'hôte intermédiaire (Tavares et al., 2011). Cette technique est aussi une méthode basée sur l'amplification d'ADN mais toute la réaction a lieu à la même température. Elle utilise quatre amorces spécialement élaborées pour reconnaître six séquences différentes sur le gène cible. Une réaction positive se marque par l'apparition d'une turbidité visible à l'œil nu et qui peut être quantifiée. Cette technique permet la différenciation entre *F. hepatica* et *F. gigantica* (Ai et al., 2010).

Une autre technique qui n'appartient pas à la biologie moléculaire a été développée récemment et utilise des anticorps monoclonaux (Alba et al., 2015a). Il s'agit d'un ELISA sandwich où les antigènes du parasite éventuellement contenus dans un extrait de mollusque se retrouvent liés entre des anticorps monoclonaux spécifiques des rédies de *F. hepatica* et des anticorps monoclonaux liés à de la *Horse Radish Peroxydase* (HRP).

5.2.3 Avantages et inconvénients des différentes techniques

Le **Tableau III** reprend les avantages et les inconvénients des différentes techniques utilisées pour étudier la présence de *Fasciola* spp. chez l'hôte intermédiaire. Si l'écrasement est particulièrement bien adapté pour détecter les infestations naturelles de mollusques collectés sur le terrain, son utilisation est limitée à l'évaluation de la prévalence de l'infestation. La dissection des mollusques est la meilleure technique en cas d'infestation expérimentale d'escargots car elle permet l'évaluation du taux d'infestation et, dans une moindre mesure, de l'intensité de l'infestation et de la production de métacercaires. L'analyse histologique prend beaucoup de temps et est assez coûteuse mais cela permet une évaluation précise des formes larvaires dans le mollusque. L'excrétion des cercaires a une valeur limitée puisqu'elle ne donne que des informations sur la dynamique d'excrétion pour des mollusques infestés naturellement ou expérimentalement.

Tableau III – Avantages et inconvénients des différentes techniques utilisées pour étudier la présence de *Fasciola* spp. chez l’hôte intermédiaire.

	Intérêt de chaque technique (de 0 à +++) pour déterminer :						
	Prévalence de l’infection	Intensité de l’infection	Production de métacercaires	Sensibilité	Spécificité	Facilité	Coût
Ecrasement^a	+++	+	0/+	+	+	+++	+
Dissection^b	+++	++	++	+	++	++	+
Excrétion des cercaires^c	+	+	+++	++	+	+	+
Techniques histologiques^d	++	+++	0	++	++	+	+
Electrophorèse enzymatique^e	+++	0	0	+	Pas de données	+++	+
Transfert d’ARN^f	+++	+	0	+++	++	+	+++
Transfert d’ADN^g	+++	++	0	+++	++	++	+++
PCR classique^h	+++	0	0	+++	+++	+++	++
PCR-RFLPⁱ	+++	0	0	+++	+++	++	++
PCR multiplex^j	+++	0	0	+++	++	++	++
PCR en temps réel^k	+++	No data	0	+++	++	+	+++
ELISA^l	+++	0	0	+++	++	+	++

^a(Dreyfuss et al., 2005) ; ^b(Abrous et al., 1999; Abrous et al., 2000) ; ^c(Vignoles et al., 2002a) ; ^d(Rondelaud et Barthe, 1982, 1987) ; ^e(van Aken, 1982; van Aken et Brandt, 1987) ; ^f(Shubkin et al., 1992; Rognlie et al., 1994; Rognlie et al., 1996); ^g(Heussler et al., 1993; Kaplan et al., 1995, 1997); ^h(Krämer et Schnieder, 1998; Mostafa et al., 2003; Velusamy et al., 2004; Cucher et al., 2006; Relf et al., 2009; Kozak et Wedrychowicz, 2010; Novobilsky et al., 2013; Grabner et al., 2014; Kim et al., 2014); ⁱ(Imani-Baran et al., 2012); ^j(Magalhaes et al., 2004; Magalhaes et al., 2008; Kaset et al., 2010; Alba et al., 2015b); ^k(Heussler et al., 1993; Schweizer et al., 2007) ; ^l(Alba et al., 2015a).

L'électrophorèse enzymatique sur gel d'amidon est une technique biochimique très simple, très économique et qui peut être utilisée par des laboratoires modestes pour une sélection préliminaire d'hôtes intermédiaires potentiels dans un contexte épidémiologique particulier mais la mise en place du test peut être laborieuse (choix de l'enzyme, température, révélation chimique). La spécificité et la sensibilité de la technique sont limitées en comparaison avec les techniques basées sur l'ADN ou l'ARN et, en conséquence, cette technique n'est plus utilisée actuellement.

Les techniques de transfert ne sont pas simples et nécessitent un équipement cher (incubateur, système de révélation radiologique ou chimique, appareil PCR) puisqu'elles imposent l'utilisation de sondes chimioluminescentes (digoxigénine) ou marquées radioactivement (^{32}P). De nombreuses étapes (qui augmentent le risque de contamination) sont nécessaires: extraction d'ADN ou d'ARN, transcription inverse si nécessaire, PCR, transfert, hybridation, ce qui rend la technique chronophage (au moins un jour). Toutefois, la quantification du signal est possible et le coût (solutions, réactifs, enzymes, consommables) a été évalué entre 0,22 et 0,24 € par échantillon (Kaplan et al., 1995).

Les techniques de biologie moléculaire sont basées sur les acides nucléiques et l'extraction de l'ADN ou de l'ARN est toujours la première étape. Celle-ci doit être rapide, bon marché, ne doit pas utiliser de produits toxiques, et doit être réalisable rapidement durant de grandes études épidémiologiques. Ce n'est pas le cas du protocole d'extraction classique basé sur la protéinase K et le phénol-chloroforme qui nécessite de nombreuses étapes, une nuit d'incubation et l'utilisation de substances toxiques.

L'avantage principal de la PCR est sa haute sensibilité et spécificité contrairement aux sondes ADN parce que la séquence amplifiée est toujours précisément ciblée par les amorces. La technique nécessite néanmoins l'utilisation d'un appareil PCR pas toujours bon marché. Un autre inconvénient de la PCR est la possibilité de faux négatifs (inhibiteur de PCR) ou de faux positifs (contaminants) mais l'utilisation d'albumine sérique de bovin ou d'un contrôle interne peut résoudre respectivement ces problèmes (Magalhaes et al., 2004; Cucher et al., 2006). La réaction PCR prend entre trois et quatre heures et beaucoup de kits commerciaux sont disponibles sur le marché. La révélation par électrophorèse prend approximativement deux heures.

Concernant les mollusques infestés par *F. hepatica*, différents types d'acides nucléiques peuvent être amplifiés par PCR. Premièrement dans les cellules en croissance, l'ARNr est l'acide nucléique le plus abondant, à tel point qu'une amplification par PCR n'est pas forcément

nécessaire (Shubkin et al., 1992). L'ADN ou l'ARN ribosomal contiennent des séquences hautement répétées ; la sensibilité est haute mais la spécificité peut être réduite parce que les séquences répétées tendent à être conservées entre les espèces proches (Waters et McCuthan, 1990). Deuxièmement, les séquences d'ADN répétitif sont intéressantes parce qu'elles sont souvent présentes en nombre important. De plus, ces séquences évoluent plus rapidement que les séquences codantes faisant d'elles d'excellentes candidates pour des sondes spécifiques d'espèces (McLaughlin et al., 1987). Troisièmement, les séquences spécifiques d'ADN génomique sont hautement spécifiques pour une espèce donnée (COX-1, ITS-1 ou 2 par exemple). Alors que la spécificité est haute, la sensibilité peut être plus basse quand elle est comparée aux séquences hautement répétées. Cependant, la PCR peut dépasser un manque de sensibilité en amplifiant fortement la séquence d'intérêt (Prichard, 1997).

La PCR en temps réel est difficile à mettre en place expérimentalement à cause, par exemple, de la construction de la sonde TaqMan, de l'optimisation du E_{PCR} ou de l'interprétation des résultats. Les coûts de la sonde et de l'appareil permettant la détection de la fluorescence peuvent paraître rédhibitoires. Néanmoins, cette technique permet la quantification du nombre d'acides nucléiques présents dans l'échantillon et elle ne nécessite pas une étape de détection des produits d'amplification puisque l'amplification et la détection sont réalisées simultanément.

La technique LAMP semble être très prometteuse du fait de son coût limité et de la rapidité de la réaction, néanmoins la mise en place de la technique et notamment la construction des amorces est complexe.

La technique ELISA semble intéressante mais relativement lourde à mettre en place dans la mesure où un équipement conséquent (spectrophotomètre, étuve) et des réactifs biologiques complexes (anticorps monoclonaux) sont nécessaires.

En conclusion, la technique idéale de mise en évidence de *Fasciola* spp. au sein des mollusques n'existe pas parce que chaque technique répond à des questions différentes et est donc complémentaire. Peu d'études analysent le niveau d'infection de mollusques par *F. hepatica* à l'aide de techniques moléculaires suite à des prélèvements sur le terrain (Rognlie et al., 1996; Kaplan et al., 1997; Cucher et al., 2006; Schweizer et al., 2007; Novobilsky et al., 2013; Novobilsky et al., 2014) et encore moins comparent les résultats avec des techniques microscopiques (Kaplan et al., 1997; Cucher et al., 2006). La PCR tend à être considérée comme

le *golden standard* grâce à sa grande sensibilité et spécificité. Néanmoins, la quantité minimale d'ADN de *Fasciola* spp. dans un mollusque correspond à celle contenue dans un miracidium (1 ng) (Kaplan et al., 1995) et celle-ci constitue donc la seule limite minimale utile. De plus, il faut noter que cette technique ne donne pas d'information sur la viabilité des parasites. Ainsi, la présence d'ADN du parasite dans un mollusque ne signifie pas que ce mollusque est capable d'héberger tout le cycle du parasite menant à l'excrétion de cercaires infestantes. Force est donc de constater qu'à l'heure actuelle, il n'existe pas de technique simple, robuste, reproductible et suffisamment bon marché pour analyser de grands échantillons de mollusques prélevés sur le terrain (> 1000). Comme la PCR détecte précisément l'invasion parasitaire et que l'examen microscopique révèle le succès de l'infestation, les deux techniques doivent être couplées pour fournir une compréhension globale de la situation épidémiologique dans une région particulière pour analyser la compétence et la capacité vectorielle de différents hôtes intermédiaires potentiels de *Fasciola* spp.

5.3. *En Belgique et en Europe tempérée*

On notera ici que si *G. truncatula* peut être trouvée en altitude jusqu'à 2600 m en Europe, *F. hepatica* se trouve typiquement dans les plaines et n'est jamais retrouvée à de hautes altitudes dans ces régions (Mas-Coma et al., 2001).

5.3.1 *Galba truncatula*

En Europe tempérée, *G. truncatula* (ou limnée tronquée) joue le rôle d'hôte intermédiaire communément admis de *F. hepatica* (Torgerson et Claxton, 1999) (**Figure 9**). Ses habitats sont multiples et se situent essentiellement à l'extrémité périphérique des réseaux hydrographiques (Rondelaud et al., 2009) et sur un terrain argileux. On peut néanmoins distinguer des gîtes permanents et des gîtes temporaires. Par exemple, dans le centre de la France, les gîtes sont des prairies marécageuses, des jonchaies de pente, des fossés, des empreintes des onglons de bovins ou de roues de tracteur ou encore des berges de rivière et d'étang (**Figures 14, 15 et 16**). En effet, *G. truncatula* apprécie la succession de périodes d'inondation et de sécheresse (Kendall et Ollerenshaw, 1963; Over, 1982).



Figure 14 – Biotopes à limnées. A : Zone humide dans une pâture ; B : Berges d'un petit ruisseau ; C : Traces de roues de tracteur ; D : Berges autour d'une mare.



Figure 15 – Biotopes à limnées. A : Fossé de drainage ; B : Abreuvoir.



Figure 16 – Deux limnées tronquées adultes (*G. truncatula*) en surface d'une zone humide argileuse.

Certaines plantes sont indicatrices de sa présence comme par exemple le jonc à fleurs aiguës (*Juncus acutiflorus*), le cresson de fontaine (*Nasturtium officinale*), et les renoncules (*Ranunculus* spp.) (Rondelaud et al., 2011). Ce mollusque est tolérant en ce qui concerne la composition minérale de l'eau : il « aime » l'eau douce à moyennement douce (31-120 mg/l de CaCO₃). Il se nourrit en élevage de salade lysée bien que de la nourriture pour poisson en paillettes (Tetraphyll®) puisse être utilisée (Rondelaud et al., 2002). Son optimum thermique est de 20° C. Cette espèce est amphibie, hermaphrodite et peut, selon les conditions climatiques, donner

naissance annuellement à une, deux ou trois générations (Leimbacher, 1978; Rondelaud et Dreyfuss, 1997). Dans la plupart des cas, une première période de ponte est observée au printemps et une autre à la fin de l'été.

Le mollusque adulte mesure sept à neuf mm de haut, est sexuellement mature en trois à quatre semaines (Kendall, 1953; Kendall et Ollerenshaw, 1963) et sa durée de vie est de 12 à 14 mois (Over, 1982). L'infestation par *F. hepatica* a été détaillée sur le plan histologique seulement pour *G. truncatula*. Les viscères des mollusques infestés montrent une nécrose épithéliale multifocale ou généralisée. On trouve aussi des lacunes en forme de tunnel, des granulomes fibro-amœbocytaires dans le pied et des zones d'hypertrophie de la couche musculaire sous-épithéliale au niveau du manteau (Rondelaud et Barthe, 1978; Diawara et al., 2003).

Les tableaux suivants reprennent quelques prévalences observées chez *G. truncatula* lors d'infestations naturelles (**Tableau IV**) et expérimentales (**Tableau V**). On constate, par exemple, que dans le centre de la France (Limousin), la prévalence globale de l'infestation naturelle de *G. truncatula* par *F. hepatica* (évaluée par écrasement) est de 1,1 % (Rondelaud et al., 2001a). Son infestation expérimentale en laboratoire mène à des prévalences beaucoup plus importantes : 67,8 % des limnées tronquées étaient ainsi infestées lors d'une étude réalisée en 2004 (Belfaiza et al., 2004a). Cependant, il faut noter que pour une même espèce, d'importantes variations existent (Rondelaud, 1993). Ainsi, la prévalence pour sept populations différentes de *G. truncatula* infestées expérimentalement s'est révélée très variable : entre 5 et 80 % (Rondelaud et al., 2004a).

Tableau IV – Infestations **naturelles** de *Galba truncatula*.

Prévalence (effectifs)	Technique	Région	Références
2-20 % (52000)	Dissection	Angleterre	(Ollerenshaw, 1971)
5,1 % (18791)	Dissection	France	(Mage et al., 2002)
7 % (4733)	PCR en temps réel	Suisse	(Schweizer et al., 2007)
11,4 % (5486)	Dissection	Espagne	(Manga-Gonzalez et al., 1991)
13,8 % (974)	PCR	Irlande	(Relf et al., 2009)
14,3 % (291)	Dissection	Russie (Moscou)	(Villavicencio et al., 2006)
26,6 % (192)	PCR	Pologne	(Kozak et Wedrychowicz, 2010)

Tableau V - Infestations **expérimentales** de *Galba truncatula*.

Prévalence	Effectifs	Technique	Taux de survie (30 J PE)	Références
30 % - 63 %	100	Dissection	60 % - 65 %	(Abrous et al., 2001)
58,6 % (150) - 72,1 % (100)	150 - 100	Excrétion cercaire	30,6 % – 61 %	(Sanabria et al., 2013)
71,8 % – 86,6 %	50	Excrétion cercaire	64 % - 90%	(Rondelaud et al., 2004a)
80,9 %	200	Excrétion cercaire	85 %	(Rondelaud et al., 2009)

On notera que si les infestations expérimentales présentent des prévalences nettement plus élevées que les infestations naturelles, plusieurs facteurs contribuent à faire varier celles-ci : le nombre de miracidium utilisés, la taille des mollusques à l'infestation, les conditions d'élevage (température, luminosité, nourriture, ...) étant autant de formes de stress, ainsi que l'origine (hôte définitif) des œufs par exemple. En effet, en accord avec la théorie de l'adaptation locale (et l'hypothèse de la reine rouge), les parasites sont plus efficaces quand ils infestent des populations locales de mollusques (sympatrique) que quand ils infestent des populations d'hôtes d'origine étrangère (allopatrique) (Greischar et Koskella, 2007; King et al., 2011). Dans le cas de la douve du foie, cette adaptation locale résulte en une meilleure survie des mollusques infestés, une prévalence d'infestation élevée et un nombre important de cercaires (Boray, 1966, 1969). Mais ce n'est pas toujours le cas. En effet, des infestations allopatriques ont conduit à des prévalences plus basses, des périodes patentes plus longues et des excrétions de métacercaires plus élevées que lors d'infestations sympatriques (Sanabria et al., 2013) ce qui pourrait être problématique en cas d'importation de bovins parasités (Gasnier et al., 2000). Ce mécanisme adaptatif pourrait être à l'origine de l'infestation de nouvelles populations d'hôtes intermédiaires inhabituels (Sanabria et al., 2013).

Le mollusque peut aussi être co-infesté et notamment par un autre parasite digène d'importance vétérinaire : *C. daubneyi*. Les co-infestations (ou double infestation) naturelles sont cependant relativement rares (0,4 %) (Rondelaud et al., 2004b). Des co-infestations expérimentales ont été réalisées et ont aussi montré que les mollusques présentant les deux digènes vivants étaient en faible nombre (Augot et al., 1996; Abrous, 1999).

5.3.2 Autres espèces de mollusques potentiellement impliquées

Bien que *G. truncatula* joue ce rôle en Europe tempérée, il semble que d'autres espèces de limnées puissent être impliquées comme hôtes intermédiaires alternatifs (Boray, 1969) (**Figure 9**). Globalement, une vingtaine d'espèces de *Lymnaeidae* ont été décrites comme hôtes intermédiaires potentiels de *Fasciola* spp. (Torgerson et Claxton, 1999). En Europe, plusieurs espèces peuvent héberger les stades larvaires de *F. hepatica* et ceci sous conditions naturelles ou expérimentales. Ces espèces appartiennent aux genres *Lymnaea* (Boray, 1966; Furmaga et Gundlach, 1967b, a, 1969; Dreyfuss et al., 2000a; Dreyfuss et al., 2002), *Omphiscola* (Sindou et

al., 1991; Abrous et al., 1996; Abrous et al., 1998a, 1999; Vignoles et al., 2002b; Dreyfuss et al., 2007), Stagnicola (Novobilsky et al., 2013), Pseudosuccinea (Pointier et al., 2007), et Radix (Boray, 1966, 1967; Furmaga et Gundlach, 1969; Dreyfuss et al., 2000b; Dreyfuss et al., 2002; Vignoles et al., 2002b; Relf et al., 2009). Ces observations suggèrent qu'un nombre important d'espèces différentes peut servir d'hôtes potentiels pour les stades larvaires de *F. hepatica*.

Les changements fréquents de nomenclature au sein de la famille des *Lymnaeidae* ne simplifient pas l'analyse de la compétence et de la capacité vectorielle de ces mollusques. Les deux tableaux suivants (**Tableau VI et VII**) reprennent les données postérieures à 1950 obtenues lors d'infestations naturelles ou expérimentales de différentes espèces appartenant à la famille des *Lymnaeidae* hors *G. truncatula*. Les mollusques ont été identifiés morphologiquement ce qui est problématique pour le complexe d'espèces « *R. peregra* ». Une seule étude a identifié cette espèce par voie moléculaire (Relf et al., 2009). On notera que des infestations naturelles ont été signalées chez d'autres *Lymnaeidae* en Pologne (Czapski, 1962, 1965, 1968a, b) mais ces articles sont très peu accessibles.

En outre, des infestations naturelles ont été rapportées chez des mollusques appartenant à d'autres familles que les *Lymnaeidae* : les *Succinidae*, les *Planorbidae* et les *Physidae*. De l'ADN de *F. hepatica* a été amplifié récemment dans un mollusque infesté naturellement en Irlande et appartenant à la famille des *Succinidae* (*Stylommatophora*) à raison de 73,9 % (n = 17) (Relf et al., 2009). Jamais aucun mollusque appartenant à cette famille n'avait été décrit comme hôte intermédiaire éventuel de la douve du foie. De plus, l'identification morphologique n'a pas permis l'identification de l'espèce et l'identification moléculaire (basée sur la région 18S de l'ADNr) a abouti à un mollusque jamais décrit en Irlande (*Omalonyx matheroni*). De l'ADN de *F. hepatica* a aussi été amplifié chez *Succinea putris* (*Succinidae*) en Suède à hauteur de 2,3 % (1/42) (Novobilsky et al., 2014). La douve du foie a aussi été détectée dans *Planorbis leucostoma* qui fait partie de la famille des *Planorbidae* (*Basommatophora*) avec une prévalence de 0,1 % dans le Limousin (France) (Rondelaud et al., 2001b; Dreyfuss et al., 2002). Des formes larvaires précoces de *F. hepatica* (sporocyste) ont été détectées chez *Physa acuta* (*Physidae* Basommatophore) dans des cressonnières en France (Limousin) à raison de 0,6 % (3/301) et 0,9 % (2/209) (Dreyfuss et al., 2002).

Les infestations expérimentales allopatriques ont été exclues de même que les infestations expérimentales sans production de larves. De la même façon, les doubles infestations (*F.*

hepatica et *C. daubneyi* par exemple) n'ont pas été inclus dans le **tableau VI**. Toutefois, si elles sont tout à fait possibles naturellement (Abrous et al., 2000), elles ont aussi été réalisées expérimentalement pour *R. peregra*, *R. ovata*, *L. palustris*, *O. glabra*, *Ph. acuta* (*Physidae*) et *Pl. leucostoma* (*Planorbidae*) avec des résultats variables (Abrous et al., 1998a; Degueurce et al., 1999; Dreyfuss et al., 2002). Des infestations expérimentales de juvéniles (1 mm) de *Ph. acuta* ont été décrites et mises en évidence par dissection (sporocyste et rédïe de première génération) à des prévalences comprises entre 1,5 % (1/64) et 8 % (5/62) à 30 jours post-exposition (JPE) dans le Limousin (France) (Dreyfuss et al., 2002). Des essais d'infestations successives (exposition à deux miracidia à intervalle d'un jour) de *Ph. acuta* ont été menées jusqu'à quatre fois et la prévalence estimée par dissection (sporocyste et jeune rédïe immature) était comprise entre 5,4 % (2/37) et 20,8 % (5/24) à 30 JPE (Dreyfuss et al., 2002). Des infestations successives (de 1 à 3) ont aussi été réalisées chez *L. fuscus* et des prévalences de 2,6 % (1/38) à 25,7 % (17/66) ont été observées avec des taux de survie de 38 % à 66 % à 35 JPE respectivement (Dreyfuss et al., 2000a). On notera enfin que *Pseudosuccinea columella* n'a jamais été décrite en Belgique.

Tableau VI - Récapitulatif des infestations **naturelles** de *Lymnaeidae* en Europe.

Espèces	Espèces (nouvelle nomenclature)	Prévalences (effectifs)	Techniques	Régions	Références
<i>Lymnaea palustris</i>	<i>L. (Stagnicola) palustris</i>	0,14 % (668)	PCR	Suède	(Novobilsky et al., 2013)
<i>Radix peregra</i>	= <i>R. peregra</i> = <i>R. balthica</i>	10,3 % (8) – 61,1 % (22)	PCR	Irlande	(Relf et al., 2009)
<i>L. ovata</i>	<i>R. ovata</i>	8,5 % (47)	Dissection (rédiés)	France (Saône et Loire)	(Degueurce et al., 1999)
<i>L. ovata</i>	<i>R. ovata</i>	1,4 % (427)	Dissection	France (Limousin)	(Rondelaud et al., 2001b; Dreyfuss et al., 2002)
<i>L. glabra</i>	<i>Omphiscola glabra</i>	0,3 % (260)	Dissection	France (Limousin)	(Rondelaud et al., 2001a)
<i>O. glabra</i>	<i>O. glabra</i>	0,14 % (700) – 2,17 % (1700)	Dissection (cercaires)	France (Limousin)	(Dreyfuss et al., 2003)
<i>L. glabra</i>	<i>O. glabra</i>	12 % (50)	Dissection	France (Haute Vienne)	(Rondelaud et Dreyfuss, 1998)

Tableau VII - Récapitulatif des infestations **expérimentales** de *Lymnaeidae* en Europe ; n JPE : nombre de jours post-exposition ; AD : aucune donnée

Espèces	Espèces (nouvelle nomenclature)	Prévalences	Effectifs	Techniques	Taux de survie (n J PE)	Références
<i>Lymnaea. fuscus</i>	<i>L. (Stagnicola) fuscus</i>	13 %	100 (1-2 mm)	Excrétion de cercaires	78 % (30 JPE)	(Novobilsky et al., 2013)
<i>L. fuscus</i>	<i>L. (Stagnicola) fuscus</i>	46,2 %; 7,2 %	100 (1 ; 2 mm)	Dissection	67 %; 69 % (35 JPE)	(Dreyfuss et al., 2000a)
<i>L. fuscus</i>	<i>L. (Stagnicola) fuscus</i>	18 % ; 7 %	100 (1 ; 2 mm)	Excrétion de cercaires	66 % ; 71 % (35 JPE)	(Dreyfuss et al., 2000a)
<i>Lymnaea palustris</i>	<i>L. (Stagnicola) palustris</i>	51 %	100 (1-2 mm)	Excrétion de cercaires	69 % (30 JPE)	(Novobilsky et al., 2013)
<i>L. palustris</i>	<i>L. (stagnicola) palustris</i>	11,6 %	100 (1 mm)	Dissection (rédiés)	77 % (35 JPE)	(Degueurce et al., 1999)
<i>L. palustris</i>	<i>L. (Stagnicola) palustris</i>	44-55 %	100 (1-2 mm)	Dissection (rédiés)	20-25 % (77-92 JPE)	(Berghen, 1964)
<i>L. palustris</i>	<i>L. (Stagnicola) palustris</i>	90 % (sporocystes) 72 % (rédiés)	250 (1-2 mm)	Dissection	AD	(Boray, 1966)
<i>L. palustris</i>	<i>L. (Stagnicola) palustris</i>	7,72 %	220 (AD)	Dissection (des sporocystes aux cercaires)	78,5 % (30 JPE)	(Xavier et al., 1968)

Espèces	Espèces (nouvelle nomenclature)	Prévalences	Effectifs	Techniques	Taux de survie (n JPE)	Références
<i>L. palustris</i>	<i>L. (Stagnicola) palustris</i>	18 %	500 (1-2 mm)	Dissection et excrétion de cercaires	64,4 % (30 JPE)	(Busson et al., 1982)
<i>L. palustris</i>	<i>L. (Stagnicola) palustris</i>	7 %	900 (nouveau-né)	Dissection	55,7 % (30 JPE)	(Sindou et al., 1991)
<i>L. palustris</i>	<i>L. (Stagnicola) palustris</i>	26,7 %; 5,4 %	100 (1 ;2 mm)	Dissection	71 %; 74 % (35 JPE)	(Dreyfuss et al., 2000a)
<i>L. palustris</i>	<i>L. (Stagnicola) palustris</i>	1,8 %	1000 (1 mm)	Etude histologique	36,1 % (49 JPE)	(Rondelaud et Barthe, 1978)
<i>L. stagnalis</i>	<i>L. stagnalis</i>	21,05-50 %	62-120 (1-2 mm)	Dissection (rédiés)	30,6 % – 18,3% (77 - 120 JPE)	(Berghen, 1964)
<i>L. stagnalis</i>	<i>L. stagnalis</i>	57,3 % (sporocystes) 10 % (rédiés)	100 (1-2 mm)	Dissection	AD	(Boray, 1966)
<i>L. stagnalis</i>	<i>L. stagnalis</i>	4,8 %	1638 (1-2 mm)	Dissection (cercaire)	88,6 % (63 JPE)	(Furmaga et Gundlach, 1967a, b)

Espèces	Espèces (nouvelle nomenclature)	Prévalences	Effectifs	Techniques	Taux de survie (n JPE)	Références
<i>L. stagnalis</i>	<i>L. stagnalis</i>	16,9 %	500 (1-2 mm)	Dissection et excrétion de cercaires	61,4 % (30 JPE)	(Busson et al., 1982)
<i>L. stagnalis</i>	<i>L. stagnalis</i>	37,8 % ; 4,3 %	100 (1 ; 2 mm)	Dissection et excrétion de cercaires	37 % ; 46 % (30 JPE)	(Dreyfuss et al., 2002)
<i>L. stagnalis</i>	<i>L. stagnalis</i>	16,1 %	100 (1 mm)	Dissection	31 % (30 JPE)	(Dreyfuss et al., 2002)
<i>L. glabra</i>	<i>Omphiscola glabra</i>	15,8 %	500 (1-2 mm)	Dissection et excrétion de cercaires	39,2 % (30 JPE)	(Busson et al., 1982)
<i>L. glabra</i>	<i>O. glabra</i>	42 %	110 (1 mm)	Dissection	55,7 % (30 JPE)	(Sindou et al., 1991)
<i>L. glabra</i>	<i>O. glabra</i>	56,4 %	100 (1 mm)	Dissection	39 % (49 JPE)	(Vignoles et al., 2002b)
<i>L. glabra</i>	<i>O. glabra</i>	1,8 %	1500 (1 mm)	Etude histologique	45,8 % (49 JPE)	(Rondelaud et Barthe, 1978)
<i>L. glabra</i>	<i>O. glabra</i>	30 %	50 (1-2 mm)	Dissection	(AD)	(Rondelaud et Dreyfuss, 1998)

Espèces	Espèces (nouvelle nomenclature)	Prévalences	Effectifs	Techniques	Taux de survie (n JPE)	Références
<i>Pseudosuccinea columella</i>	<i>P. columella</i>	100 %	26 (3-4 mm)	Dissection (rédié)	100 % (14 JPE)	(Pointier et al., 2007)
<i>P. columella</i>	<i>P. columella</i>	38,2 %	100 (4 mm)	Excrétion de cercaires	94 % (30 JPE)	(Vignoles et al., 2015)
<i>L. ovata</i>	<i>Radix ovata</i>	2,7 % - 43,7 %	100 (1 mm)	Dissection	37 % - 48 % (35 JPE)	(Dreyfuss et al., 2000b)
<i>R. ovata</i>	<i>R. ovata</i>	3 %	350 (AD)	Dissection (sporocyste)	AD	(Furmaga et Gundlach, 1969)
<i>L. peregra ovata</i>	<i>R. ovata</i>	87 %	61 (2 mm)	Dissection	55,7 % (30 JPE)	(Sindou et al., 1991)
<i>L. ovata</i>	<i>R. ovata</i>	9,3 %	100 (1 mm)	Dissection (rédiés)	75 % (35 JPE)	(Degueurce et al., 1999)
<i>L. ovata</i>	<i>R. ovata</i>	47,3 % ; 25 % ; 14,1 %	100 (1 ; 2 ; 4 mm)	Dissection et excrétion de cercaires	57 % ; 64 % ; 78 % (30 JPE)	(Dreyfuss et al., 2002)
<i>L. ovata</i>	<i>R. ovata</i>	23 %	100 (1 mm)	Dissection et excrétion de cercaires	39 % (30 JPE)	(Dreyfuss et al., 2002)

Espèces	Espèces (nouvelle nomenclature)	Prévalences	Effectifs	Techniques	Taux de survie (n JPE)	Références
<i>L. ovata</i>	<i>R. ovata</i>	36,5 %	100 (1 mm)	Dissection	52 % (49 JPE)	(Vignoles et al., 2002b)
<i>L. peregra</i>	= <i>R. peregra</i> = <i>R. balthica</i>	70 % (sporocyste, rédie) – 9 % (excrétion de cercaire)	700 (1-2 mm)	Dissection, excrétion de cercaires	AD	(Boray, 1969)
<i>L. peregra</i>	= <i>R. peregra</i> = <i>R. balthica</i>	40 %	500 (1-2 mm)	Dissection et excrétion de cercaires	51 % (30 JPe)	(Busson et al., 1982)
<i>L. p. peregra</i>	= <i>R. peregra</i> = <i>R. balthica</i>	29,4 %	50 (nouveau-né)	Dissection	68 % (30 JPE)	(Dreyfuss et al., 1997)

5.4. *En Equateur et en Amérique du Sud*

On précisera que, contrairement à ce qui se passe en Europe, la fasciolose peut se manifester à de très hautes altitudes (3800-4000 m) en Amérique du Sud puisque les populations locales de *G. truncatula* peuvent s'y multiplier (Mas-Coma et al., 2001). *Fasciola gigantica* serait absente des Amériques du fait de l'absence de limnées du genre *Radix* qui font office d'hôtes intermédiaires de ce parasite (Bargues et al., 2001).

Les données concernant les hôtes intermédiaires de *F. hepatica* en Amérique du Sud et particulièrement en Equateur sont beaucoup plus rares et nettement moins disponibles qu'en Europe. Toutefois, des travaux récents fournissent des données au Brésil (Medeiros et al., 2014) et au Venezuela (Pointier et al., 2015). Actuellement, il est convenu que, excepté *L. rupestris* pour laquelle l'infestation par *F. hepatica* n'a jamais été clairement démontrée, sept espèces font office de vecteurs potentiels de la fasciolose dans la région néotropicale (Correa et al., 2010; Bargues et al., 2011a; Bargues et al., 2011c; Correa et al., 2011) : *L. diaphana*, *P. columella*, *G. cousini*, *G. viatrix*, *G. cubensis*, *G. neotropica* et *G. truncatula*. Récemment, Correa et al. (2010) ont montré sans ambiguïté la présence d'une autre espèce qu'ils ont appelé *Galba* sp. Des analyses complémentaires ont montré que cette espèce est similaire à *Galba (Lymnaea) schirazensis* (Bargues et al., 2011a). Comme déjà signalé, l'identification sur base morphologique des hôtes intermédiaires *Lymnaeidae* est très difficile du fait de la plasticité phénotypique environnementale de la forme de la coquille (Samadi et al., 2000; Pfenninger et al., 2006) et des caractéristiques anatomiques extrêmement homogènes (Correa et al., 2011). C'est le cas notamment pour des espèces phénotypiquement très proches (espèces sœurs ou complexe d'espèces ou *sibling species*) comme dans le groupe « *truncatula* » présentant de très fortes similarités morphologiques, c'est-à-dire : *G. truncatula*, *G. schirazensis*, *G. viatrix*, *G. neotropica* et *G. cubensis* (Pointier et al., 2006; Correa et al., 2011). On pourra le constater sur la **figure 17**. Cependant, les approches moléculaires basées sur l'ADN (reconstruction phylogénique et *barcoding*) parviennent à présent à distinguer une espèce de l'autre sans ambiguïtés.

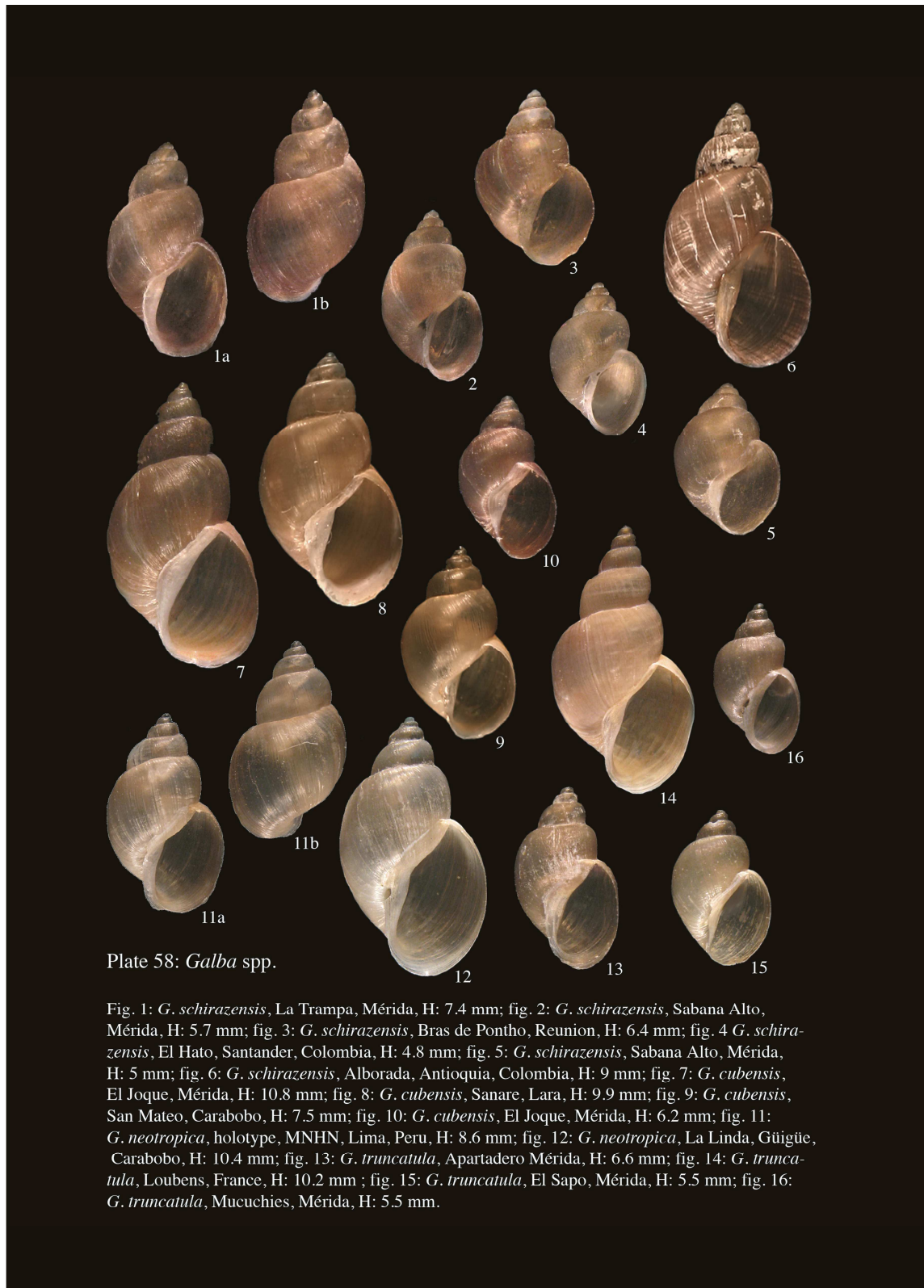


Figure 17 – Le genre *Galba* spp. au Venezuela (Pointier et al., 2015).

En Equateur, quelques espèces de limnées ont été observées : *G. cousini* (Paraense, 1995, 2004), *P. columella* (Paraense, 1982, 2004) et *G. schirazensis* (Bargues et al., 2011a) et seulement *G. cousini* s'est révélé naturellement infesté par *F. hepatica* dans ce pays (Villavicencio et Vasconcellos, 2005) avec une prévalence très importante de 31,43 % (22/70) ; en outre c'est aussi le cas pour *P. columella* au Brésil (Coelho et Lima, 2003) et en Argentine (Prepelitchi et al., 2003). La détection de *Fasciola* spp. dans l'hôte intermédiaire est réalisable grâce à différentes techniques (**étude 5**) et généralement, les techniques microscopiques sont choisies dans les pays en voie de développement parce qu'elles sont bon marché ; néanmoins, elles peuvent mener à des sous-estimations de la prévalence ou à des fausses identifications des formes larvaires. Très peu d'études ont utilisé des techniques basées sur l'ADN pour déterminer le statut parasitaire de mollusques naturellement infestés en Amérique du Sud (Cucher et al., 2006; Bargues et al., 2012). On constatera aussi que très peu d'infestations expérimentales de mollusques *Lymnaeidae* ont été réalisées sur ce continent. Bien qu'intervenant dans le cycle de la douve du foie, nous ne parlerons pas ici de *L. (Fossaria) humilis* ou *L. (Fossaria) bulimoides* du fait de leur répartition géographique en Amérique Centrale et en Amérique du Nord (Cruz-Mendoza et al., 2011). Le tableau ci-dessous reprend les prévalences observées lors d'infestations naturelles étudiées en Amérique du Sud (**Table VIII**) et le tableau suivant reprend un récapitulatif des infestations expérimentales de limnées en Amérique du Sud (**Table IX**).

Tableau VIII - Récapitulatif des infestations **naturelles** de *Lymnaeidae* en Amérique du Sud ; AD : Aucune donnée.

Espèces	Espèces (nouvelle nomenclature)	Prévalences (effectifs)	Techniques	Régions	Références
<i>Galba truncatula</i>	<i>G. truncatula</i>	31,6 % (AD)	(AD)	Bolivie (Tambillo)	(Bargues et al., 1995)
<i>G. truncatula</i>	<i>G. truncatula</i>	0,44 % (452)	PCR	Pérou (Tauripampa)	(Bargues et al., 2012)
<i>Lymnaea columella</i>	<i>Pseudosuccinea columella</i>	2,4 % (AD)	(AD)	Brésil (Rio de Janeiro)	(Rezende et al., 1973)
<i>L. columella</i>	<i>P. columella</i>	5,2 % (AD)	Microscopie	Brésil (Minas Gerais)	(Coelho et Lima, 2003)
<i>L. columella</i>	<i>P. columella</i>	1,22 % (AD)	(AD)	Brésil (São Polo)	(Ueta, 1980)
<i>L. columella</i>	<i>P. columella</i>	5,26 % (AD)	(AD)	Brésil (São Polo)	(Oliveira et al., 2002)
<i>L. columella</i>	<i>P. columella</i>	3,3 % (AD)	(AD)	Brésil (Rio Grande do Sul)	(Silva Santos et al., 1987)
<i>L. columella</i>	<i>P. columella</i>	8,8 % (500)	Microscopie	Argentine (Corrientes)	(Prepelitchi et al., 2003)
<i>L. columella</i>	<i>P. columella</i>	17,5 % (240) ; 51,3 % (240)	Microscopie ; PCR	Argentine (Corrientes)	(Cucher et al., 2006)
<i>L. cousini</i>	<i>G. cousini</i>	31,4 % (70)	Microscopie et infestation de rat	Equateur (Machachi)	(Villavicencio et Vasconcellos, 2005)

Espèces	Espèces (nouvelle nomenclature)	Prévalences (effectifs)	Techniques	Régions	Références
<i>L. neotropica</i>	<i>G. neotropica</i>	1,49 % (67)	Microscopie	Argentine (Lujan de Cuyo)	(Mera y Sierra et al., 2009)
<i>L. viatrix</i>	<i>G. viatrix</i>	0,67 % (1633)	Excrétion de cercaires et infestation de rat	Argentine (Patagonia)	(Kleiman et al., 2007)
<i>L. viatrix</i>	<i>G. viatrix</i>	2,9 % (34) ; 61,8 % (34)	Microscopie ; PCR	Argentine (San Luis)	(Cucher et al., 2006)
<i>L. viatrix</i>	<i>G. viatrix</i>	0,9 % (811)	Microscopie et infestation de rat	Argentine (Chubut)	(Kleiman et al., 2004)

Tableau IX - Récapitulatif des infestations **expérimentales** de *Lymnaeidae* en Amérique du Sud ; n JPE : nombre de jour post-exposition ; AD : aucune donnée

Espèces	Espèces (nouvelle nomenclature)	Prévalences	Effectifs	Techniques	Taux de survie (n J PE)	Références
<i>Lymnaea columella</i>	<i>Pseudosuccinea columella</i>	82,2 %	100 (1-2 mm)	Microscopie	50 % (70 JPE)	(Salazar et al., 2006)
<i>P. columella</i>	<i>P. columella</i>	93,3 %	30 (1 mm)	Microscopie	10 % (70 JPE)	(Gutierrez et al., 2002)
<i>Fossaria cubensis</i>	<i>Galba cubensis</i>	66,6 %	30 (1 mm)	Excrétion de cercaires	(AD)	(Gutierrez et al., 2000)
Espèces	Espèces (nouvelle nomenclature)	Prévalences	Effectifs	Techniques	Taux de survie (n J PE)	Références
<i>L. truncatula</i>	<i>G. truncatula</i>	39,1 %	25 (4-5 mm)	Excrétion de cercaires et infestation de rat	92 % (49 JPE)	(Mas-Coma et al., 2001)
<i>L. cousini</i>	<i>G. cousini</i>	34 %	100 (2-4 mm)	Microscopie	90 % (70 JPE)	(Salazar et al., 2006)

CHAPITRE 2 : OBJECTIFS ET PLAN DE TRAVAIL

Le déclin de la biodiversité à l'échelle mondiale est reconnu à l'heure actuelle comme un des défis majeurs auquel l'humanité doit faire face (UN-CBD, OJ L309). En Europe, la conservation de la biodiversité possède désormais une base légale pour agir à l'échelle de la Communauté sous forme des directives COM(1998)0042, 79/409/EEC et 92/43/EEC. Ainsi, c'est dans le cadre du programme international BIOMAN financé par l'Union Européenne et du projet MANSCAPE (BELSPO EV/29) que la faune malacologique belge et sa capacité vectorielle ont été étudiées. Ce projet en réseau MANSCAPE est défini comme un « Outil pour la gestion intégrée des petits bassins d'eau dans les paysages agricoles » et a fait intervenir cinq partenaires dont la Faculté de Médecine Vétérinaire de Université Liège, les Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix de Namur, l'Université Catholique de Louvain, l'Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique et l'Université de Gand pendant l'été 2003 et le printemps 2004. Cette étude a porté sur plus de 125 mares et les mollusques prélevés dans chaque mare ont été identifiés puis examinés par PCR et par *southern blot* afin d'y détecter la présence de *Fasciola* spp. Les résultats ont révélé que des espèces de mollusques autres que *G. truncatula* pouvaient héberger *F. hepatica* en Belgique. Ces résultats ont fait l'objet de mon Travail de Fin d'Etude (TFE) (Caron, 2004). Néanmoins, la compétence et la capacité vectorielle de ces mollusques dans le cycle de *F. hepatica* devaient être vérifiées *in vitro*. Ainsi, c'est dans le cadre du Master Complémentaire en Médecine Vétérinaire Orientation Vétérinaire que cette étape a été réalisée. Trois espèces de *Lymnaeidae* ont été élevées au laboratoire et ont été infestées expérimentalement. Les infestations expérimentales ont été suivies et évaluées par des techniques de microscopies et de biologie moléculaire. Le potentiel infestant des parasites issus des différents hôtes intermédiaires a ensuite été vérifié chez le rat. Ces études qualitatives ont ainsi montré que d'autres mollusques *Lymnaeidae* que *G. truncatula* pouvaient intervenir dans le cycle de la douve du foie en Belgique (**étude 1**). L'étape suivante nécessitait la mise au point d'outils moléculaires permettant une analyse sensible et spécifique de grands échantillons de mollusques. Ces outils devaient en plus être bon marché, dépourvus de risques pour le manipulateur et fournir rapidement un résultat (**étude 2**). Ces techniques ont ensuite été appliquées à grande échelle en Belgique en 2008 dans le cadre du projet de recherche PONDSCAPE (BELSPO SD/BD/02A) « Vers une gestion durable de la diversité des mares au niveau du paysage » qui se voulait être la continuité du projet MANSCAPE (**étude 3**). Une application de ces techniques a aussi été possible dans le cadre d'une mission scientifique

financée par la Fondation Huynen en 2013 dans un contexte de transfert de technologies vers l'Equateur (**étude 4**).

Il a donc été question dans ce travail de répondre successivement à plusieurs objectifs :

- D'autres mollusques *Lymnaeidae* que *G. truncatula* interviennent-ils dans l'épidémiologie de *F. hepatica* en Belgique ?
- Les infestations expérimentales de ces mollusques confirment-elles une implication dans le cycle du parasite (**étude 1**) ?
- Est-il possible d'optimiser l'extraction d'ADN et une technique PCR pour pouvoir analyser de grands échantillons de mollusques (**étude 2**) ?
- Quel est le poids épidémiologique de ces espèces en Belgique (**étude 3**) ?
- Les techniques employées sont-elles exportables dans un autre contexte épidémiologique et peuvent-elles apporter des informations utiles (**étude 4**) ?

En plus de ces quatre études, ce travail a aussi été l'occasion de nouer de nombreuses collaborations internationales qui ont fait l'objet de plusieurs publications. Celles-ci ne rentrant pas pleinement dans le cadre de ce travail de doctorat, elles ont été ajoutées en annexe. Il s'agit d' :

- une revue reprenant les différentes techniques microscopiques et moléculaires pour détecter une infestation parasitaire chez des mollusques, revue qui a été largement reprise dans l'introduction (**étude 5**) ;
- une collaboration avec l'étudiante en thèse *Souad Righi* de l'Institut des Sciences Vétérinaires d' El Tarf (Algérie) (**étude 6**) ;
- une collaboration avec *Johannes Charlier* de l'Université de Gand (**étude 7**) ;
- une collaboration avec l'étudiante en thèse *Dung Bui Thi* de l'Institut d'Ecologie et des Ressources Biologiques d'Hanoï (Vietnam) réalisée dans le cadre de la Coopération Technique Belge qui a permis la publication d'une étude originale (**étude 8**).

CHAPITRE 3 : PRÉSENTATION SYSTÉMATIQUE DES ÉTUDES

ÉTUDE 1

Préambule

Cet article a été publié dans *Veterinary Parasitology* en 2007, dans le volume 149 et de la page 95 à 103.

Lors du TFE réalisé en 2003-2004, une technique PCR basée sur l'amplification d'une séquence d'ADN hautement répétée de 124 pb de *Fasciola* spp. et un *southern blot* ont été mis au point (Caron, 2004). Cent vingt-six mares ont été visitées et des mollusques étaient présents dans seulement 15 d'entre-elles. L'hôte intermédiaire principal (*G. truncatula*) n'a pas été retrouvé mais plusieurs autres espèces de mollusques *Lymnaeidae* ont été identifiées de manière qualitative comme hôtes intermédiaires potentiels de *F. hepatica* en Belgique : *L. stagnalis* et *Radix* spp. Néanmoins, l'amplification de l'ADN du parasite ne signifiait pas que le parasite était vivant et que le mollusque était capable d'héberger la totalité du développement larvaire avec production de cercaires infestantes. L'intégralité du cycle a donc été reproduite au laboratoire, de l'incubation des œufs du parasite à l'excrétion de ceux-ci par des rats. Les infestations expérimentales des mollusques ont impliqué de mettre en place un élevage de plusieurs espèces de limnées au laboratoire. Un suivi des infestations expérimentales a été réalisé pour les hôtes intermédiaires et les rats grâce à des techniques de microscopie et de biologie moléculaire pour les premiers et des techniques coproscopiques et sérologiques pour les seconds. Les hôtes intermédiaires mis en évidence sont-ils capables d'excréter des cercaires ou s'agit-il d'infestation abortive ? Les cercaires émises par ces hôtes intermédiaires alternatifs sont-elles infestantes chez le rat ?

***Fasciola hepatica*: an assessment on the vectorial capacity of two different population of *Radix* spp. commonly found in Belgium.**

Y. CARON, S. LASRI, B. LOSSON.

Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium

ABSTRACT

A previous study conducted in Belgium revealed that genetic material of *Fasciola* spp. was present in snail species belonging to the genus *Radix*. Here, these snails were collected and identified by DNA-based techniques as *R. labiata* and *R. balthica*. These two species and *Galba truncatula* (the major intermediate host in Europe) were experimentally infected with *F. hepatica*. The resulting metacercariae were fed to rats and the infection was monitored using several techniques. Microscopy revealed the presence of larval stages in 78.3 %, 45 % and 6.25 % of *G. truncatula*, *R. labiata* and *R. balthica* snails, respectively. These results were confirmed by a PCR that amplifies a *Fasciola* spp. specific sequence. Furthermore, this PCR was found to be more sensitive than microscopic examination. *R. labiata* shed fewer metacercariae than *G. truncatula* but these were as infective to rats as those shed by *G. truncatula*. This study demonstrates that *R. labiata* may act as an incidental intermediate host for *F. hepatica* in Belgium.

Keywords: *Fasciola hepatica*; *Lymnaeidae*; Polymerase Chain Reaction (PCR); Vectorial capacity; Microscopy; Second internal transcribed spacer (ITS-2).

1. INTRODUCTION

Fasciolosis is a food-borne trematode infection, which has a worldwide distribution. It is responsible for marked economic losses in livestock due to reduced weight gain, milk production, fertility, and condemnation of livers (Genicot et al., 1991). The parasite is prevalent in Europe and a recent study from Belgium reported that 17.3 % of cattle were serologically positive (Lonneux et al., 2000). This is a vectorial disease transmitted by freshwater snails of the family *Lymnaeidae* (Mollusca: Gastropoda: Basommatophora) (Boray, 1982; Malek, 1984). In Europe, the principal intermediate host for *F. hepatica* is *Galba truncatula* O.F. Müller, 1774.

While the morphological identification of *G. truncatula* is quite easy, other lymnaeids belonging to the genus *Radix* Montfort, 1810 are more difficult to identify morphologically (Mas-Coma, 2005; Pfenninger et al., 2006) except for *R. auricularia auricularia* Linnaeus, 1758. The analysis of nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences has been used for the identification of the different species (Bargues et al., 2001; Mas-Coma et al., 2005). Several authors (Bank et al., 2002) have reported the presence of the following species of the genus *Radix* in Belgium: *R. auricularia auricularia*, *R. labiata*, Rossmässler, 1835, and *R. balthica* Linnaeus, 1758. During a previous research programme dedicated to the study of biodiversity in small water surfaces in Belgium, several *Radix* spp. were collected and examined at our laboratory. A specific *Fasciola* DNA sequence was amplified by polymerase chain reaction (PCR) according to Kaplan (Kaplan et al., 1995). The study revealed that specific DNA material was present in adult *Radix* spp. (Caron, 2004).

Microscopic examination is the most frequently used technique to detect *F. hepatica* in the intermediate host. Historically, three approaches have been used to diagnose trematode infections in snails: (1) observation of cercarial shedding, (2) microscopic dissection and (3) crushing, followed by microscopic examination (Kaplan et al., 1997). Although those techniques are simple, fast, and very cheap, they have low sensitivity and/or specificity. Indeed, prior to the release of rediae from the sporocyst, and their subsequent migration through the tissue of the snail (around days 21 post-infection), the detection of the parasite is difficult. Nevertheless, young rediae might be seen nine to ten days after infection. Before cercarial development,

however, the intra-molluscan stages of the different trematode species are difficult to differentiate (Kaplan et al., 1995). For this reason, several DNA- or RNA-based techniques were developed (Shubkin et al., 1992; Rognlie et al., 1994; Kaplan et al., 1995; Kramer and Schnieder, 1998; Osama et al., 2003; Magalhaes et al., 2004; Vignoles et al., 2004; Cucher et al., 2006). These techniques are specific and sensitive (Kaplan et al., 1997) but are rarely used to detect naturally occurring infections, although this should be one of their main applications. They would be suitable, for example, for monitoring seasonal transmission during epidemiological studies (Rognlie et al., 1994; Kaplan et al., 1997).

The present study was aimed at the molecular identification of two populations of snails belonging to the genus *Radix* and commonly found in Belgium. Furthermore, the vectorial capacity of these species for *F. hepatica* was evaluated under experimental conditions. Infection of the snails was monitored using a microscopic examination and a PCR technique. Finally, the infectivity of the different populations of metacercariae was evaluated in an experimental model of infection in rats.

2. MATERIALS AND METHODS

2. 1. Snails

G. truncatula was used as a positive control. The colony originated from a French population (Commune de Migné (46° 40' 34.81" N and 1° 22' 58.58" W), Département de l'Indre). *Radix* sp. 1 and *Radix* sp. 2 were collected from the field in 2 locations in Belgium, Communes de Ernonheid (50° 23' 45.86" N and 5° 40' 43.79 " E) and Sart Tilman (50° 34' 51.03" N and 5° 35' 43.17 " E) respectively, Province of Liège. The coordinates were calculated with Google Earth (version 4, Mountain View, CA, USA).

2. 1. 1. Snail identification

The ITS-2 region sequence was analysed according to Bargues and Mas-Coma (2005). The snail DNA was extracted from half of the foot using a commercially available kit (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche) and DNA concentration was measured with a spectrophotometer (Nanodrop, Wilmington, DE, USA). The ITS-2 sequence was amplified by PCR using a commercial PCR kit (Core System 1, Promega Benelux, Leiden, The Netherlands).

The primers used were News2 (sense) 5' TGT-GTC-GAT-GAA-GAA-CGC-AG 3' and Its2Rixo (antisense) 5' TTC-TAT-GCT-TAA-ATT-CAG-GGG 3' (Almeyda-Artigas et al., 2000; BARGUES et al., 2001). Amplification was performed in a total volume of 100 µl. The PCR mixture was prepared according to the manufacturer's recommendations and 200 ng of template DNA was added. Amplification was performed in a Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Biozym, Landgraaf, Belgium) with an initial denaturation step at 94 °C for 2 min., followed by 35 denaturation cycles at 94 °C for 30 sec., annealing at 54 °C for 30 sec. and extension at 72 °C for 30 sec. followed by a final extension at 72°C for 7 min. The amplification products were electrophoretically resolved in 1 % agarose gels and stained with ethidium bromide. The DNA strips were cut and then purified with a kit (GeneClean, MP Biomedicals, Brussels, Belgium) and sequenced with a genetic analyser (ABI PRISM® 3100, Applied biosystem, Lennik, Belgium). The ITS-2 sequences obtained were compared with the BLASTn genomic database (Altschul et al., 1997) and those presenting the higher identity was considered as the most probable identification.

2. 1. 2. **Snail breeding**

The three snail species were maintained in the laboratory for breeding. Briefly, snails were kept on plastic dishes or in aquaria in an air-conditioned room (PVG, Schoten, Belgium), under the following conditions: constant temperature of 20 °C, diurnal photophase of 12 h with a light intensity of 3000-4000 lux. They were fed with leaves of pesticide free lettuce and left for five days in standing spring water (Romy Spring) before use (Van der Steen et al., 1969; Abrous et al., 1998). Plastic dishes and aquaria were checked every day and rinsed every week. Dead snails were removed daily.

2. 2. **Rats**

Eighteen 15-week old female Wistar rats were used (University of Liège breeding unit). All animals were individually marked, housed in conventional cages with grid floors, and fed a commercial rodent diet ad libitum for the entire experiment (Prestige, Versele-Laga, Belgium).

2. 3. Parasites

Eggs of *F. hepatica* were recovered at a local slaughterhouse in Liège from the bile of infected cattle. *Fasciola hepatica* eggs were incubated for 20 days at 20°C in complete darkness for miracidial development.

2. 4. Experimental infections

2. 4. 1. Snail Infection

In order to compare the mortality in infected and non-infected snail populations, mortality rates in the breeding unit were calculated for each species. One hundred newly hatched uninfected snails were raised for 50 days. Dead snails and egg masses were regularly removed. At the end of the 50 day period, the remaining snails were counted.

One hundred juvenile (1-2 mm) snails of each species were used in each infection experiment (Busson et al., 1982; Vignoles et al., 2002). Each snail was placed in one hole of a 24 well microplate filled with spring water. Each snail was exposed to two miracidia for five hours (Préveraud-Sindou and Rondelaud, 1995). Thereafter the exposed snails were maintained in the breeding unit for a maximum of 50 days as described above. Twenty snails of each species were collected on days 15 and 30 post-infection (PI). On day 50, thermal shock was provoked by applying ice to the surviving snails, in order to stimulate the shedding of cercariae. Young, non-infected snails were used as negative controls.

2. 4. 2. Rat Infections

Rats were divided into three groups of six animals each. Groups 1 and 2 were infected with metacercariae shed by *G. truncatula* or *Radix* sp. respectively. Group 3 acted as negative control. Twenty 2 week-old metacercariae were suspended in an adraganth solution (VWR, Fontenay-

sous-Bois, France) and administered orally to each rat. Group 3 was given an equivalent volume of the adraganth solution.

2. 5. **Monitoring of snail infection**

The experimental infection of snails with *F. hepatica* was monitored using two techniques: microscopy and specific amplification of a parasite DNA sequence.

Twenty snails collected on days 15 or 30 PI were examined by squashing and dissection. Firm pressure was applied with forceps on the upper side of the last whorl near the suture to free the intra-molluscan larvae. Snail bodies were finely dissected under a stereoscopic microscope (x40). The larvae, if present, were examined and characterised (Augot et al., 1998).

The bodies of each batch of snails were then pooled and DNA was extracted with a commercial kit (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche). The DNA concentration was measured with a spectrophotometer (Nanodrop, Wilmington, DE, USA). *F. hepatica* DNA was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) using a commercial kit (Core System 1, Promega Benelux, Leiden, The Netherlands). Primers were designed based on the DNA sequence of a 124 bp DNA *Fasciola sp.* specific probe (Kaplan et al., 1995): Fsh1 (sense) 5' GAT-CAA-TTC-ACC-CAT-TTC-CGT-TAG-TCC-TAC 3' and Fsh2 (antisense) 5' AAA-CTG-GGC-TTA-AAC-GGC-GTC-CTA-CGG-GCA 3'. Amplification was performed in a total volume of 50 µl. The PCR mixture was prepared according to the manufacturer's recommendations and 200 ng of template DNA was added. Amplification was performed in a Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Biozym, Landgraaf, Belgium) with an initial denaturation step at 95 °C for 5 min., followed by 40 denaturation cycles at 95 °C for 1 min., annealing at 56 °C for 1 min. and extension at 72 °C for 1 min. The amplification products were electrophoretically resolved in 1 % agarose gels and stained with ethidium bromide.

2. 6. **Monitoring of rat infection**

Faecal examination, copro-antigen detection and serology were all used to monitor *F. hepatica* infection in rats. Animals were weighed and blood was collected from the caudal vein and centrifuged (1000 g for 10 min.) before infection and weekly thereafter up to 12 weeks PI.

Individual fresh stools were collected twice a week. Sera and stools were stored at - 20 °C or 4 °C respectively prior to examination.

A standard flotation technique was used to analyse faecal samples. Briefly, 2 g of fresh faeces were mixed with 56 ml of water and then filtered (150 µm, Retsch, Aartselar, Belgium). The supernatant was centrifuged up to 1000 g. The pellet was re-suspended in a saturated solution of ZnCl₂-NaCl and centrifuged up to 100 g. The tubes were filled with the ZnCl₂-NaCl solution in order to obtain an upper meniscus. A coverslip was deposited onto the meniscus. Five minutes later the coverslip was removed and examined at x40 for the presence of *F. hepatica* eggs. Copro-antigens were detected in 3 g of stools using a commercially available kit (*Fasciola hepatica* Ag ELISA Kit, BIO K 201, Bio-X, Jemelle, Belgium) according to the manufacturer's instructions. This test detects excretory-secretory antigens of *F. hepatica* in the faeces of the definitive host. Specific antibody detection was based on an Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) that used somatic *F. hepatica* antigen (FhAg), as previously described (Bossaert et al., 2000). The parasites were extensively washed in phosphate buffered saline (PBS 0.05 M), homogenised in a Ten Broeck tissue grinder at 4 °C and sonicated. After centrifugation (24 000 g for 30 min. at 4 °C), the supernatant was collected, referred as FhAg and stored at - 20 °C until further use. Protein concentration was determined according to the Bradford protein assay. Micro-plates (Maxisorb, Greiner, Wommel, Belgium) were coated with 100 µl per well of FhAg (10 µg/ml) diluted in PBS, overnight at 4 °C. A positive and a negative controls were included each time. Optimal antigen and conjugate concentrations were determined by checkerboard titration. After three washes in PBS-Tween 0.05 % (PBST), the plates were saturated with a 10 % powder skimmed milk solution in PBST (PBSTM) for one hour at 37 °C. The plates were then washed three times in PBST and 100 fold diluted rat serum samples in PBST were added. The plates were incubated one hour at 37 °C and after three washes in PBST, a rabbit polyclonal anti-rat conjugated to horseradish peroxidase (Dako, Heverlee, Belgium) was added at a dilution of 1/4000 in PBSTM. The plates were incubated one hour at 37 °C. After 3 washes in PBST, the 3,3'-5,5'-tetramethyl-benzidine (TMB, Fluka, Buchs, Switzerland) substrate in citrate buffer (pH 4.2) with 1.5 ml/l of H₂O₂ (30 %), was added. After 10 min., the reaction was stopped by the addition of sulphuric acid (1M). Optical densities (OD) were read at 450 nm with a microplate autoreader (Multiskan RC, ThermoLabsystem, Rødovre, Denmark). The determination of the cut-

off was based on the average of the OD of 70 negative reference sera plus two standard deviations.

On week 12 PI all rats were euthanased. Post-mortem examination was carried out and all flukes were collected from the bile duct and measured.

2. 7. Statistical analysis

The results of experimental infections in the different snail species and the mortality rates between infected and uninfected snails were analyzed by Chi-square (0.05) test. An ANOVA 2 with interaction for paired data was used to analyse the body weigh and the specific antibody response. A t test was used (0.05) to compare the number and the size of the flukes collected from the rats at post mortem. All analyses were carried out using the SAS software (version 6.12, Cary, NC, USA).

3. RESULTS

3. 1. Snails

The ITS-2 based identification resulted in the identity of *G. truncatula* (identities = 97 %) as *G. truncatula* (Genbank accession nos. [AJ243017](#)), *Radix* sp. 1 (identities = 98 %) as *R. labiata* (Genbank accession nos. [AJ319637](#)) and *Radix* sp. 2 (identities = 97 %) as *R. balthica* (Genbank accession nos. [AJ319634](#)). Results were further confirmed by the Parasite and Vector Molecular Analysis Centre of the Department of Parasitology, University of Valencia, Spain (M. D. Bargues, P. Artigas & S. Mas-Coma) (Bargues et al., 2001; Bargues et al., 2003; Bargues and Mas-Coma, 2005).

The mortality rates in uninfected snails were 7%, 4%, and 38%, for *G. truncatula*, *Radix* sp. 1, and *Radix* sp. 2, respectively. *G. truncatula* and *Radix* sp. 1 were exposed to miracidia three times while *Radix* sp. 2 was exposed twice (**Tables I and II**).

Table I - Microscopic and PCR results on days 15 and 30 PI in *Galba truncatula* and *Radix labiata* (*Radix* sp. 1) experimentally infected with *Fasciola hepatica*. The infection rates are the mean of three infestations \pm standard deviation for each species.

	<i>Galba truncatula</i>	<i>Radix labiata</i>
D15		
Squashing and dissection	+	+
Infection rates	28.3 % \pm 17.5	26.6 % \pm 12.5
PCR	+	+
D30		
Squashing and dissection	+	+
Infection rates	78.3 % \pm 10.4	45 % \pm 13.2
PCR	+	+

Table II - Microscopic and PCR results on days 15 and 30 PI in *Radix balthica* (*Radix* sp. 2) experimentally infected with *Fasciola hepatica*. The infection rates are the result of two infestations. The standard deviation is 3.5 for D15 and 8.8 for D30.

	<i>Radix balthica</i>	
Infections	1	2
D15		
Squashing and dissection	-	+
Infection rates	0 %	5 %
PCR	+	+
D30		
Squashing and dissection	-	+
Infection rates	0 %	12.5 %*
PCR	-	+

*calculated on 8 individuals only

On day 15 PI, 28.3 % (± 17.5) of *G. truncatula* and 26.6 % (± 12.5) of *Radix* sp. 1 individuals showed intra-molluscan stages of *F. hepatica* at microscopic examination. There was no statistical difference between these two species. On day 30 PI, the mean infection rates reached 78.3 % (± 10.4) and 45 % (± 13.2) for *G. truncatula* and for *Radix* sp. 1 respectively. These rates were significantly different ($p < 0.05$) (**Tables I and II**). PCR performed on snails at days 15 and 30 PI confirmed the microscopic results for these two species (**Figure 1**).

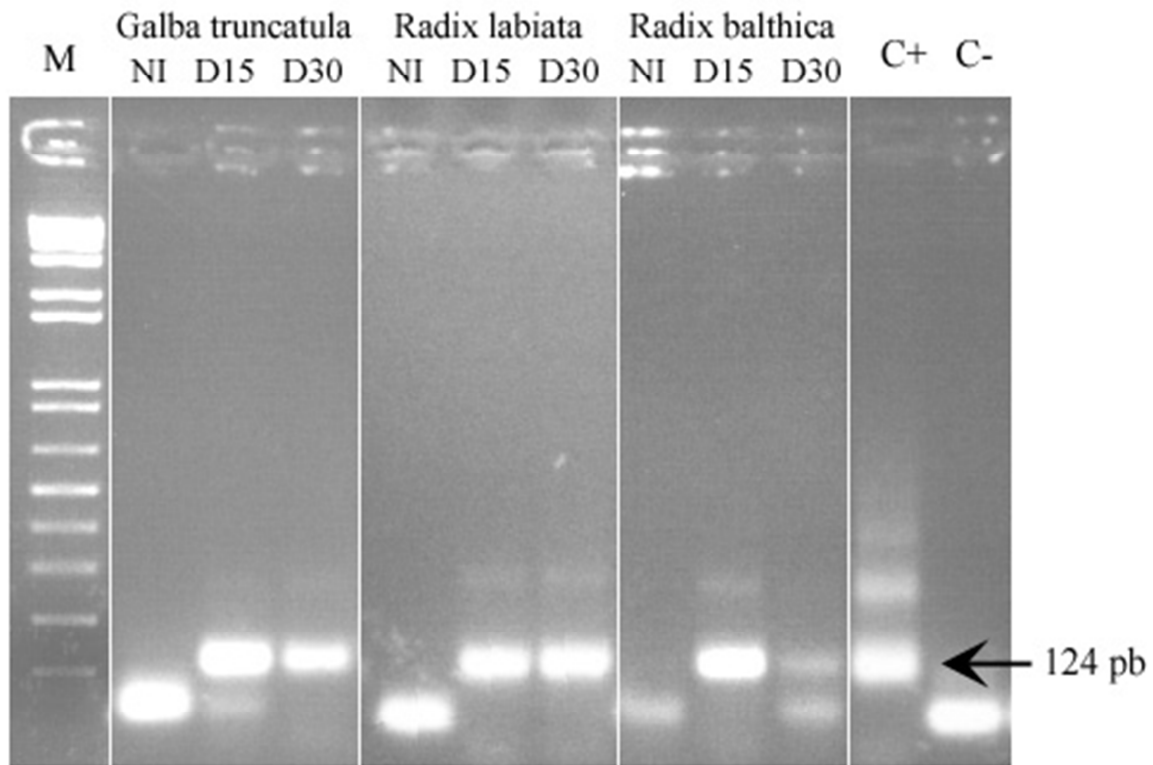


Figure 1 - Agarose gel electrophoresis following PCR performed on experimentally infected or control snails. **M**: Molecular size marker DNA of 1000 bp; **NIS**: Non infected snails; **D15**: Day 15 PI; **D30**: Day 30 PI; **C+**: Positive control; **C-**: Negative control.

All infections in *G. truncatula* led to the shedding of metacercariae (approximately 100 metacercariae/snail) until day 55 PI. Only one infection out of three led to the shedding of metacercariae in the case of *Radix* sp. 1 (approximately 4 metacercariae/snail) and no shedding was observed in the case of *Radix* sp. 2. However, 2.5 % (± 3.5) (day 15 PI) and 6.25 % (± 8.8) (day 30 PI) of *Radix* sp. 2 snails contained *F. hepatica* larvae. PCR confirmed the results obtained by squashing and dissection. Furthermore, specific fluke DNA was amplified on day 15 PI following the first infection, whereas no intra-molluscan larvae were observed microscopically (**Table II**).

The average mortality rates were calculated for each species of snail, reaching 31 %, 25 %, and 54 % for *G. truncatula*, *Radix* sp. 1, and *Radix* sp. 2, respectively. These mortality rates were found to be statistically different to the mortality rates in non-infected snails ($p < 0.05$).

3. 2. Rats

Body weights did not change during the course of the experimental infections (data not shown). Eggs of *F. hepatica* were observed on day 42 onwards in one rat infected with metacercariae originating from *G. truncatula*. On day 70 PI, all infected animals were passing *F. hepatica* eggs. The results of copro-antigen detection are illustrated in **Figure 2**. Copro-antigen were already detectable on day 35 PI. There was no difference between the two groups of infected rats.

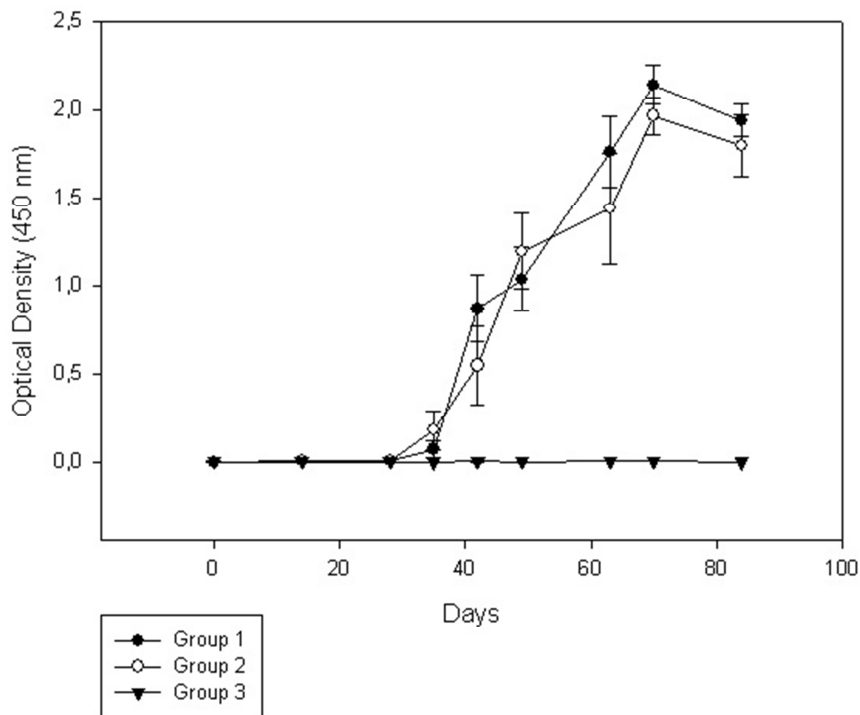


Figure 2 – Copro-antigen detection in rats experimentally infected with 20 *F. hepatica* metacercariae. Group 1: Rats infected with metacercariae shed by *G. truncatula*; Group 2: Rats infected with metacercariae shed by *R. labiata* (*Radix* sp. 1) ; Group 3: Controls. Vertical lines represent standard errors.

Serum antibodies to *F. hepatica* were detected by ELISA as little as two weeks after infection and titres remained elevated until the end of the experiment (data not shown). Again there were no statistically significant differences between the two infected groups.

At post mortem examination, 21 and 23 flukes were collected from rats infected with metacercariae produced by *G. truncatula* (3.5 (\pm 2) /rat) and *Radix* sp. 1 (3.8 (\pm 2.7) /rat) respectively. The average size of the parasite was 2.2 cm (\pm 0.33) and 2.0 cm (\pm 0,33) in flukes originating from *G. truncatula* and *Radix* sp. 1 respectively. There were no statistical differences between the number and the size of the flukes collected from the two experimental groups.

4. DISCUSSION

Morphological features are not always sufficient to differentiate sibling species due to inter- and intraspecific variations. This is particularly the case for the lymnaeid snails belonging to the genus *Radix* (Bargues and Mas-Coma, 2005; Pfenninger et al., 2006). Currently, their identification based on the analysis of ITS-2 DNA sequences seems to be the most reliable approach (Bargues and Mas-Coma, 1997; Bargues et al., 1997; Bargues et al., 2001; Bargues et al., 2003; Bargues and Mas-Coma, 2005). However, one study (Anderson, 2001) pointed out that molecular data from a single genetic marker can lead to ambiguous conclusions, which emphasizes the importance of utilizing more than one marker in studies on parasite species (Carvalho et al., 2004). For instance another marker, the Molecularly defined Operational Taxonomic Units (MOTU), inferred from mitochondrial COX-I sequence variation, has been shown to be congruent with biological species in the genus *Radix* (Pfenninger et al., 2006).

Here, the molecular identification based on ITS-2 sequence analysis led to *R. labiata* (= *R. peregra* sensu Ehrmann, 1933) for *Radix* sp. 1 and for *R. balthica* (= *R. peregra*, O.F. Müller, 1774 = *R. ovata* Draparnaud, 1805) for *Radix* sp. 2 (Bargues et al., 2001; Mas-Coma et al., 2005). It is difficult to compare these results with those obtained in previous studies based solely on morphological criteria. However, several considerations can be made.

(1) Microscopic examination was not very sensitive in determining infection status of snails. *F. hepatica* DNA was amplified by PCR on day 15 PI in *R. balthica* although larvae were not

observed. Nevertheless, squashing and dissection are easy and cheap to perform. Furthermore, PCR was not performed on each individual snail, so the different infection rates were calculated using microscopic techniques. Therefore, considering the lack of sensitivity of microscopic examination, we only used the data recorded on day 30 PI to calculate infection rates (Kaplan et al., 1997).

(2) Experimental infection of the three snails species showed significant variation in susceptibility towards *F. hepatica*. Exposed *R. labiata* snails were able to harbour the parasite and allow its multiplication, leading to the shedding of infective metacercariae. The average infection rates reached 78 %, 45 %, and 6.25 %, for *G. truncatula*, *R. labiata*, and *R. balthica*, respectively. Infection rates of 67.8 % have been reported for *G. truncatula* (Belfaiza et al., 2004). However, it must be pointed out that, in a single species, important variations exist in the infection rates. For example, the infection rates of seven different populations of *G. truncatula* varied greatly, from 5 to 80 % (Rondelaud et al., 2004). Furthermore, differences in susceptibility can also depend on the size of the snails (Dreyfuss et al., 1997, , 2000). Only young *Radix* spp. allow *F. hepatica* multiplication (Boray, 1969, 1978) and this capacity increases with previous contacts between the snail offspring and the parasite (Abrous et al., 1998; Rondelaud et al., 2004).

(3) The PCR technique used in this study was found to be more sensitive than microscopic examination, especially in alternative host such as *R. balthica*. According to Kaplan and colleagues (1995), 1 ng of *F. hepatica* DNA allows the amplification of the 124 bp probe. This sensitivity level allows the detection of one miracidium, the minimal biological unit that can be found in an infected snail. However, this technique is unable to assess whether full intra-molluscan development (leading to cercarial shedding) takes place or not in a potential host. In the present study specific DNA was detected in exposed *R. balthica*, but the absence of cercarial shedding indicates that the infection was abortive.

The mortality rate for uninfected *G. truncatula* (7 %) was lower than the 38% reported in a previous study (Vignoles et al., 2004). Here, mortality rates for *R. labiata* and *R. balthica* reached 4% and 38% respectively. The maintenance and breeding of *R. balthica* was particularly difficult and infectivity could not be verified due to the lack of metacercariae.

G. truncatula is not very resistant to strong climatic variations (Rondelaud and Morel-Vareille, 1975; Rondelaud, 1994) and, under such conditions, other potential vectors could play an important role in parasite transmission. The maintenance of the parasite life cycle, through the help of incidental hosts that can act as alternative reservoirs, might be sufficient to allow the survival of the parasite in an area where its principal intermediate host is permanently or temporarily absent (Caron, 2004).

Both *G. truncatula* and *R. labiata* were able to produce *F. hepatica* metacercariae under experimental conditions, although at very different levels. In most previous studies on the vectorial capacity of different snail species, the viability and infectivity of metacercariae have not been considered. In the present work, experimental infection of rats with metacercariae produced by either *G. truncatula* or *R. labiata* was performed and no differences were observed between the two groups of rats. The antibody response as measured by ELISA was in agreement with a previous report of experimental infection in rats (Mulcahy et al., 1999). Copro-antigen detection was found to be particularly useful and reliable: faecal samples are easy to obtain and a positive signal is associated with the presence of viable flukes in the bile ducts (Mezo et al., 2004). Furthermore, copro-antigens can be detected before patency.

To summarize the results of the present study, *R. labiata* harboured the intra-molluscan development and allowed subsequent shedding of *F. hepatica* metacercariae, although in fairly low numbers. These metacercariae were as infective in a rat as those produced in *G. truncatula* as judged by parasitological and serological data. Therefore, *R. labiata* can be considered as an incidental intermediate host for *F. hepatica* in Belgium and elsewhere. This is probably not the case, however, for *R. balthica*. These laboratory results should be confirmed in the field in naturally-infected potential vectors.

ACKNOWLEDGMENTS

We are deeply indebted to Prof. Maria D. Bargues, Prof. Santiago Mas-Coma, and to Dr. Pablo Artigas who confirmed the DNA-based snail identification. (Parasite and Vector Molecular Analysis Centre of the Department of Parasitology, University of Valencia, Spain). This work was supported by the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Liège, Belgium.

REFERENCES

Abrous, M., Comes, A.M., Gasnier, N., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., Chauvin, A., Menard, A., Agoulon, A., Cabaret, J., 1998. Morphological variability in *Fasciola hepatica* eggs in ruminants, rodents and lagomorphs. *J. Helminthol.* 72, 313-317.

Almeyda-Artigas, R.J., Bargues, M.D., Mas-Coma, S., 2000. ITS-2 rDNA sequencing of *Gnathostoma* species (*Nematoda*) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis in the Americas. *J. Parasitol.* 86, 537-544.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.

Anderson, T.J.C., 2001. The dangers of using single locus markers in parasite epidemiology: *Ascaris* as a case study. 17, 183-188.

Augot, D., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., Cabaret, J., Bayssade-Dufour, C., Albaret, J.L., 1998. Characterization of *Fasciola hepatica* redial generations by morphometry and chaetotaxy under experimental conditions. *J. Helminthol.* 72, 193-198.

Bank, R.A., Bouchet, P., Falkner, G., Gittenberger, E., Hausdorf, B., von Proschwitz, T., Ripken, E.J. 2002. Checklist of species-group taxa of continental Mollusca living in Belgium (CLECOM section I) (Göteborgs, Göteborgs Naturhistoriska Museum).

Bargues, M.D., Mas-Coma, S., 1997. Phylogenetic analysis of Lymnaeid snails based on 18S rDNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 14, 569-577.

Bargues, M.D., Mas-Coma, S., 2005. Reviewing lymnaeid vectors of fascioliasis by ribosomal DNA sequence analyses. *J. Helminthol.* 79, 257-267.

Bargues, M.D., Mangold, A.J., Munoz-Antoli, C., Pointier, J.P., Mas-Coma, S., 1997. SSU rDNA characterization of lymnaeid snails transmitting human fascioliasis in South and Central America. *J. Parasitol.* 83, 1086-1092.

Bargues, M.D., Vigo, M., Horak, P., Dvorak, J., Patzner, R.A., Pointier, J.P., Jackiewicz, M., Meier-Brook, C., Mas-Coma, S., 2001. European *Lymnaeidae* (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. *Infect. Genet. Evol.* 1, 85-107.

Bargues, M.D., Horak, P., Patzner, R.A., Pointier, J.P., Jackiewicz, M., Meier-Brook, C., Mas-Coma, S., 2003. Insights into the relationships of Palearctic and Nearctic lymnaeids (Mollusca: Gastropoda) by rDNA ITS-2 sequencing and phylogeny of stagnicoline intermediate host species of *Fasciola hepatica*. *Parasite* 10, 243-255.

Belfaiza, M., Abrous, M., Rondelaud, D., Moncef, M., Dreyfuss, G., 2004. The use of tetraphyll as food for snails increases the intensity of cercarial shedding in *Galba truncatula* infected with *Fasciola hepatica*. *Parasitol. Res.* 94, 86-90.

Boray, J.C., 1969. Experimental fascioliasis in Australia. *Adv. Parasitol.* 7, 95-210.

Boray, J.C., 1978. The potential impact of exotic *Lymnaea* spp. on fascioliasis in Australasia. *Vet. Parasitol.* 4, 127-141.

Boray, J.C., 1982, Fascioliasis. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Bossaert, K., Jacquinet, E., Saunders, J., Farnir, F., Losson, B., 2000. Cell-mediated immune response in calves to single-dose, trickle, and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 88, 17-34.

Busson, P., Busson, D., Rondelaud, D., Pestre-Alexandre, M., 1982. Données expérimentales sur l'infestation des jeunes de cinq espèces de limnées par *Fasciola hepatica* L. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 57, 555-563.

Caron, Y. 2004. Une étude de la faune malacologique associée aux petites surfaces aquatiques en Belgique et évaluation préliminaires par des techniques de biologie moléculaire du rôle potentiel de différentes espèces dans le maintien du cycle de *Fasciola hepatica* (Trematoda, Linnaeus 1758) (Liège, Université de Liège), p. 35.

Carvalho, O.S., Cardoso, P.C., Lira, P.M., Rumi, A., Roche, A., Berne, E., Muller, G., Caldeira, R.L., 2004. The use of the polymerase chain reaction and restriction fragment length

polymorphism technique associated with the classical morphology for characterization of *Lymnaea columella*, *L. viatrix*, and *L. diaphana* (Mollusca: *Lymnaeidae*). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 99, 503-507.

Cucher, M.A., Carnevale, S., Prepelitchi, L., Labbe, J.H., Wisnivesky-Colli, C., 2006. PCR diagnosis of *Fasciola hepatica* in field-collected *Lymnaea columella* and *Lymnaea viatrix* snails. Vet. Parasitol. 137, 74-82.

Dreyfuss, G., Abrous, M., Rondelaud, D., 1997. *Fasciola hepatica* Linné : la charge rédienne et les émissions cercariennes chez les juvéniles de *Lymnaea peregra peregra* Müller. Rev. Med. Vet. (Toul.) 148, 609-612.

Dreyfuss, G., Abrous, M., Rondelaud, D., 2000. The susceptibility of *Lymnaea fuscus* to experimental infection with *Fasciola hepatica*. J. Parasitol. 86, 158-160.

Genicot, B., Mouligneau, F., Lekeux, P., 1991. Economic and production consequences of liver fluke disease in double-muscled fattening cattle. Zentralbl. Veterinarmed. B 38, 203-208.

Kaplan, R.M., Dame, J.B., Reddy, G.R., Courtney, C.H., 1995. A repetitive DNA probe for the sensitive detection of *Fasciola hepatica* infected snails. Int. J. Parasitol. 25, 601-610.

Kaplan, R.M., Dame, J.B., Reddy, G.R., Courtney, C.H., 1997. The prevalence of *Fasciola hepatica* in its snail intermediate host determined by DNA probe assay. Int. J. Parasitol. 27, 1585-1593.

Kramer, F., Schnieder, T., 1998. Sequence heterogeneity in a repetitive DNA element of *Fasciola*. Int. J. Parasitol. 28, 1923-1929.

Lonneux, J.F., Boelaert, F., Vandergheynst, D., Biront, P., Meulemans, G. 2000. *Fasciola hepatica* in Belgium: survey of the disease's prevalence and comparison with previous simulations. (Veterinary and Agrochemical Research Center), pp. 56-57.

Magalhaes, K.G., Passos, L.K., Carvalho Odos, S., 2004. Detection of *Lymnaea columella* infection by *Fasciola hepatica* through Multiplex-PCR. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 99, 421-424.

Malek, E.A., 1984, Snail transmitted parasitic diseases. CRC Press, Boca Raton, Fl, USA.

Mas-Coma, S., 2005. Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *J. Helminthol.* 79, 207-216.

Mas-Coma, S., Bargues, M.D., Valero, M.A., 2005. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 35, 1255-1278.

Mezo, M., Gonzalez-Warleta, M., Carro, C., Ubeira, F.M., 2004. An ultrasensitive capture ELISA for detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in sheep and cattle using a new monoclonal antibody (MM3). *J. Parasitol.* 90, 845-852.

Mulcahy, G., Joyce, P., Dalton, J.P., 1999. Immunology of *Fasciola hepatica*, In: Dalton, J.P. (Ed.) Fascioliosis. CABI publishing, Wallingford, Oxon, pp. 341-375.

Osama, M.S.M., Hoda, A.T., Gamal, R., 2003. Diagnosis of *Fasciola gigantica* in snail using the polymerase chain reaction (PCR) assay. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 33, 733-742.

Pfenninger, M., Cordellier, M., Streit, B., 2006. Comparing the efficacy of morphologic and DNA-based taxonomy in the freshwater gastropod genus *Radix* (*Basommatophora*, *Pulmonata*). *BMC Evol. Biol.* 6, 100.

Préveraud-Sindou, M., Rondelaud, D., 1995. Localization and outcome of *Fasciola hepatica* sporocysts in *Lymnaea truncatula* subjected to mono- or plurimiracidial exposure. *Parasitol. Res.* 81, 265-267.

Rognlie, M.C., Dimke, K.L., Knapp, S.E., 1994. Detection of *Fasciola hepatica* in infected intermediate hosts using RT-PCR. *J. Parasitol.* 80, 748-755.

Rondelaud, D., 1994. *Fasciola hepatica*: the infection rate and the development of redial generations in *Lymnaea truncatula* exposed to miracidia after experimental desiccation and activation in water. *J. Helminthol.* 68, 63-66.

Rondelaud, D., Morel-Vareille, C., 1975. Distribution estivale et survie des Limnées tronquées *Lymnaea (Galba) truncatula* Muller saines ou infestées par *Fasciola hepatica* L. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 50, 603-616.

Rondelaud, D., Denève, C., Belfaiza, M., Mekroud, A., Abrous, M., Moncef, M., Dreyfuss, G., 2004. Variability in the prevalence of infection and cercarial production in *Galba truncatula* raised on a high-quality diet. *Parasitol. Res.* 92, 242-245.

Shubkin, C.D., White, M.W., Abrahamsen, M.S., Rognlie, M.C., Knapp, S.E., 1992. A nucleic acid-based test for detection of *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* 78, 817-821.

Van der Steen, W.J., Van den Hoven, N.P., Jager, J.C., 1969. A method for breeding and studying freshwater snails under continuous water change, with some remarks on growth and reproduction in *Lymnaea stagnalis*. *J. Zool.* 19, 131-139.

Vignoles, P., Dreyfuss, G., Rondelaud, D., 2002. Redial growth and cercarial productivity of *Fasciola hepatica* in three species of young lymnaeid snails. *J. Helminthol.* 76, 269-272.

Vignoles, P., Menard, A., Rondelaud, D., Agoulon, A., Dreyfuss, G., 2004. *Fasciola hepatica*: the growth and larval productivity of redial generations in *Galba truncatula* subjected to miracidia differing in their mammalian origin. *J. Parasitol.* 90, 430-433.

ÉTUDE 2

Préambule

Cet article a été publié dans *Veterinary Parasitology* en 2011, dans le volume 178 et de la page 93 à 99.

La précédente étude nous a donc montré que certains hôtes intermédiaires pouvaient héberger le parasite et donner naissance, au même titre que l'hôte intermédiaire principal, à des formes infestantes chez un hôte définitif. Il paraît important de vérifier cela sur le terrain. Toutefois, pour ce faire, la technique d'extraction doit être optimisée car les techniques existantes présentent de nombreux inconvénients. De plus, il faut aussi améliorer la PCR du fait de l'existence d'une inhibition de la réaction de polymérisation en chaîne. Les deux techniques doivent s'appliquer à de grands échantillons et doivent donc être robustes. Comment optimiser l'extraction d'ADN ? Comment optimiser la PCR ?

An optimized DNA extraction and multiplex PCR for the detection of *Fasciola* spp. in lymnaeid snails.

Y. CARON¹, S. RIGHI², L. LEMPEREUR¹, C. SAEGRMAN³, B. LOSSON¹

¹Research Unit in Parasitology and Parasitic Diseases, Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium

²Veterinary Sciences Institute, University Center of El Tarf, B.P 73000 El Tarf, Algeria

³Research Unit in Epidemiology and Risk Analysis applied to Veterinary Sciences (UREAR), Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium

ABSTRACT

This study deals with the development and validation of an original PCR protocol to assess the presence of *Fasciola hepatica* in *Galba truncatula* its main intermediate host in Western Europe. In the present study two DNA extraction techniques are compared and a new multiplex PCR is described. The Chelex® DNA extraction technique showed to be more appropriate than the classical Phenol/Chloroform/Proteinase K based method because of the absence of toxic organic solvent, shorter duration and lower cost, and a higher reproducibility regarding DNA concentrations and wavelength ratios. The multiplex PCR was set up to amplify the lymnaeid internal transcribed spacer 2 sequence (500-600 bp) that act as an internal control and a 124 bp *Fasciola* sp. sequence that is repeated more than 300,000 times in fluke whole genome. Ninety six snails were pooled and 6 snails (6.25%) found positive for *Fasciola* sp. The limit of detection is lower than the minimal biological infestation unit (one miracidium). DNA extracts from *Paramphistomum daubneyi*, *Dicrocoelium lanceolatum*, and *Fascioloides magna* didn't cross react.

Keywords: *Fasciola* sp., *Lymnaea* sp., Chelex®, Phenol/Chloroform/Proteinase K, Multiplex PCR, Epidemiology.

1. INTRODUCTION

Fasciola hepatica, the common liver fluke is a widely distributed parasitic helminth. Fasciolosis affects mainly domestic ruminants and is responsible for important economic losses. In a recent study the financial loss due to bovine fasciolosis in Switzerland reached approximately 52 million € per year (Schweizer et al., 2005).

Galba truncatula is the main lymnaeid intermediate host in the Old World (Taylor, 1965; Torgerson and Claxton, 1999) but most of the other lymnaeid species of Western Europe may also sustain the larval development of the liver fluke if they are exposed to miracidia during their first days of life (Boray, 1978). For example, *Radix labiata* was found to act as an alternative intermediate host of *F. hepatica*, at least under laboratory conditions, because it harboured the intra-molluscan development and allowed the subsequent shedding of cercariae. Furthermore, these metacercariae were as infective in a rat model as those produced in *G. truncatula* as judged by parasitological and serological data (Caron et al., 2007). These laboratory results should be confirmed in the field in naturally infected potential intermediate hosts.

To determine the ability of a snail species or a snail population to act as intermediate host, quick, cheap, and reliable tools are required. All steps regarding DNA extraction must be reliable and reproducible. The protocol generally used to extract the DNA from snails is based on Phenol/Chloroform extraction and proteinase K (Kaplan et al., 1995; Mostafa et al., 2003; Velusamy et al., 2004; Bargues et al., 2007). The main drawbacks of this technique are the requirement of toxic organic solvents (phenol, chloroform), multiple tube transfers, a minimum of three centrifugations, duration (overnight incubation), and cost. Nontoxic techniques based on commercially available spin-column kits exist and are currently used but are quite expensive and show varied quality. Twenty years ago, procedures based on the use of Chelex® chelating resin were developed for extracting DNA from forensic-type samples (Walsh et al., 1991). Later, this resin was used to extract the DNA from oyster (Ko et al., 1999) but never from lymnaeid snails.

The easiness and relatively low cost of the basic PCR protocol make it interesting to investigate the epidemiology of liver fluke infections (Caron et al., 2008) particularly during large epidemiological surveys dealing with big samples (>1000 snails). Consequently, several PCR protocols were developed to assess *Fasciola* spp. prevalence in lymnaeid snails (Krämer and

Schnieder, 1998; Krämer, 1999; Krämer and Schnieder, 1999; Mostafa et al., 2003; Velusamy et al., 2004; Cucher et al., 2006; Caron et al., 2007). Real-time PCR (Schweizer et al., 2007) and multiplex PCR were also developed (Magalhaes et al., 2004; Magalhaes et al., 2008). This last technique is very interesting because several sequences were amplified in the same PCR tube. Indeed, the PCR technique has to take into account the possibility of false negative results because of PCR inhibitors. Therefore, an internal control can be amplified along with the gene of interest.

The aim of this study was first, to compare DNA extraction based either on Chelex® or Phenol/Chloroform/Proteinase K and second, to develop a multiplex PCR to detect accurately *Fasciola* sp. infection in confirmed potential snail intermediate hosts.

2. MATERIAL AND METHODS

2. 1. DNA extractions

The DNA of one hundred *G. truncatula* collected in July 2007 in the region of Boutheldja (a hyperendemic area in Algeria) was extracted following two DNA extraction methods (each whole snail was divided with a scalpel blade in two equal parts):

- Phenol/Chloroform/Proteinase K-based DNA extraction method:

The snail was mechanically disrupted with a scalpel blade in 100 µl of water in Petri dishes and incubated at 50 °C overnight in 100 µl of lysis buffer (50 mM TrisHCl pH 8, 100 mM NaCl, 50 mM EDTA, 0.8% SDS) and 200 µg/ml proteinase K (Promega). Thereafter, 100 µl of phenol/chloroform/isoamyl-alcohol (25/24/1) was added to the initial mix. The mixture was placed on a vortex for one min and centrifuged at 12,000 x g for one min. The supernatant was transferred to a microcentrifuge tube containing 100 µl of chloroform/isoamyl-alcohol (24/1), gently mixed and centrifuged at 12,000 x g for ten min. The supernatant was transferred into another microcentrifuge tube containing 250 µl of ethanol 100% and 50 µl of sodium acetate (3 M), incubated overnight at room temperature and then centrifuged at 12,000 x g for 30 min. The pellet was washed with 250 µl of ethanol 75% and centrifuged at 12,000 x g for 10 min, dried for several minutes, rehydrated in water (100 µl) and stored at -20 °C.

- Chelex®-based DNA extraction method:

The material was mechanically disrupted with the help of a pellet mixer (TreffLab) in 100 µl of Chelex® 5% (Bio-Rad) and incubated one hour at 56 °C and 30 min at 95 °C in a Peltier Thermal Cycler (MJ Research). Then the mixture was centrifuged at 13,000 x g for seven min. The supernatant was collected and stored at -20 °C.

The concentrations and the DNA purity (260/280 wavelength ratio) of both DNA series were measured with a spectrophotometer (Thermo Scientific, NanoDrop 1000). Moreover the time required for each techniques and the cost were also evaluated.

2.2. Multiplex PCR

The DNA of ninety six *G. truncatula* collected in April 2008 in the region of Boutheldja (Algeria) was extracted with Chelex® as described above.

This multiplex PCR assay amplifies the highly repeated 124 bp DNA *Fasciola* sp. specific sequence (Kaplan et al., 1995; Caron et al., 2007) and the rDNA ITS-2 sequence of the snail (500-600 bp). The primers used were, for *Fasciola* sp. Fsh1 (sense) 5'-GAT-CAA-TTC-ACC-CAT-TTC-CGT-TAG-TCC-TAC-3' and Fsh2 (antisense) 5'-AAA-CTG-GGC-TTA-AAC-GGC-GTC-CTA-CGG-GCA-3', and for ITS-2 News2 (sense) 5'-TGT-GTC-GAT-GAA-GAA-CGC-AG-3' and Its2Rixo (antisense) 5'-TTC-TAT-GCT-TAA-ATT-CAG-GGG-3' (Almeyda-Artigas et al., 2000; Bargues et al., 2001). Different primer concentrations were tested and the best result was obtained with 5 µM for *Fasciola* sp. primer set and 50 µM for ITS-2 primer set. The sequences were amplified using a commercial kit (Taq PCR Master Mix, Qiagen) containing MgCl₂ (3 mM) and 400 µM of each dNTP. Amplification was performed in a total volume of 25 µl in a Peltier Thermal Cycler (MJ Research) with an initial denaturation step at 95 °C for five min, followed by 40 denaturation cycles at 95 °C for one min, annealing at 56 °C for one min, extension at 72 °C for one min and a final extension at 72 °C for ten min. The amplification products were electrophoretically resolved in 2% agarose gels and stained with ethidium bromide. The ITS-2 band acts as an internal control because its absence indicates the presence of PCR inhibitors.

To reduce the number of PCR, ten pools (nine pools of ten snails and one pool of six snails) were prepared by mixing one μl of each DNA sample. This mixture was considered as undiluted. One μl of the mixture was then tested in the multiplex PCR described above. To assess the possible influence of PCR inhibitors (when the ITS-2 band was not present), 1/10 and 1/100 dilutions were tested both on pooled and individual samples.

2.3. Limit of detection

To assess the limit of detection of the multiplex PCR, two experiments were conducted. In the first one, a pool (pool 9) containing the DNA of one snail naturally infested (100 ng) and the DNA of nine uninfected snails (100 ng each) was ten fold diluted until the disappearance of both signals.

In the second experiment, *F. hepatica* DNA was added to *G. truncatula* DNA. The amount for the snail DNA was 100 ng in each PCR mixture but the trematode DNA was ten fold diluted (from 100 ng) until the disappearance of *Fasciola* sp. specific signal.

2.4. Specificity

The DNA of three trematodes (*Paramphistomum daubneyi*, *Dicrocoelium dendriticum*, and *Fascioloides magna*) using *G. truncatula* as intermediate host and different species of domesticated or wild ruminants as definitive host were tested in the multiplex PCR in order to evaluate the occurrence of possible cross reactions. *P. daubneyi* and *D. dendriticum* were furnished by the necropsy rooms of the Faculty of Veterinary Medicine of Liège and the Regional Animal Health Investigation Center in Ciney (Belgium) respectively. *F. magna* was kindly provided by Prof. A. Marinculic from the Faculty of Veterinary Medicine of Zagreb (Croatia). The DNA was extracted with the Chelex® technique and amplified with the multiplex PCR protocol as described above.

Right after a multiplex PCR on a non-infected snail the ITS2 DNA sequence was cloned in a plasmid vector using a commercial kit (pcDNA3.1/V5-His-TOPO TA Expression kit, Invitrogen)

following the manufacturer's recommendations. The clones containing the sequence were purified with a commercial kit (NucleoSpin Plasmid, Macherey Nagel) as described by the manufacturer. Then, the ITS2 sequence was sequenced with a genetic analyzer (ABI PRISM® 3100, Applied Biosystem) and compared with the BLASTn genomic database (Zhang et al., 2000). The sequence presenting the highest identity was considered as the most probable identification.

Additionally, the 124 bp *Fasciola hepatica* specific probe was sequenced after amplification through multiplex PCR of an infected snail. The DNA was purified using MSB-Spin PCRapace (Invitek). Cycle sequencing reactions were performed by BigDye terminator v3.1 (3730 DNA analyzer; Applied Biosystems) by Giga Genomics Facility (Liège University, Belgium) and the sequence was compared to available database as previously described.

2.5. Statistical analysis

- DNA extractions

The correlation of DNA concentration or purity between both DNA extraction methods (Phenol/Chloroform or Chelex®) was assessed by the Pearson correlation method (r). A two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test was used to compare the distribution of the DNA concentration values and the wavelength ratio in both Phenol/Chloroform and Chelex® extraction methods (Dagnelie, 1998). The limit of statistical significance of the tests was defined as $P \leq 0.05$.

3. RESULTS

3.1. DNA extractions

For the comparison of the DNA concentration and purity, 100 *G. truncatula* were used (2 series of matched samples). The DNA concentration values were correlated for both extraction methods ($r = 0.32$, $P = 0.001$) but were significantly higher for the Chelex® extraction method (Two-sample Wilcoxon rank-sum test, $P < 0.0001$) (**Table I** and **Figure 1, A**). Moreover the dispersion

of DNA concentrations around the mean value was higher for phenol extraction method. The purity in both phenol/chloroform and Chelex® extraction methods were also correlated ($r = 0.22$, $P = 0.03$) (Table I and Figure 1, B) but were significantly higher for the phenol extraction method (Two-sample Wilcoxon rank-sum test, $P < 0.0001$). Similarly, the dispersion of purity around the mean value was higher for phenol extraction method.

Table I – Comparison of phenol/chloroform and Chelex® based DNA extraction (100 *G. truncatula*).

	DNA concentration (ng/μl)	Wavelength ratio (260/280)	Estimated processing time (h)	Estimated cost (€/snail)
Phenol/chloroform	56.3 ± 33.1*	1.96 ± 0.21*	36	0.4
Chelex®	80.0 ± 25.2*	1.63 ± 0.07*	5	0.2

* Two-sample Wilcoxon rank-sum test, statistically significant with $P = 0.0001$.

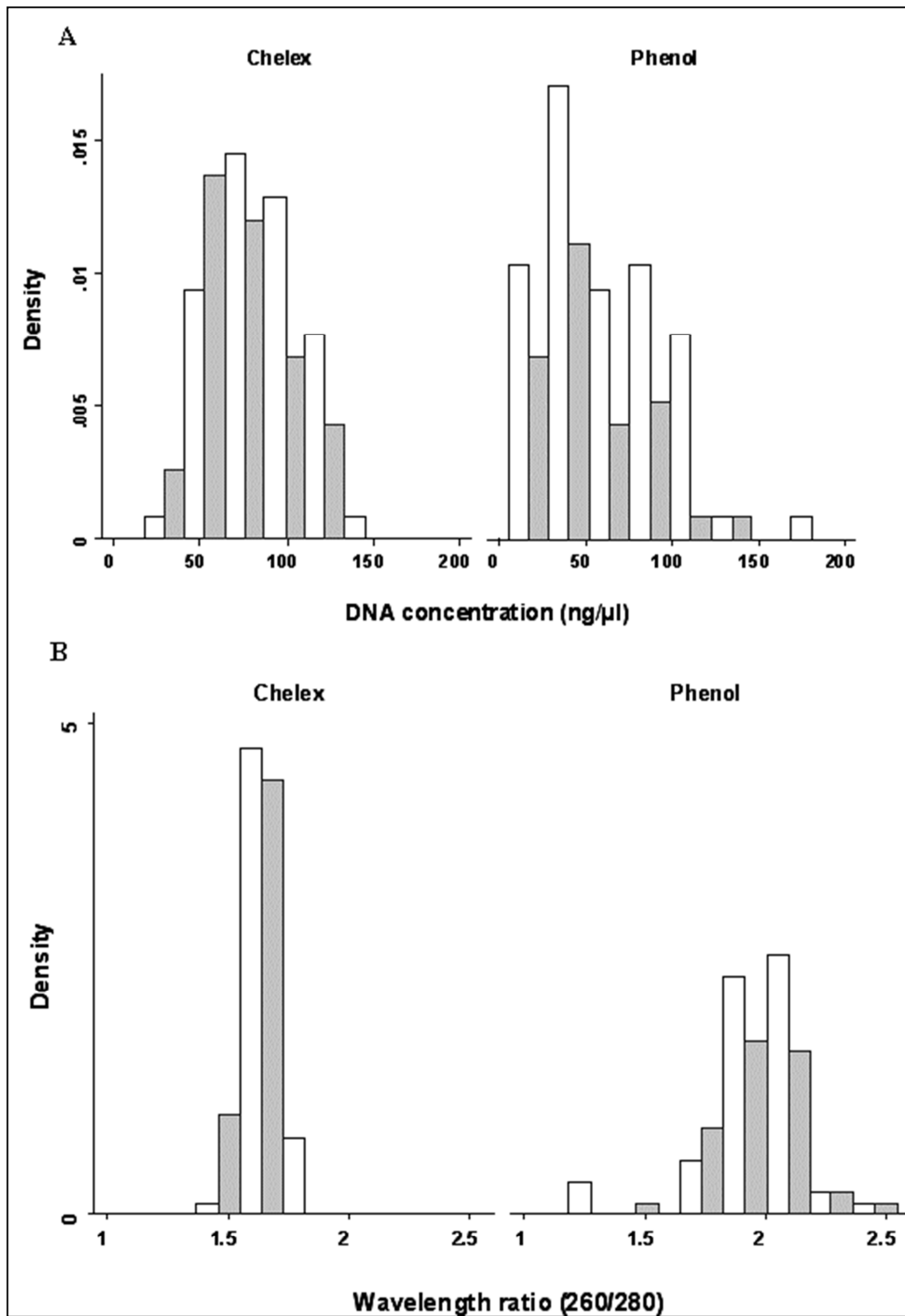


Figure 1 - Distribution of the DNA concentration (A) and the wavelength ratio (B) in function of the extraction method used.

3.2. Multiplex PCR

Several dilutions were necessary to observe the internal control signal both in the pools and individual samples.

Two pools out of the ten analyzed were positives for *Fasciola* spp. (both dilution 1/10) (**Figure 2**). The DNA from the twenty snails from both positive pools (eight and nine) was examined individually through the multiplex PCR (Figure not shown). Six snails out of ninety six (6.25%) harboured *Fasciola* spp. DNA. Noteworthy the ladder pattern is visible for the positive pools and snails. The inhibition rates were calculated both for pooled and individual DNA samples. Concerning pooled and individual samples, the inhibition rate decreased when the dilution factor increased. Respectively, for pooled samples, no diluted (100%), 10 fold dilution (30%) and 100 fold dilution (0%), for individual samples, no diluted (70%), 10 fold dilution (14%) and 100 fold dilution (0%).

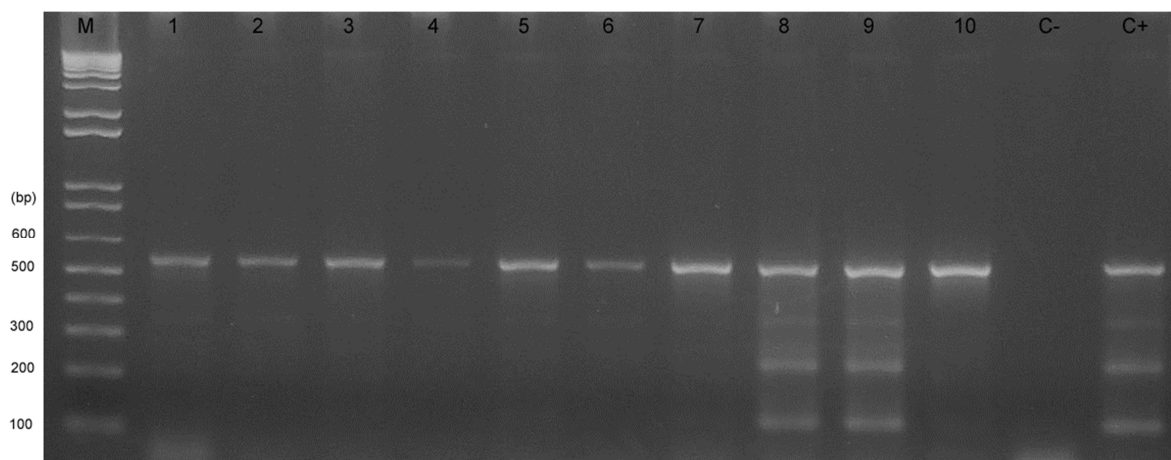


Figure 2 - Agarose gel electrophoresis following multiplex PCR on DNA pools. (M) Molecular size marker of 1000 bp; (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7), (10) *Fasciola hepatica* negative pools; (8), (9) *Fasciola hepatica* positive pools (both dilution 1/10); (C-) negative control; (C+) positive control.

3.3. Limit of detection

One pool (#9) (**Figure 3**) containing the DNA from one *F. hepatica* naturally infected snail and 9 negative specimens was used to assess the detection limit of the *Fasciola* spp. assay. The technique was able to detect up to a total DNA concentration of 100 pg. At a total DNA concentration of 10 pg both signals disappeared. With undiluted material (lane 1) the internal control was absent.

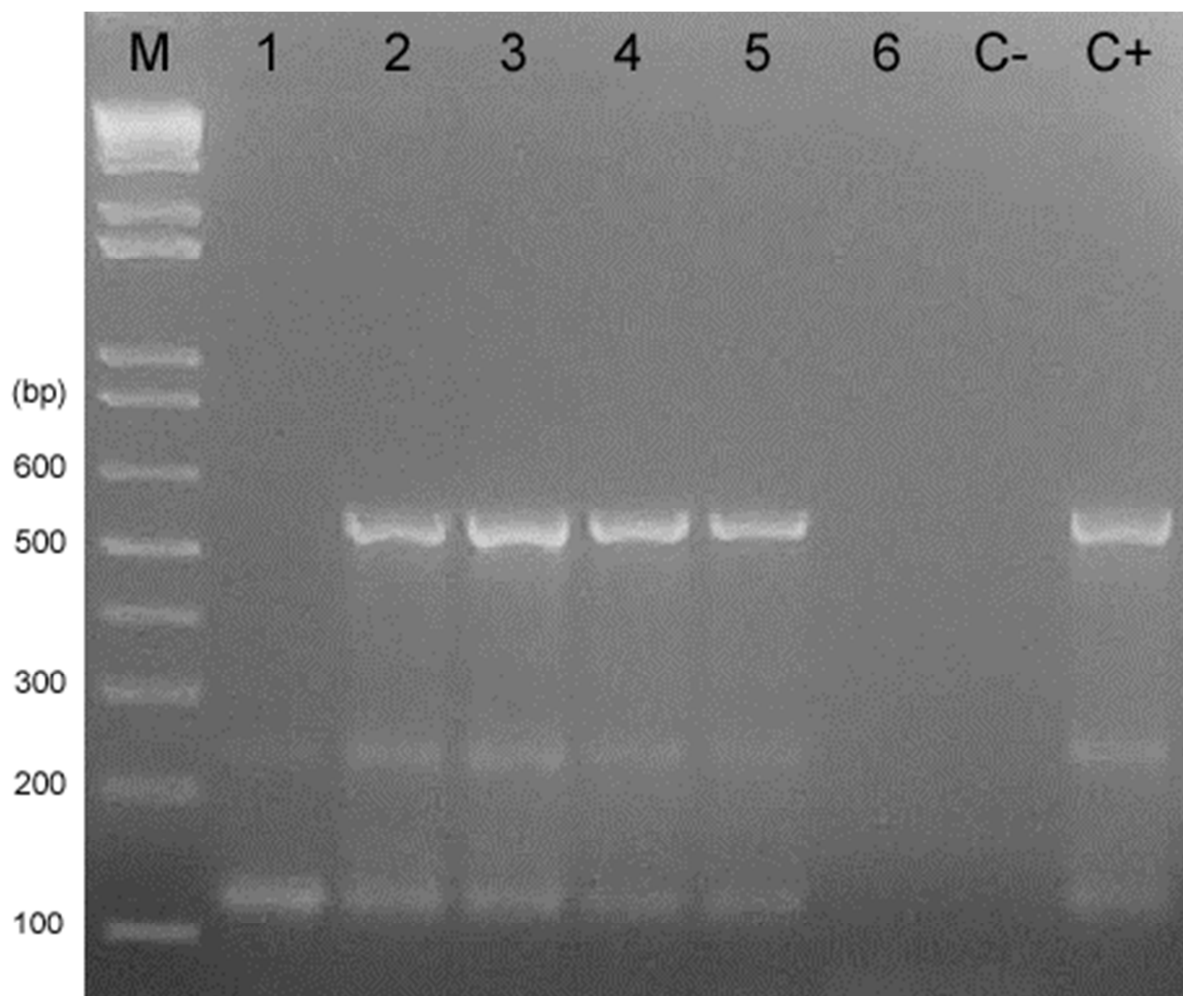


Figure 3 - Agarose gel electrophoresis following multiplex PCR for the illustration of the detection limit. Ten fold dilution of a pool (10 snails) containing only one snail naturally infected with *Fasciola* spp.. (M) Molecular size marker of 1000 bp; (1) 1 μ g; (2) 100 ng; (3) 10 ng; (4) 1 ng; (5) 100 pg; (6) 10 pg; (C-) negative control; (C+) positive control.

When the snail DNA concentration was constant but the *F. hepatica* DNA was decreasing (**Figure 4**), the *Fasciola* spp. 124 bp sequence disappeared at a DNA concentration of 100 fg although the ITS2 band remained visible.

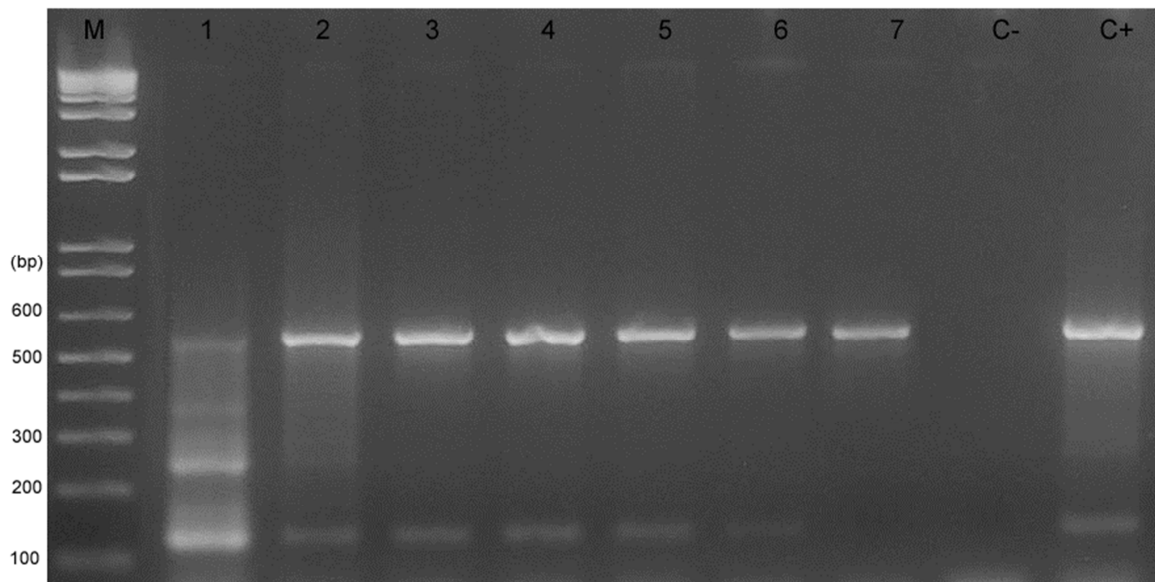


Figure 4 - Agarose gel electrophoresis following multiplex PCR for the illustration of the detection limit. Each PCR tube contains a constant quantity of snail DNA and a ten fold dilution of *Fasciola hepatica* DNA. (M) Molecular size marker of 1000 bp;(1) 100 ng snail DNA, 100 ng *Fasciola hepatica* DNA ;(2) 100 ng snail DNA, 10 ng *Fasciola hepatica* DNA ;(3) 100 ng snail DNA, 1 ng *Fasciola hepatica* DNA ;(4) 100 ng snail DNA, 100 pg *Fasciola hepatica* DNA ;(5) 100 ng snail DNA, 10 pg *Fasciola hepatica* DNA ;(6) 100 ng snail DNA, 1 pg *Fasciola hepatica* DNA ;(7) 100 ng snail DNA, 100 fg *Fasciola hepatica* DNA ;(C-) negative control;(C+) positive control.

3.4. Specificity

Figure 5 illustrates the results after amplification of DNA extracts obtained from related trematodes. No cross reactions were observed with, *D. lanceolatum* and *F. magna*. As far as *P. daubneyi* is concerned a band was detected between 400 and 500 bp. The internal control corresponded with the ITS2 sequence of *G. truncatula* (Genbank accession nos. AJ296271.1)

with an identity of 99%. The 124 bp sequence corresponded with the *F. hepatica* clone PFH5 genomic repeat sequence 2 (Genbank accession nos. U11818.1) with an identity of 96%.

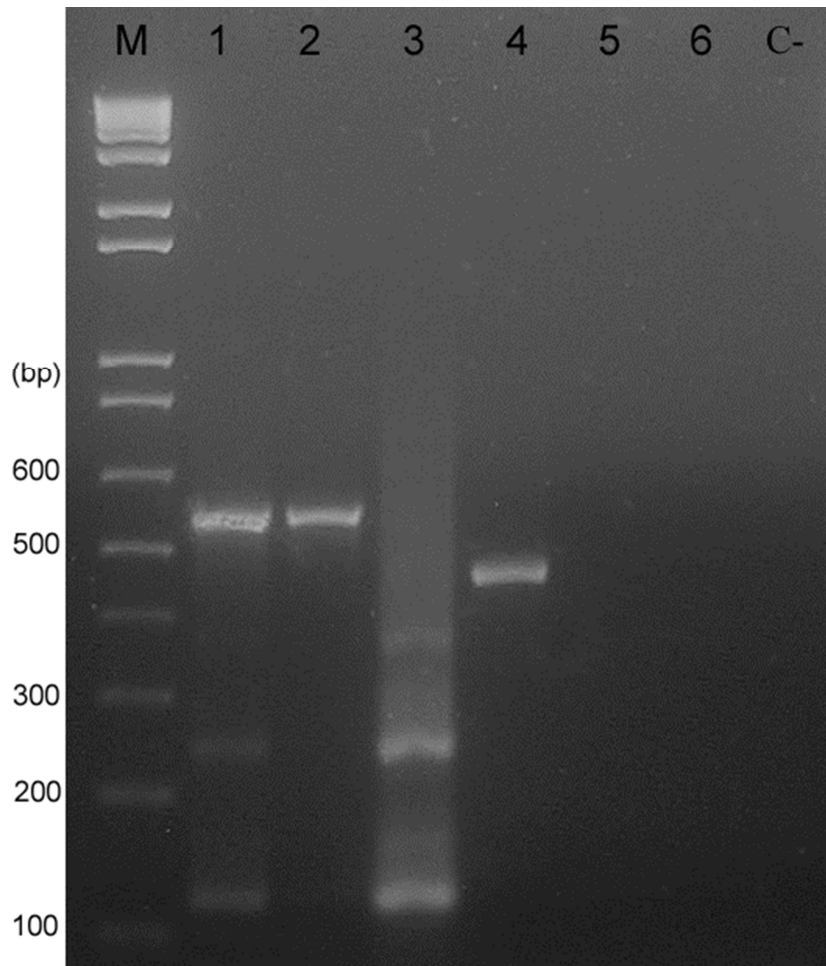


Figure 5 - Agarose gel electrophoresis following multiplex PCR for the illustration of the specificity of the assay. (M) Molecular size marker of 1000 bp; (1) DNA isolated from *Fasciola hepatica* naturally infested snail; (2) Non infested snail; (3) *Fasciola hepatica* adult; (4) *Paramphistomum daubneyi* adult; (5) *Dicrocoelium dendriticum* adult; (6) *Fascioloides magna* adult; C- negative control.

4. DISCUSSION

This is the first reported use of the Chelex® method to extract DNA from snails. The DNA yields and purity are statistically different with the two techniques (**Table I**). The yield of the Chelex® technique is better than the classical technique but the mean wavelength ratio for the first technique is lower than the 1.8-2 optimal ratio. This suggests that the purity of the DNA obtained by the Chelex® method is not as good as for the classical Phenol/Chloroform method. However the quality of Chelex® extracted DNA was tested in PCR and cloning/sequencing procedures with excellent results. The results show also a lower variability when using the Chelex®. The Chelex®-based DNA extraction is very simple, fast (5 versus 36 hours), and does not require organic solvents and multiple tube transfers. The extraction of snail DNA using Chelex® is, particularly regarding its time duration and its low cost, at least as efficient as the proteinase K and Phenol/Chloroform extraction making this technique an excellent procedure to analyze large samples from the field.

The prevalence of *F. hepatica* in naturally infected snails is often low. Indeed, the prevalence of a natural infestation in 52,000 *G. truncatula* collected in the United Kingdom was estimated through microscopy to be under 2% (Ollerenshaw, 1971). Most recently this prevalence was estimated at 1.7% in France (Dreyfuss et al., 2005). Among more recently developed techniques, PCR provides the most accurate information and shows high sensitivity and specificity levels (Caron et al., 2008). However, very few studies used these techniques to assess *Fasciola* spp. prevalences in the field. A study in Poland, based on a PCR that amplified the same 124 bp *Fasciola* spp. sequence indicated an overall prevalence of 26.6% (Kozak and Wedrychowicz, 2010). The prevalence is higher with PCR-based techniques than microscopy-based technique because of a better sensitivity of the DNA-based techniques (Caron et al., 2008). The amplification of RNA sequences was developed (Shubkin et al., 1992; Rognlie et al., 1996) but these techniques are very prone to contamination (RNAase) and time consuming.

Detection of *Fasciola* spp. by the multiplex PCR technique had been already applied in South America and the profiles generated shown numerous stair bands (four) referring to *F. hepatica* mitochondrial DNA (mDNA) amplification and two bands referring to *F. hepatica* ITS and *Pseudosuccinea columella* ITS (Magalhaes et al., 2004) or *L. viatrix* ITS (Magalhaes et al., 2008). Nevertheless, the multiplex PCR was tested on experimentally infected Brazilian snails,

and the whole protocol was not easy to perform nor optimized (classical DNA extraction, high stringency conditions, no pools and silver stained polyacrylamide gels).

In an epidemiological study, it is important to avoid false negative results, particularly when the sample size is large and the estimated prevalence is low. All examined samples were easily classified as infected or uninfected, contrary to other study (Cucher et al., 2006). The multiplex PCR used in this study allows to detect possible PCR inhibitors with the use of an internal control (ITS2). When the pooled samples were undiluted, the inhibition was complete but decreased to 30% when ten fold diluted and disappeared totally with another ten fold dilution. Concerning the individual sample, an inhibition of 70% was observed and decreased to 14% through the first ten fold dilution and disappeared with the last ten fold dilution. This suggests that pooled or individual samples should be assessed directly ten fold diluted. The presence of the internal control allowed us to avoid the use of BSA in each PCR mixture as it was previously done (Cucher et al., 2006). The ladder pattern is due to the fact that the 124 bp sequence is tandemly repeated in the entire *F. hepatica* genome (15%) (Kaplan et al., 1995).

The pooling of DNA is very useful particularly during large epidemiological studies, allowing to save time and money. In the present study, pools of DNA of 10 snails were used whereas in other studies up to 25 snails per pool were used (Rognlie et al., 1996). Several dilutions of pool nine (containing only one infected snails) indicated that both signals were visible up to 10,000 dilution. However with undiluted material, the internal control was undetectable and consequently an initial ten fold dilution is required. It seems that a contaminant linked to the snail DNA prevented at high concentration the amplification of the ITS2 sequence. This hypothesis is also supported by the fact that in 100% and 70% of the undiluted pools and individual samples respectively the ITS2 sequence was not amplified. The detection limit of *F. hepatica* DNA in 100 ng/ μ l of snail DNA was estimated to be one pg of *F. hepatica* DNA. This limit of detection is optimal because the minimal biological unit that infects a lymnaeid snail is a single miracidium, which contains about 0.5-1 ng of *F. hepatica* genomic DNA (Kaplan et al., 1997). This suggests that pools of DNA of up to ten snails can be used with this protocol.

As far as the specificity of the multiplex PCR was concerned, there was no cross reaction with the three trematode species tested. The band observed with *P. daubneyi* had no impact on the test interpretation. Although this band was not sequenced, alignments lead to rDNA region and

further experimentations will be necessary to assess the fact that ITS2 primers could detect a snail naturally infested with *P. daubneyi*.

To conclude, this new DNA extraction technique based on Chelex® showed numerous advantages because it is cheaper and less time consuming. The multiplex PCR was shown to have an optimal limit of detection and specificity. The technique seems particularly suitable to assess prevalence during large epidemiological studies. Its adaptation to other lymnaeid species which could act as alternative intermediate hosts for *F. hepatica* would be very useful.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to Dr. Bughin (ARSIA, Ciney) for providing *D. dendriticum* individuals and Prof. A. Marinculic (Fac. Vet. Med., Croatia) for providing *F. magna*. The authors thank the GIGA Genomic Facility (<http://www.giga.ulg.ac.be>).

REFERENCES

- Almeyda-Artigas, R.J., Bargues, M.D., Mas-Coma, S., 2000, ITS-2 rDNA sequencing of *Gnathostoma* species (*Nematoda*) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis in the Americas. *J. Parasitol.* 86, 537-544.
- Bargues, M.D., Vigo, M., Horak, P., Dvorak, J., Patzner, R.A., Pointier, J.P., Jackiewicz, M., Meier-Brook, C., Mas-Coma, S., 2001, European *Lymnaeidae* (*Mollusca: Gastropoda*), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. *Infect. Genet. Evol.* 1, 85-107.
- Bargues, M.D., Artigas, P., Mera, Y.S.R.L., Pointier, J.P., Mas-Coma, S., 2007, Characterisation of *Lymnaea cubensis*, *L. viatrix* and *L. neotropica* n. sp., the main vectors of *Fasciola hepatica* in Latin America, by analysis of their ribosomal and mitochondrial DNA. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 101, 621-641.
- Boray, J.C., 1978, The potential impact of exotic *Lymnaea* spp. on fascioliasis in Australasia. *Vet. Parasitol.* 4, 127-141.
- Caron, Y., Lasri, S., Losson, B., 2007, *Fasciola hepatica*: an assessment on the vectorial capacity of *Radix labiata* and *R. balthica* commonly found in Belgium. *Vet. Parasitol.* 149, 95-103.
- Caron, Y., Rondelaud, D., Losson, B., 2008, The detection and quantification of a digenean infection in the snail host with special emphasis on *Fasciola* sp. *Parasitol. Res.* 103, 735-744.
- Cucher, M.A., Carnevale, S., Prepelitchi, L., Labbe, J.H., Wisnivesky-Colli, C., 2006, PCR diagnosis of *Fasciola hepatica* in field-collected *Lymnaea columella* and *Lymnaea viatrix* snails. *Vet. Parasitol.* 137, 74-82.
- Dagnelie, P., 1998, Statistique théorique et appliquée. Inférence statistique à une et à deux dimensions, Vol Tome 2. De Boek Université, Bruxelles, Belgique, 659 p.

- Dreyfuss, G., Vignoles, P., Rondelaud, D., 2005, *Fasciola hepatica*: epidemiological surveillance of natural watercress beds in central France. *Parasitol. Res.* 95, 278-282.
- Kaplan, R.M., Dame, J.B., Reddy, G.R., Courtney, C.H., 1995, A repetitive DNA probe for the sensitive detection of *Fasciola hepatica* infected snails. *Int. J. Parasitol.* 25, 601-610.
- Kaplan, R.M., Dame, J.B., Reddy, G.R., Courtney, C.H., 1997, The prevalence of *Fasciola hepatica* in its snail intermediate host determined by DNA probe assay. *Int. J. Parasitol.* 27, 1585-1593.
- Ko, Y.T., Chan, M.M.Y., Ford, S.E., Fong, D., 1999, A PCR-ELISA method for direct detection of the oyster pathogen *Haplosporidium nelsoni*. *Mar. Biotech.* 1, 147-154.
- Kozak, M., Wedrychowicz, H., 2010, The performance of a PCR assay for field studies on the prevalence of *Fasciola hepatica* infection in *Galba truncatula* intermediate host snails. *Vet. Parasitol.* 168, 25-30.
- Krämer, F., 1999. Eignung einer Gensonde zum nachweis Derentwicklungsstadien von *Fasciola hepatica* Linne 1758 im Zwischenwirt. Tierärztliche Hochschule, Hannover.
- Krämer, F., Schnieder, T., 1998, Sequence heterogeneity in a repetitive DNA element of *Fasciola*. *Int. J. Parasitol.* 28, 1923-1929.
- Krämer, F., Schnieder, T., 1999, Untersuchungen über den Zwischenwirt von *Fasciola hepatica* mittels einer DNA-Sonde zur Etablierung eines epidemiologischen Diagnostikverfahrens. *Praktische Tierarzt* 80, 520-529.
- Magalhaes, K.G., Passos, L.K., Carvalho Odos, S., 2004, Detection of *Lymnaea columella* infection by *Fasciola hepatica* through Multiplex-PCR. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99, 421-424.
- Magalhaes, K.G., Jannotti-Passos, L.K., Caldeira, R.L., Berne, M.E., Muller, G., Carvalho, O.S., Lenzi, H.L., 2008, Isolation and detection of *Fasciola hepatica* DNA in *Lymnaea viatrix* from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues through multiplex-PCR. *Vet. Parasitol.* 152, 333-338.

- Mostafa, O.M., Taha, H.A., Ramadan, G., 2003, Diagnosis of *Fasciola gigantica* in snail using the polymerase chain reaction (PCR) assay. J. Egypt. Soc. Parasitol. 33, 733-742.
- Ollerenshaw, C.B., 1971, Some observations on the epidemiology of fascioliasis in relation to the timing of molluscicide applications in the control of the disease. Vet. Rec. 88, 152-164.
- Rognlie, M.C., Dimke, K.L., Potts, R.S., Knapp, S.E., 1996, Seasonal transmission of *Fasciola hepatica* in Montana, USA, with detection of infected intermediate hosts using a DNA-based assay. Vet. Parasitol. 65, 297-305.
- Schweizer, G., Braun, U., Deplazes, P., Torgerson, P.R., 2005, Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. Vet. Rec. 157, 188-193.
- Schweizer, G., Meli, M.L., Torgerson, P.R., Lutz, H., Deplazes, P., Braun, U., 2007, Prevalence of *Fasciola hepatica* in the intermediate host *Lymnaea truncatula* detected by real time TaqMan PCR in populations from 70 Swiss farms with cattle husbandry. Vet. Parasitol. 150, 164-169.
- Shubkin, C.D., White, M.W., Abrahamsen, M.S., Rognlie, M.C., Knapp, S.E., 1992, A nucleic acid-based test for detection of *Fasciola hepatica*. J. Parasitol. 78, 817-821.
- Taylor, E.L., 1965, Fascioliasis and the liver fluke, Vol 64, FAO Agricultural Studies Edition Rome, 253 p.
- Torgerson, P., Claxton, J., 1999, Epidemiology and control, In: Dalton, J.P. (Ed.) Fasciolosis. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, U.K., pp. 113-149.
- Velusamy, R., Singh, B.P., Raina, O.K., 2004, Detection of *Fasciola gigantica* infection in snails by polymerase chain reaction. Vet. Parasitol. 120, 85-90.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R., 1991, Chelex®100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques 10, 506-513.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W., 2000, A greedy algorithm for aligning DNA sequences. J. Comput. Biol. 7, 203-214.

ÉTUDE 3

Préambule

Cet article a été publié dans *Parasite & Vectors* en 2014, dans le volume 7 et à partir de la page 66.

Nous savons depuis l'**étude 1** que certains hôtes intermédiaires autres que l'hôte intermédiaire principal en Europe (*G. truncatula*) sont peut-être impliqués dans le cycle de vie de *F. hepatica*. Ils sont en tout cas capables d'excréter des stades infestants pour le rat. L'**étude 2** nous a montré comment il est possible d'optimiser l'extraction d'ADN et la PCR pour réaliser des investigations de grandes ampleurs sur le terrain. Il est donc maintenant possible d'appliquer ces techniques et de quantifier l'infestation de ces hôtes intermédiaires par le parasite pour évaluer le poids épidémiologique de ces espèces en Belgique. Quelles sont les espèces de limnées impliquées dans le cycle de la douve du foie en Belgique ? Quelle est la prévalence du parasite chez ces espèces ? Quels liens peut-on faire avec les facteurs biotiques et abiotiques ?

New insight in lymnaeid snails (Mollusca, Gastropoda) as intermediate hosts of *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea) in Belgium and Luxembourg.

Y. CARON¹, K. MARTENS², L. LEMPEREUR³, C. SAEGERMAN⁴, B. LOSSON¹

¹*Research Unit in Parasitology and Parasitic Diseases, Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium*

²*Freshwater Biology, Royal Belgium Institute of Natural Sciences, Brussels, Belgium*

³*Institute of Infection, Immunity & Inflammation, College of Medical, Veterinary & Life Sciences, University of Glasgow, Bearsden Road, Glasgow G61 1QH, Scotland (UK)*

⁴*Research Unit in Epidemiology and Risk Analysis applied to Veterinary Sciences (UREAR-ULg), Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium*

ABSTRACT

The present study aims to assess the epidemiological role of different lymnaeid snails as intermediate hosts of the liver fluke *Fasciola hepatica* in Belgium and Luxembourg.

During summer 2008, 7103 lymnaeid snails were collected from 125 ponds distributed in 5 clusters each including 25 ponds. Each cluster was located in a different biogeographic area of Belgium and Luxembourg. In addition, snails were also collected in sixteen other biotopes considered as temporary wet areas. These snails were identified as *Galba truncatula* (n=2474) (the main intermediate host of *F. hepatica* in Europe) and *Radix* sp. (n=4629). Moreover, several biological and non-biological variables were also recorded from the different biotopes. DNA was extracted from each snail collected using Chelex® technique. DNA samples were screened through a multiplex PCR that amplifies lymnaeid internal transcribed spacer 2 gene sequences (500-600 bp) (acting as an internal control) and a 124 bp fragment of repetitive DNA from *Fasciola* sp.

Lymnaeid snails were found in 75 biotopes (53.2%). Thirty individuals of *G. truncatula* (1.31%) and 7 of *Radix* sp. (0.16%) were found to be positive for *Fasciola* sp. The seven positive *Radix* sp. snails all belonged to the species *R. balthica* (Linnaeus, 1758). Classification and regression tree analysis were performed in order to better understand links and relative importance of the different recorded factors. One of the best explanatory variables for the presence/absence of the different snail species seems to be the geographic location, whereas for the infection status of the snails no obvious relationship was linked to the presence of cattle.

Epidemiological implications of these findings and particularly the role of *R. balthica* as an alternative intermediate host in Belgium and Luxembourg were discussed.

Keywords: *Fasciola* sp., *Radix balthica*, *Galba truncatula*, Multiplex PCR, Epidemiology

1. INTRODUCTION

Fasciola hepatica is a digenean platyhelminth parasite, also called liver fluke, which induces fasciolosis mainly in domestic ruminants and humans. This disease is responsible for important financial loss on livestock production worldwide. In northern Belgium (Flanders), the yearly cost of infection in dairy production was estimated to be around 8.2 million € (Charlier et al., 2009), and approximately 52 million € in Switzerland (Schweizer et al., 2005).

Liver fluke needs a lymnaeid snail as intermediate host to complete its life cycle. Although *Galba truncatula* plays this role in Europe (Taylor, 1965; Torgerson and Claxton, 1999), it seems that other lymnaeid species could also act as alternative intermediate hosts (Boray, 1978). Globally about 20 species of *Lymnaeidae* were described as potential intermediate hosts of *Fasciola* spp. (Torgerson and Claxton, 1999). In Europe, several species were experimentally infected or found naturally infected with *F. hepatica*. These species belong to species of the genera *Lymnaea* (Boray, 1966; Dreyfuss et al., 2000a; Dreyfuss et al., 2002; Furmaga and Gundlach, 1967a, b, 1969), *Omphiscola* (Abrous et al., 1996; Abrous et al., 1998, 1999; Dreyfuss et al., 2007; Sindou et al., 1991; Vignoles et al., 2002), *Stagnicola*, *Pseudosuccinea* (Pointier et al., 2007), and *Radix* (Boray, 1966, 1967; Caron et al., 2007; Dreyfuss et al., 2002; Dreyfuss et al., 2000b; Furmaga

and Gundlach, 1969; Relf et al., 2009; Sindou et al., 1991; Vignoles et al., 2002). These observations suggest that many different species of lymnaeid snails may be potential hosts for the larval stages of *F. hepatica*.

In a previous study, *R. labiata* (Rossmassler, 1835) was suspected to act as an alternative intermediate host of *F. hepatica* in Belgium since it harbored the intra-molluscan development and allowed subsequent shedding of cercariae. Furthermore, these metacercariae were as infective as those produced in *G. truncatula* as demonstrated by parasitological and serological data collected from experimentally infected rats (Caron et al., 2007). Recently, a lymnaeid snail species collected in Ireland was found to be naturally infected by *F. hepatica* and was identified as *R. peregra* by PCR amplification and sequencing of internal transcribed spacer 2 (ITS-2) gene (Relf et al., 2009).

Systematics of the family *Lymnaeidae* is controversial as its members can exhibit a great diversity in shell morphology with extremely homogeneous internal anatomical traits (Correa et al., 2011). Furthermore, for sibling species belonging to the genus *Radix*, morphometric analyses demonstrated, that shell shape was unsuitable to define homogeneously and discretely recognizable entities, because the variation was continuous (Pfenninger et al., 2006). Taxonomy, deduced from rDNA sequences, particularly the ITS-2 may help to differentiate between lymnaeid species (Bargues and Mas-Coma, 2005).

Several techniques aim to detect *Fasciola* sp. in the snail intermediate host such as microscopy or molecular techniques (Caron et al., 2008). The latter technique should be effective and cheap enough to screen large numbers of individuals for naturally infected snails. Some studies (Cucher et al., 2006; Kaplan et al., 1997; Kozak and Wedrychowicz, 2010; Martinez-Ibeas et al., 2013; Relf et al., 2009; Rognlie et al., 1996; Schweizer et al., 2007) used molecular biology - based tools to investigate prevalence of *F. hepatica* in lymnaeids, but very few were tested on naturally infected snails collected in the field.

The aims of the present study were firstly, to assess analytic reliability of DNA extraction and multiplex PCR during a nationwide sampling campaign. Secondly, the potential epidemiological role of other lymnaeid species (*Radix* spp.) was assessed regarding the presence of *F. hepatica* in Belgium and Luxembourg. Finally, the presence and abundance of snails and the prevalence of

larval stages of *F. hepatica* in the snail populations were studied in relation with biological and non-biological variables pertaining to the studied ponds.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Sampling

Five biogeographic regions were characterized in Belgium and Luxembourg: Polders, Sand region, Loam region, Chalk region and Gutland (**Figure 1**). In each of these regions, five circular areas of 38 km² were defined, into which 5 ponds were randomly selected. A total of 125 ponds were thus selected according to a strict a priori defined spatial design. Lymnaeid snails (> 4 mm) were sampled in each pond (and surrounding permanent wet area) and additionally in 16 temporary wet areas during summer (July - August) 2008.

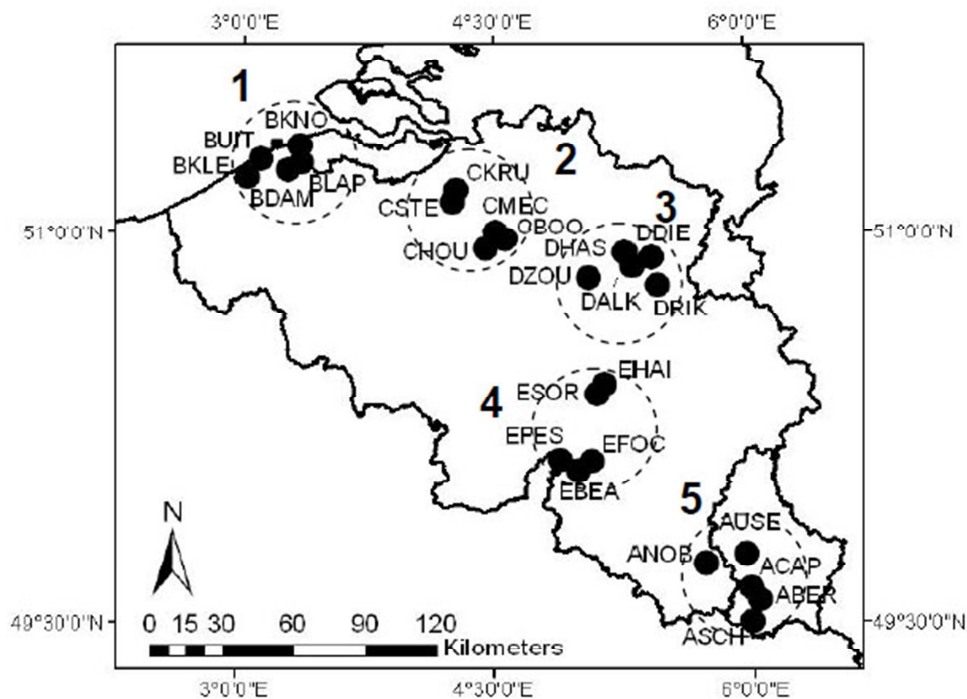


Figure 1 - Location of the 25 pond clusters (abbreviations) spread over five biogeographic regions in Belgium/Luxembourg: 1) Polders (BKNO, BUIT, BKLE, BDAM, BLAP), 2) Sand region (CKRU, CSTE, CHOU, CBOO, CMEC), 3) Loam region (DHAS, DZOU, DALK, DRIK, DDIE), 4) Chalk region (ESOR, EPES, EBEA, EFOC, EHAI), 5) Gutland (ANOB, ASCH, ABER, ACAP, AUSE).

Snails were collected during a maximum of 15 minutes in spots separated by 4-5 meters all around each pond (irrespective to the presence/absence of snails) and immediately placed in a tube containing 70% alcohol. Several variables were also measured such as GPS coordinates, temperature, pH, soil type (clay, silt, sand, stone), and presence of fence, cattle, trampling, and faecal pats. Ponds were classified in three types: (i) intensively used, mostly characterized by a surrounding environment with high agricultural or breeding of cattle activity, (ii) natural, representing ponds in nature reserves and (iii) extensively used, surrounded by environments with intermediate agricultural or cattle breeding activity. Morphological identification was based on a dichotomous key (Janssen and Vogel, 1965) allowing discrimination between *G. truncatula* and *Radix* sp. using a binocular microscope (x10). Snails were stored in alcohol 70% until further analyses.

2.2. DNA extraction and pooling

DNA extraction was based on Chelex® method as previously described (Caron et al., 2011). Briefly, the snail was mechanically disrupted with the help of a pellet mixer (Trefflab) in 100 µl of Chelex® 5% (BioRad) and incubated for one hour at 56°C and 30 min at 95°C in a Peltier Thermal Cycler (MJ Research). The mixture was centrifuged at 13,000 x g for seven minutes. The supernatant was collected and stored at -20°C until further analyses. DNA concentration and quality (260/280 wavelength ratio) were measured using a spectrophotometer (Thermo Scientific, NanoDrop 1000).

In order to reduce the number of PCRs, pools of individuals of the same genus were formed by mixing together one µl of each DNA sample with a maximum of 10 snails per pool. This mixture was considered undiluted. One µl of the mixture was then tested in the multiplex PCR described below.

The absence of internal control amplification (PCR inhibitors) for a pooled or an individual sample was assessed through 1/10 and 1/100 dilutions. Furthermore, the addition of 0.05% Bovine Serum Albumin (BSA) in the PCR mixture at 1/10 dilution was tested for samples with absence of internal control amplification whereupon negative samples were definitely excluded from the study.

2.3. Multiplex PCR and sequencing reaction

A multiplex PCR assay (Caron et al., 2011) was used to amplify a highly repeated 124 bp sequence (microsatellite) specific for *Fasciola* spp. (Kaplan et al., 1995) and ITS-2 rDNA sequence specific for lymnaeids (500-600 bp). ITS-2 sequence of the snail acts as a PCR internal control as its absence indicates potential presence of PCR inhibitors. The primers used for amplification of *Fasciola* spp. sequences were Fsh1 5'-GAT-CAA-TTC-ACC-CAT-TTC-CGT-TAG-TCC-TAC-3' and Fsh2 5'-AAA-CTG-GGC-TTA-AAC-GGC-GTC-CTA-CGG-GCA-3' and for lymnaeids ITS-2 amplification were News2 5'-TGT-GTC-GAT-GAA-GAA-CGC-AG-3' and Its2Rixo 5'-TTC-TAT-GCT-TAA-ATT-CAG-GGG-3' (Almeyda-Artigas et al., 2000; Bargues et al., 2001). The sequences were amplified using a commercial kit (Taq PCR Master Mix, Qiagen) in a total volume of 25 µl in a Peltier Thermal Cycler (MJ Research) with an initial denaturation step at 95°C for five minutes, followed by 40 cycles, each comprising denaturation at 95°C for one minute, annealing at 56°C for one minute, extension at 72°C for one minute and a final extension step at 72°C for ten minutes. The amplification products were electrophoretically resolved in 2% agarose gels and stained with ethidium bromide. The limit of detection and specificity of this multiplex PCR were studied in a previous study (Caron et al., 2011).

ITS-2 rDNA sequence of 100 *Radix* sp. (93 randomly selected and 7 *Fasciola* sp. positive samples) were amplified and sequenced for species identification. ITS-2 DNA products were purified using MSB-Spin PCRapace (Invitek). Cycle sequencing reactions were performed (in duplicate and in both direction) by BigDye terminator v3.1 (3730 DNA analyzer; Applied Biosystems) by GIGA Genomics Facility (Liège University, Belgium). Consensus sequences were made according to the results of sequencing of the PCR products and were analyzed using BLASTn searches in GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) and aligned using BioEdit 7.0.9.0 (Hall, 1999).

2.4. Statistical analysis

2.4.1. Classification and regression tree (CART) analysis

A CART analysis is a non-linear and non-parametric model that is fitted by binary recursive partitioning of multidimensional covariate space (Breiman et al., 1984). Using CART 6.0 software (Salford Systems, San Diego, CA, USA), the analysis successively splits the dataset into increasingly homogeneous subsets until it is stratified and meets specified criteria. CART

performs cross validation by growing maximal trees on subsets of data then calculating error rates based on unused portions of the data set.

When the primary splitting variable is missing for an individual observation, that observation is not discarded but, instead, a surrogate splitting variable is sought. Thus, the program uses the best available information in the face of missing values. In datasets of reasonable quality, this allows all observations to be used. This is a significant advantage of this methodology over more traditional multivariate regression modelling, in which observations that are missing *any* of the predictor variables are often discarded. Further details about CART are presented in previously original papers or reviews (Saegerman et al., 2011; Zanella et al., 2013).

A CART analysis was conducted on two data sets. Four different analyses were performed. For CART I and II, the dependant variable was the presence of *Radix* sp. or *G. truncatula*, respectively and the independent variables were the county of origin of the pond, geologic characteristics of the soil, type and depth of pond, and temperature and pH of the water. For CART III and IV, the dependant variable was the presence of infected *Radix* sp. or *G. truncatula* in ponds, respectively and the independent variables were the presence of fences, (traces of) presence of animals, the type of pond and the number of specimens of *Radix* sp. or *G. truncatula*.

2.4.2. Assessment of lymnaeid presence data

The presence of *Radix* sp. and *G. truncatula* in all the biotopes were compared in order to assess their agreement with our results using Fisher's exact test (Dagnelie, 1998) and concordance analysis. The level of agreement was also expressed in terms of indices of positive and negative agreement (Cicchetti and Feinstein, 1990), respectively the observed agreement proportion for positive and negative results (i.e., presence and absence).

3. RESULTS

3.1. Sample collection

Seven thousand one hundred and three lymnaeid snails were collected during summer 2008 of which 2474 were morphologically identified as *G. truncatula* (34.8%) and 4629 as *Radix* sp. (65.2%) (**Figure 2**). Lymnaeid snails were found in 53.2% (75/141) of biotopes investigated, in

which *G. truncatula* was found in 60% (45/75) of all the biotopes and 80% (36/45) in ponds, whereas *Radix* sp. was recorded in 64% (48/75) of all the biotopes and 85.4% (41/48) in ponds. A percent of 35.8% (886/2474) and 8.2% (378/4629) of the collected *G. truncatula* and *Radix* sp. were collected from the sixteen temporary wet areas respectively. *G. truncatula* and *Radix* sp. were present together in 24% (18/75) of the biotopes. *G. truncatula* was most abundant in Sand, Loam and Chalk Regions (83.2%). Most of the *Radix* species were found in Polders (57.2%), where *G. truncatula* were relatively under-represented.

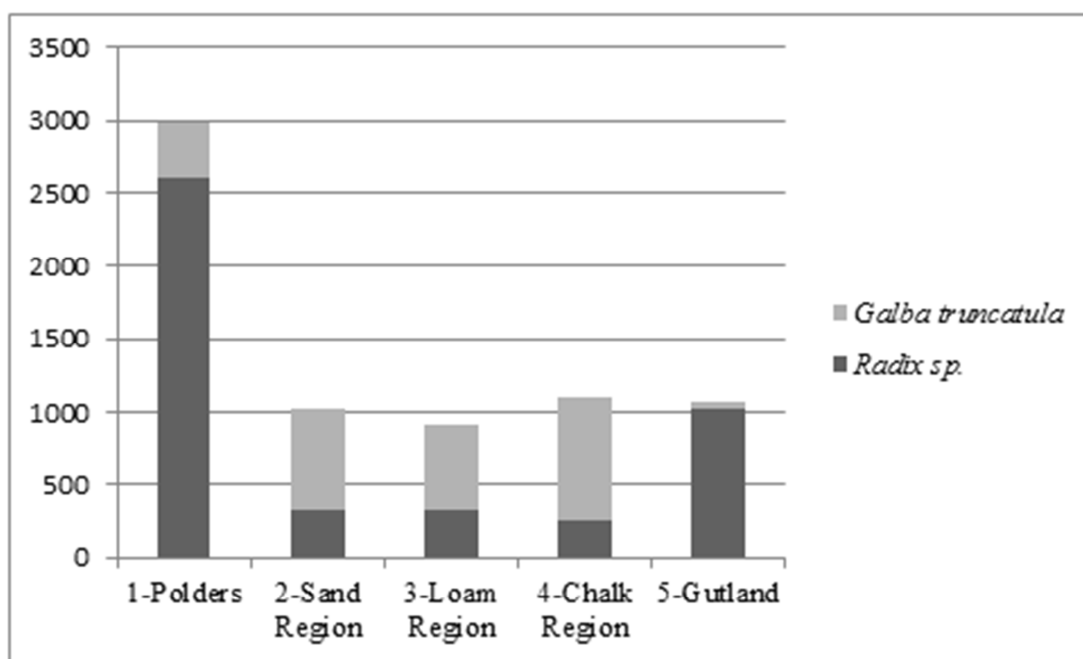


Figure 2 – Number of *G. truncatula* and *Radix* sp. found in the five biogeographic regions.

3.2. Multiplex PCR and sequencing

Two thousand four hundred and seventy four *G. truncatula* were pooled in 271 batches. Although different dilution factors were tested (undiluted, 1/10, 1/100 and 1/10 + BSA), 195 snails (7.89%) were eliminated from the study due to PCR inhibition. Twenty eight pools containing 270 snails were found positive for *Fasciola* sp. These 270 snails were individually screened using the

multiplex PCR and 30 *G. truncatula* were found positive, resulting in a prevalence of 1.31% (30/2279).

Four thousand six hundred and twenty nine *Radix* sp. were pooled in 486 batches of a maximum of 10 snails each. Four hundred and four snails (8.77%) were eliminated from the study due to PCR inhibition. The 124 bp specific band of *Fasciola* sp was amplified in six pools (60 snails). These 60 snails were individually tested and 7 snails were positive. The frequency of snails with parasite DNA in *Radix* sp. was estimated to be 0.16% (7/4225). The geographical location of ponds where *Fasciola* sp. infected snails was found is illustrated in **Figure 3**.

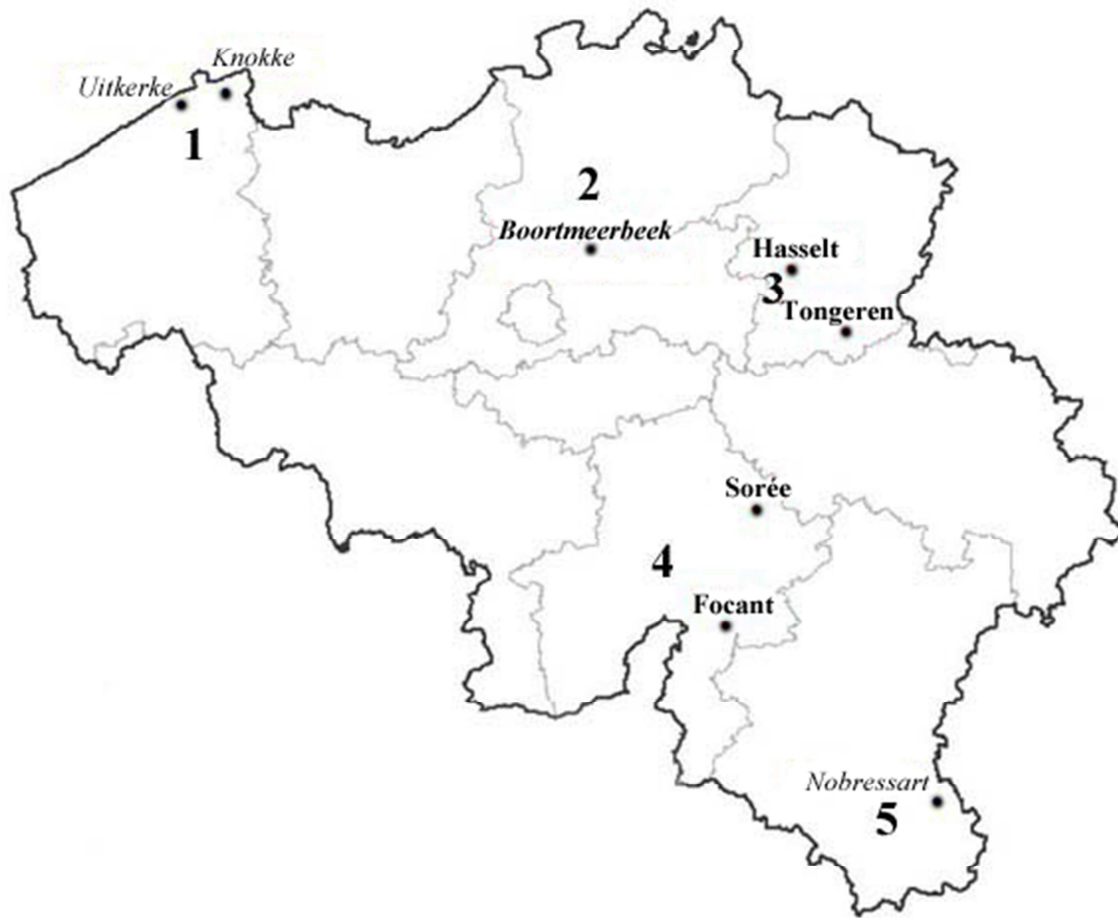


Figure 3 – Location of the ponds where *Fasciola* sp. infected snails species were found: 1) Polders, 2) Sand region, 3) Loam region, 4) Chalk region, 5) Gutland; Bold for *G. truncatula*; Italic for *Radix* sp.; Italic and bold for pond where *G. truncatula* and *Radix* sp. were found infected.

In order to accurately identify *Radix* sp., ITS-2 of the 7 *Fasciola* sp. DNA positive *Radix* sp. and 93 other *Radix* sp. randomly selected were sequenced. Ninety eight sequences (named as PRT1) [GenBank: KC544264] were found to be 100% identical to *R. peregra* (Müller, 1774) (GenBank: HQ283271.1). The two remaining sequences (named as PRT2) [GenBank: KC544265] were identified as 100% identical to *R. labiata* (Rossmassler, 1835) [GenBank AJ319637.1]. The 7 *Radix* sp. positive for *Fasciola* sp. all belonged to PRT1.

3.3. Statistical analysis

3.3.1. CART analysis

Presence/absence

The presence/absence of *G. truncatula* (CART I) and *Radix* sp. (CART II) were assessed for the 125 sampled ponds using CART analysis. **Table 1** presents results of both CART analyses. The geographic location seems to be the best explanatory variable for the presence of *G. truncatula* and *Radix* sp. Presence of *G. truncatula* seems strongly linked to pH, water temperature and ground type whereas presence of *Radix* sp. is essentially related to the ground type.

Table 1 – CART analysis I (*G. truncatula*) and II (*R. balthica*): Presence/absence; Explanatory percentage for each of the independent variables was indicated.

<i>G. truncatula</i>		<i>R. balthica</i>	
County	100 %	County	100 %
pH	73 %	Ground type	59.25%
Water temperature	46.81%	Pond type	23.04%
Ground type	45.32%	Water temperature	23.04%
Pond type	13.85%	pH	14.25%
Tree sensibility	84.44%	Tree sensibility	81.25%
Tree sensitivity	81.25%	Tree sensitivity	60.22%

Infected/non infected

The infection status of *G. truncatula* (CART III) and *Radix* sp. (CART IV) was also assessed using CART analysis. **Table 2** presents results of both CART analyses. The number of collected snails was identified as the best explanatory factor. Factors relative to cattle presence (trampling, faecal pats, and fence) was not linked to the infection status.

Table 2 – CART analysis II (*G. truncatula*) and IV (*R. balthica*): Infection status; Explanatory percentage for each of the independent variables was indicated

<i>G. truncatula</i>		<i>R. balthica</i>	
<i>Number of snail</i>	100 %	<i>Number of snail</i>	100 %
<i>Pond type</i>	22.14 %	<i>Ground type</i>	29.84%
Tree sensibility	83.33%	Tree sensibility	100%
Tree sensitivity	97.78%	Tree sensitivity	82.35%

3.3.2. Assessment of lymnaeid presence data

The distribution of *G. truncatula* and *Radix* sp. was not significantly different within biotopes (Fischer's exact test; $P=0.34$). The P_{pos} and P_{neg} are 0.39 and 0.70, respectively.

4. DISCUSSION

This is the first time a molecular based technique has been used to assess natural *Fasciola* sp. prevalence in intermediate hosts in Belgium. One hundred and twenty five ponds and sixteen other interesting areas in five different biogeographic regions in Belgium and Luxembourg were sampled for snails with environmental factors information. In Belgium in 2008, winter and spring were particularly mild. Furthermore, during that summer the rainfall and the number of rainy days were quite abnormal (Royal Meteorological Institute of Belgium; <http://www.meteo.be>).

Those conditions are the most suitable for snail development. More than half of these biotopes (53.2%) were colonized with lymnaeid snails. Soil composition in Flanders (sand, silt) in Polders, Sand Region, and Loam region seem to be suitable for the development of lymnaeid snails. A great diversity in shell morphology with extremely homogenous anatomical traits created a great confusion regarding the systematics of lymnaeids especially those belonging to the genus *Radix*. Some authors (Bargues and Mas-Coma, 2005) considered *R. peregra* (Müller, 1774) as a synonym of *R. ovata* (Draparnaud, 1805) and *R. balthica* (Linnaeus, 1758), while others maintained all species as valid (Correa et al., 2010). In this present study, *R. balthica* was used to represent all of these synonymous species (*R. peregra* = *R. ovata* = *R. balthica* = PRT1) because the name *R. peregra* was abandoned by Bargues *et al.* (Bargues et al., 2001). The genus *Radix* was more represented than the main intermediate host of *F. hepatica* since only one third of the 7103 collected snails belonged to the species *G. truncatula*. Indeed, *R. balthica* (= *R. peregra* = *R. ovata*) is considered as a very widespread and resilient species (Pfenninger et al., 2011), which is able to live in waste water (Baur and Ringeis, 2002), in contrast to *G. truncatula*. Furthermore, ponds are not typical biotopes of *G. truncatula*, which prefers peripheral extremities of open drainage furrows, spring head surroundings, temporary wet meadow, and ditches (Rondelaud et al., 2009). In sixteen of those specific biotopes, *G. truncatula* (35.8%) was more frequent than *Radix* sp. (8.2%). However, the Fisher's exact test indicates that there is no difference between lymnaeid fauna composition and biotopes (permanent wet vs temporary wet areas). Prevalence of *F. hepatica* in permanent and temporary water habitats were never compared even though some consider these as equal (Chapuis et al., 2007).

Establishment of pools including a maximum of 10 snails was advantageous to reduce PCR number and consequently cost and time consumption. The proportion of PCR inhibition was relatively high despite dilution and use of BSA (Caron et al., 2011; Cucher et al., 2006). More than 66% (130/195) of the discarded *G. truncatula* snails were collected in a tractor track probably polluted with some PCR inhibitors (complex polysaccharide, humic acid, or proteinase).

Fasciola sp. prevalence was evaluated to 1.31% in *G. truncatula* and 0.16% in *Radix* sp using an optimized multiplex PCR. This PCR-based prevalence is relatively low in the main intermediate host of liver fluke in Europe, particularly when compared to prevalence obtained with microscopy-based techniques (Caron et al., 2008). This could be due to the pooling process,

which is responsible for a dilution of PCR available DNA (up to 1/100). However, in a previous study (Caron et al., 2011) a pool containing the DNA from one *F. hepatica* naturally infected snail and 9 negative specimens, was found positive using the same technique (total DNA concentration of 100 pg (1/10.000 dilution)). Only two studies assessed the prevalence of *Fasciola* sp. in naturally infested *G. truncatula* with PCR-based techniques. In Poland, a preliminary study using a limited number of snails (<200) and based on the same 124 bp repeated sequence (Kozak and Wedrychowicz, 2010) estimated the prevalence to be 26.2%. In Switzerland (Schweizer et al., 2007) more than 4700 snails were collected with a prevalence estimated to be 7% using a real time TaqMan PCR. Nevertheless, these snails were collected in infected cattle farms and the real regional prevalence was probably overestimated.

Fasciola sp. infection rates in other intermediate hosts vary greatly from less than 1% to more than 60%: 0.032% (1/3072) in *L. modicella* (Rognlie et al., 1996); 1.5% (79/5246) in *Fossaria cubensis* (Kaplan et al., 1997); 51.3% (123/240) in *L. columella* and 61.8% (21/34) in *L. viatrix* (Cucher et al., 2006). In Ireland, a study (Relf et al., 2009) using PCR amplifying a part of the cytochrome c oxidase subunit 1 (COX-1) gene provided prevalence of 73.9% (n=17) in *Succinea* sp. and from 10.3% (n=8) to 61.1% (n=22) in *R. balthica* (= *R. peregra* = *R. ovata*). *Radix balthica* may harbour incidental infection and experimental infections are difficult to implement (MCReath, 1978; Smith and Crombie, 1982). However, other authors have shown (Bargues and Mas-Coma, 2005; Caron et al., 2007; Dreyfuss et al., 2000b; Relf et al., 2009) that *R. balthica* can maintain intermolluscan stages of *F. hepatica* enabling the parasite to multiply. The frequency of snails with parasite DNA obtained for *R. balthica* in this study was very low and its epidemiological role seems weak. Nevertheless, *R. balthica* (= *R. peregra* = *R. ovata*) are more aquatic and more invasive (Faltynkova et al., 2006) than amphibious *G. truncatula* and could lead to the extension of fasciolosis in previously free areas, particularly where *G. truncatula* is absent (Abrous et al., 1998; Boray, 1966; Relf et al., 2009). The genus *Radix* seems to be very permissive to Trematoda infection as natural infections were recorded for *F. gigantica* (Velusamy et al., 2004) *Fascioloides magna* (Faltynkova et al., 2006), *Trichobilharzia regenti* (Hunova et al., 2012; Skirnisson et al., 2009), and *T. franki* (Jouet et al., 2010), and finally echinostomatid species (Bargues et al., 2001). The reasons for this parasitic tolerance are poorly understood although widespread distribution, high density and immune mechanisms of this genus seem to be the most plausible hypothesis. Studies on niche modeling predicted northward expansion of *R.*

balthica (= *R. peregra* = *R. ovata*), as already observed in Sweden probably due to increasing water temperature in lakes (M. Pfenninger, unpublished data). During a previous study (Caron et al., 2007), *R. labiata* (Rossmassler, 1835) (= PRT2) was shown to be able to shed cercariae. The metacercariae obtained were infective to rats in the laboratory contrary to metacercariae obtained from experimentally infected *R. balthica*. This could be linked to the difficulties encountered during breeding of this last species under laboratory conditions (highest average mortality: 54%) (Caron et al., 2007) or prevalence variability between populations as it was described for *G. truncatula* (Dreyfuss et al., 2006). Furthermore this species was under-represented in the samples.

The presence/absence of lymnaeids and their infestation status were both assessed using CART analysis. *Galba truncatula* seems to be more stenoecious, since this species is very sensitive to environmental factors (pH and water temperature for example) and lives in a more restricted range of habitats (Rondelaud et al., 2009) than *R. balthica* (the “travelling species”) which is more tolerant to variable environmental conditions.

The number of snails collected was found as the best explanatory factor related to the infection status. Surprisingly, presence of cattle (trampling, stools, fences) was not found to be a factor linked to the snail infestation status. However, a lack of power in the analyses is possible, because of the low prevalence of infection observed and this might have caused non-significant correlations. This could also suggest that wild fauna can intervene in the maintenance of *F. hepatica* life cycle. Generally, farmers consider that the presence of ponds in their meadow has a negative impact on cattle breeding, while European funds support the maintenance and digging of ponds in order to promote biodiversity. This last result could highlight the importance of temporary aquatic biotopes in the epidemiology of *F. hepatica* in Belgium. Nevertheless, pond types (intensive, natural and extensive) were not very informative on the infestation status (less than 30% in Cart analysis Table 2).

Digenetic trematode species are usually oioxenous (one parasite species infect a single snail species) or stenoxenous (one parasite species infect several closely related snail species). But the case of *F. hepatica* seems to be different as it shows a broad capacity to infect local and phylogenetically distant lymnaeid species (Correa et al., 2010). Therefore, rather than focusing on a single, or a handful of snail species, fasciolosis control programs should cover a broader

spectrum of intermediate hosts that inhabit diverse habitats and ecological conditions (Correa et al., 2010). The multiplex PCR method used in this study confirms this approach can address such concerns and highlights the role of *R. balthica* (= *R. peregra* = *R. ovata*) in the epidemiology of *F. hepatica* in Belgium.

5. CONCLUSION

A multiplex PCR was used to assess the parasitological status of 7103 lymnaeid snails collected in natural biotopes in Belgium. This technique was fully reliable and this is the first time in Belgium that naturally infected snails collected in the field were analyzed through molecular biology – based tools.

ACKNOWLEDGMENTS

This study had been made in the frame of the PONDSCAPE project (“Towards a sustainable management of pond diversity at the landscape level” – <http://www.pondscape.be>), financed by the European Union and the Belgian Science Policy (SD/BD/02A). The authors would like to thank PONDSCAPE partners and the Interdisciplinary Group of Applied Genoproteomics (GIGA) Genomic Facility (<http://www.giga.ulg.ac.be>) for sequencing support.

REFERENCES

- Abrous, M., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., 1996. *Paramphistomum daubneyi* and *Fasciola hepatica*: the effect of dual infection on prevalence and cercarial shedding in preadult *Lymnaea glabra*. J. Parasitol. 82, 1026-1029.
- Abrous, M., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., Cabaret, J., 1998. Unusual transmission of the liver fluke, *Fasciola hepatica*, by *Lymnaea glabra* or *Planorbis leucostoma* in France. J. Parasitol. 84, 1257-1259.
- Abrous, M., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., Cabaret, J., 1999. Infection of *Lymnaea truncatula* and *Lymnaea glabra* by *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi* in farms of central France. Vet. Res. 30, 113-118.
- Almeyda-Artigas, R.J., Bargues, M.D., Mas-Coma, S., 2000. ITS-2 rDNA sequencing of *Gnathostoma* species (*Nematoda*) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis in the Americas. J. Parasitol. 86, 537-544.
- Bargues, M.D., Vigo, M., Horak, P., Dvorak, J., Patzner, R.A., Pointier, J.P., Jackiewicz, M., Meier-Brook, C., Mas-Coma, S., 2001. European *Lymnaeidae* (*Mollusca: Gastropoda*), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. Infect. Genet. Evol. 1, 85-107.
- Bargues, M.D., Mas-Coma, S., 2005. Reviewing lymnaeid vectors of fascioliasis by ribosomal DNA sequence analyses. J. Helminthol. 79, 257-267.
- Baur, B., Ringeis, B., 2002. Changes in gastropod assemblages in freshwater habitats in the vicinity of Basel (Switzerland) over 87 years. Hydrobiologia 479, 1-10.
- Boray, J.C., 1966. Studies on the relative susceptibility of some lymnaeids to infection with *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* and on the adaptation of *Fasciola* spp. Ann. Trop. Med. Parasitol. 60, 114-124.
- Boray, J.C., 1967. Host-parasite relationship between Lymnaeid snails and *Fasciola hepatica*. Vet. Med. Rev., 132-140.

- Boray, J.C., 1978. The potential impact of exotic *Lymnaea* spp. on fascioliasis in Australasia. *Vet. Parasitol.* 4, 127-141.
- Breiman, L., Friedman, J.H., Olshen, R.A., Stone, C.J., 1984. Classification and regression trees. Pacific Grove, California, USA.
- Caron, Y., Lasri, S., Losson, B., 2007. *Fasciola hepatica*: an assessment on the vectorial capacity of *Radix labiata* and *R. balthica* commonly found in Belgium. *Vet. Parasitol.* 149, 95-103.
- Caron, Y., Rondelaud, D., Losson, B., 2008. The detection and quantification of a digenean infection in the snail host with special emphasis on *Fasciola* sp. *Parasitol. Res.* 103, 735-744.
- Caron, Y., Righi, S., Lempereur, L., Saegerman, C., Losson, B., 2011. An optimized DNA extraction and multiplex PCR for the detection of *Fasciola* sp. in lymnaeid snails. *Vet. Parasitol.* 178, 93-99.
- Chapuis, E., Trouve, S., Facon, B., Degen, L., Goudet, J., 2007. High quantitative and no molecular differentiation of a freshwater snail (*Galba truncatula*) between temporary and permanent water habitats. *Mol. Ecol.* 16, 3484-3496.
- Charlier, J., De Cat, A., Forbes, A., Vercruyse, J., 2009. Measurement of antibodies to gastrointestinal nematodes and liver fluke in meat juice of beef cattle and associations with carcass parameters. *Vet. Parasitol.* 166, 235-240.
- Cicchetti, D.V., Feinstein, A.R., 1990. High agreement but low kappa: II. Resolving the paradoxes. *J. Clin. Epidemiol.* 43, 551-558.
- Correa, A.C., Escobar, J.S., Durand, P., Renaud, F., David, P., Jarne, P., Pointier, J.P., Hurtrez-Bousses, S., 2010. Bridging gaps in the molecular phylogeny of the *Lymnaeidae* (*Gastropoda: Pulmonata*), vectors of fascioliasis. *BMC Evol Biol* 10, 381.
- Correa, A.C., Escobar, J.S., Noya, O., Velasquez, L.E., Gonzalez-Ramirez, C., Hurtrez-Bousses, S., Pointier, J.P., 2011. Morphological and molecular characterization of Neotropic

- Lymnaeidae* (Gastropoda: *Lymnaeioidea*), vectors of fasciolosis. Infect. Genet. Evol. 11, 1978-1988.
- Cucher, M.A., Carnevale, S., Prepelitchi, L., Labbe, J.H., Wisnivesky-Colli, C., 2006. PCR diagnosis of *Fasciola hepatica* in field-collected *Lymnaea columella* and *Lymnaea viatrix* snails. Vet. Parasitol. 137, 74-82.
- Dagnelie, P., 1998. Statistique théorique et appliquée. Inférence statistique à une et à deux dimensions, Vol Tome 2. De Boek Université, Bruxelles, Belgique, 659 p.
- Dreyfuss, G., Abrous, M., Rondelaud, D., 2000a. The susceptibility of *Lymnaea fuscus* to experimental infection with *Fasciola hepatica*. J. Parasitol. 86, 158-160.
- Dreyfuss, G., Vignoles, P., Rondelaud, D., 2000b. Variability of *Fasciola hepatica* infection in *Lymnaea ovata* in relation to snail population and snail age. Parasitol. Res. 86, 69-73.
- Dreyfuss, G., Vignoles, P., Abrous, M., Rondelaud, D., 2002. Unusual snail species involved in the transmission of *Fasciola hepatica* in watercress beds in central France. Parasite 9, 113-120.
- Dreyfuss, G., Vignoles, P., Mekroud, A., Rondelaud, D., 2006. The presence of uninfected *Omphiscola glabra* in a breeding of infected *Galba truncatula* enhanced the characteristics of snail infections with *Fasciola hepatica*. Parasitol. Res. 99, 197-199.
- Dreyfuss, G., Novobilsky, A., Vignoles, P., Bellet, V., Koudela, B., Rondelaud, D., 2007. Prevalence and intensity of infections in the lymnaeid snail *Omphiscola glabra* experimentally infected with *Fasciola hepatica*, *Fascioloides magna* and *Paramphistomum daubneyi*. J. Helminthol. 81, 7-12.
- Faltynkova, A., Horackova, E., Hirtova, L., Novobilsky, A., Modry, D., Scholz, T., 2006. Is *Radix peregra* a new intermediate host of *Fascioloides magna* (Trematoda) in Europe ? Field and experimental evidence. Acta Parasitol. 51, 87-90.
- Furmaga, S., Gundlach, J.L., 1967a. *Lymnaea stagnalis* as a source of infection with *Fasciola hepatica*. Acta Parasitol. 15, 237-241.

- Furmaga, S., Gundlach, J.L., 1967b. *Lymnaea stagnalis* L. as one more intermediate host of *Fasciola hepatica*. Acta Parasitol. 15, 231-235.
- Furmaga, S., Gundlach, J.L., 1969. Studies on the participation of some snail species of the family *Lymnaeidae* in the life cycle of *Fasciola hepatica*. Acta Parasitol. 17, 115-118.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41, 95-98.
- Hunova, K., Kasny, M., Hampl, V., Leontovyc, R., Kubena, A., Mikes, L., Horak, P., 2012. *Radix* spp.: Identification of trematode intermediate hosts in the Czech Republic. Acta Parasitol. 57, 273-284.
- Janssen, A.W., Vogel, E.F., 1965. Zoetwatermollusken van Nederland. Nederlandse Jeugdbond voor Natuurstudie, Amsterdam, 160 p.
- Jouet, D., Skirnisson, K., Kolarova, L., Ferte, H., 2010. Molecular diversity of *Trichobilharzia franki* in two intermediate hosts (*Radix auricularia* and *Radix peregra*): a complex of species. Infect. Genet. Evol. 10, 1218-1227.
- Kaplan, R.M., Dame, J.B., Reddy, G.R., Courtney, C.H., 1995. A repetitive DNA probe for the sensitive detection of *Fasciola hepatica* infected snails. Int. J. Parasitol. 25, 601-610.
- Kaplan, R.M., Dame, J.B., Reddy, G.R., Courtney, C.H., 1997. The prevalence of *Fasciola hepatica* in its snail intermediate host determined by DNA probe assay. Int. J. Parasitol. 27, 1585-1593.
- Kozak, M., Wedrychowicz, H., 2010. The performance of a PCR assay for field studies on the prevalence of *Fasciola hepatica* infection in *Galba truncatula* intermediate host snails. Vet. Parasitol. 168, 25-30.
- Martinez-Ibeas, A.M., Gonzalez-Warleta, M., Martinez-Valladares, M., Castro-Hermida, J.A., Gonzalez-Lanza, C., Minambres, B., Ferreras, C., Mezo, M., Manga-Gonzalez, M.Y., 2013. Development and validation of a mtDNA multiplex PCR for identification and discrimination of *Calicophoron daubneyi* and *Fasciola hepatica* in the *Galba truncatula* snail. Vet. Parasitol. 195, 57-64.

- MCREATH, A.M., 1978. Aspects of host defense mechanism of *Lymnaea peregra* and *Lymnaea palustris* against sporocysts of *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 77, R15-R115.
- PFFENNINGER, M., CORDILLIER, M., STREIT, B., 2006. Comparing the efficacy of morphologic and DNA-based taxonomy in the freshwater gastropod genus *Radix* (*Basommatophora*, *Pulmonata*). *BMC Evol. Biol.* 23, 100.
- PFFENNINGER, M., SALINGER, M., HAUN, T., FELDMEYER, B., 2011. Factors and processes shaping the population structure and distribution of genetic variation across the species range of the freshwater snail *Radix balthica* (*Pulmonata*, *Basommatophora*). *BMC Evol. Biol.* 11, 135.
- POINTIER, J.P., COUSTAU, C., RONDELAUD, D., THERON, A., 2007. *Pseudosuccinea columella* (Say 1817) (*Gastropoda*, *Lymnaeidae*), snail host of *Fasciola hepatica*: first record for France in the wild. *Parasitol. Res.* 101, 1389-1392.
- RELF, V., GOOD, B., MCCARTHY, E., DE WAAL, T., 2009. Evidence of *Fasciola hepatica* infection in *Radix peregra* and a mollusc of the family *Succineidae* in Ireland. *Vet. Parasitol.* 163, 152-155.
- ROGNLIE, M.C., DIMKE, K.L., POTTS, R.S., KNAPP, S.E., 1996. Seasonal transmission of *Fasciola hepatica* in Montana, USA, with detection of infected intermediate hosts using a DNA-based assay. *Vet. Parasitol.* 65, 297-305.
- RONDELAUD, D., VIGNOLES, P., DREYFUSS, G., 2009. La Limnée tronquée, un mollusque d'intérêt médical et vétérinaire. Presses Universitaires de Limoges, Limoges, 283 p.
- SAEGERMAN, C., PORTER, S.R., HUMBLET, M.F., 2011. The use of modelling to evaluate and adapt strategies for animal disease control. *Rev. Sci. Tech.* 30, 555-569.
- SCHWEIZER, G., BRAUN, U., DEPLAZES, P., TORGERTSON, P.R., 2005. Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *Vet. Rec.* 157, 188-193.
- SCHWEIZER, G., MELI, M.L., TORGERTSON, P.R., LUTZ, H., DEPLAZES, P., BRAUN, U., 2007. Prevalence of *Fasciola hepatica* in the intermediate host *Lymnaea truncatula* detected by real time

- TaqMan PCR in populations from 70 Swiss farms with cattle husbandry. *Vet. Parasitol.* 150, 164-169.
- Sindou, P., Cabaret, J., Rondelaud, D., 1991. Survival of snails and characteristic lesions of *Fasciola hepatica* infection in four European species of *Lymnaea*. *Vet. Parasitol.* 40, 47-58.
- Skirnisson, K., Aldhoun, J.A., Kolarova, L., 2009. A review on swimmer's itch and the occurrence of bird schistosomes in Iceland. *J. Helminthol.* 83, 165-171.
- Smith, G., Crombie, J.A., 1982. The rate of attachment of *Fasciola hepatica* miracidia to various species of lymnaeid. *J. Parasitol.* 68, 965-966.
- Taylor, E.L., 1965. Fascioliasis and the liver fluke, Vol 64, FAO Agricultural Studies Edition Rome, 253 p.
- Torgerson, P., Claxton, J., 1999. Epidemiology and control, In: Dalton, J.P. (Ed.) Fasciolosis. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, U.K., pp. 113-149.
- Velusamy, R., Singh, B.P., Raina, O.K., 2004. Detection of *Fasciola gigantica* infection in snails by polymerase chain reaction. *Vet. Parasitol.* 120, 85-90.
- Vignoles, P., Dreyfuss, G., Rondelaud, D., 2002. Redial growth and cercarial productivity of *Fasciola hepatica* in three species of young lymnaeid snails. *J. Helminthol.* 76, 269-272.
- Zanella, G., Martinelle, L., Guyot, H., Mauroy, A., De Clercq, K., Saegerman, C., 2013. Clinical pattern characterization of cattle naturally infected by BTV-8. *Transbound Emerg Dis* 60, 231-237.

ÉTUDE 4

Préambule

Cet article est en cours de soumission.

L'étude réalisée dans le cadre du TFE a démontré que des hôtes intermédiaires différents de *G. truncatula* étaient impliqués dans le cycle de *F. hepatica*. Ce résultat n'était que qualitatif. L'**étude 1** a montré que ces hôtes pouvaient excréter des formes larvaires infestantes au même titre que celles excrétées par la limnée tronquée. L'**étude 2** a fourni des techniques de biologie moléculaire optimisées pour vérifier ces résultats sur le terrain. L'**étude 3** a montré l'application de ces techniques sur le terrain via l'analyse de plus de 7000 limnées dont *R. balthica* qui semble impliquée dans l'épidémiologie de la fasciolose en Belgique. Il serait intéressant de valider la technique en l'exportant dans un contexte épidémiologique différent comme, par exemple, l'Amérique du Sud où peu d'informations sont disponibles. Les techniques sont-elles validées ? Des hôtes intermédiaires alternatifs sont-ils présents en Equateur ? Quels pourraient être leurs rôles ?

***Galba schirazensis* (Mollusca, Gastropoda) as a new potential intermediate host of *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea) in Ecuador**

Y CARON¹, M. CELI-ERAZO², S. HURTREZ-BOUSSÈS^{3,4}, M. LOUNNAS³, J.-P. POINTIER⁵, C. SAEGERMAN⁶, B. LOSSON¹, W. BENÍTEZ-ORTÍZ^{2,7}

¹*Research Unit in Parasitology and Parasitic Diseases, Fundamental and Applied Research for Animals & Health (FARAH), Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Belgium*

²*International Center for Zoonosis (ICZ), Central University of Ecuador, Quito, Ecuador*

³*MIVEGEC, UMR IRD 224-CNRS 5290-UM, Montpellier, France*

⁴*Department of Biology Ecology (Sciences Faculty)- cc 046- Montpellier University, France*

⁵*USR 3278 CNRS-EPHE, Perpignan University, France*

⁶*Research Unit of Epidemiology and Risk analysis applied to Veterinary Sciences (UREAR-ULg), Fundamental and Applied Research for Animals & Health (FARAH), Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Belgium*

⁷*Veterinary Medicine and Zootechny Faculty, Central University of Ecuador, Quito, Ecuador*

ABSTRACT

Fasciolosis is a widely distributed disease in livestock in South America but knowledge about the epidemiology and the intermediate hosts are scarce in Ecuador. During 3 months, lymnaeid snails were sampled (n=1482) in the Pichincha province in two sites located in a highly endemic area. Snails were identified (based on morphology and ITS2 sequences) and the infection status was established through microscopic dissection and a multiplex PCR-based technique. If morphologic-based techniques were not useful to accurately name the one species collected, alignment study ascribed it to *G. schirazensis*. Rediae were observed in 1.75 % (26/1482) and *Fasciola* sp. DNA was detected in 6% (89/1482) of collected snails. The COX-1 region permitted parasite identification: *F. hepatica*. The relative sensitivity and specificity of the microscope related to the PCR results was 25.84% and 99.78% respectively. The mean size of the snails recorded positive for *F. hepatica* through crushing and microscopy

was significantly higher than the mean size of negative snails. There was not such difference in PCR positive snails. The role of *G. schirazensis* as an intermediate host of *F. hepatica* in Ecuador is discussed and a hypothesis of an adaptation of the snail to the trematoda is proposed. For the first time, an epidemiological survey, based on molecular biology-based techniques assessed the role of lymnaeid snail in the epidemiology of fasciolosis in Ecuador.

Keywords: *Fasciola hepatica*, *Galba schirazensis*, Multiplex PCR, Ecuador, Epidemiology

1. INTRODUCTION

Fasciolosis is a cosmopolitan important parasitic disease of domestic animals (Schweizer et al., 2005) and man (Hurtrez-Boussès et al., 2001) with high potential risks of emergence or re-emergence (Keiser and Utzinger, 2005; Utaaker and Robertson, 2014). It is caused by two digenean trematodes (Platyhelminth): *Fasciola gigantica*, which repartition is restrained to Asia and Africa and *Fasciola hepatica* which is worldwide distributed and causes severe outbreaks in livestock (Torgerson and Claxton, 1999). In South America, *F. hepatica* has long been recorded and remains a true public health and veterinary problem, inducing important economic losses. Indeed, South America is a region where human fasciolosis is considered as emergent and where the highest human prevalences of this disease were observed (Hillyer et al., 1992; Esteban et al., 1999; Meunier et al. 2001). Several infection cases have also been reported in livestock, inducing important economic losses. For instance, in Argentina in 2009, bovine liver condemnation due to *F. hepatica* in the slaughterhouse of Atilio Vivacqua concerned 28.24% of the carcasses (9568/33870) that lead approximately to US\$ 132,000 of losses (Bernardo et al., 2011). In Peru, Espinoza et al., (2010) estimated the losses due to liver condemnation to be around US\$ 50 million.

Despite the recognition of fasciolosis as a threat in South America, epidemiological data for both human and livestock remain scarce. For instance, in Ecuador, only a few studies dealt with fasciolosis and it is currently considered that prevalences are low (e.g. Mas-Coma, 2007) although human population at risk was estimated at 20.6% (Keiser and Utzinger, 2005). The presence of human fasciolosis in Ecuador was reported for the first time in 2000 (Trueba et al., 2000) where 6% (9/150) of an Andean community were seropositive for *F. hepatica*. A

coprological study in this country showed a prevalence of 0.5% in a group of children (Gozalbo et al., 2004). In 2005, in the municipal slaughterhouse of Machachi (Ecuador), 12.28% (162/1319) of bovine livers were condemned due to fasciolosis (Egas-Dávila et al., 2006). Further studies are therefore needed to evaluate the risk of fasciolosis in Ecuador.

The lifecycle of *F. hepatica* involves a mammalian definitive (domestic and wild ruminants, pigs, rodents, human ...) and a molluscan intermediate (*Mollusca: Lymnaeidae*) host (Andrews, 1999). Thus, a good knowledge of intermediate hosts and their prevalences are required to identify areas and/or periods with epidemiological risks. The conventional wisdom has said that, apart from *Lymnaea rupestris*, for which the infection by *F. hepatica* had never been clearly demonstrated, seven true species act as potential vectors of fasciolosis in the Neotropic (Bargues et al., 2011a; Bargues et al., 2011b; Correa et al., 2010; Correa et al., 2011): *Lymnaea diaphana*, *Pseudosuccinea columella*, *Galba cousini*, *G. viatrix*, *G. cubensis*, *G. neotropica* and *G. truncatula*. Recently, Correa et al. (2010) unambiguously showed the presence of another true species they called *Galba* sp. Further analyses showed that this species is similar to *Galba (Lymnaea) schirazensis* (Bargues et al., 2011a). Due to phenotypic plasticity in shell shape (Samadi et al., 2000) and extremely homogenous anatomical traits among species (Correa et al., 2011) the correct identification of all these species is impossible in the “truncatula-like group”, i.e. phenotypically similar species: *Galba truncatula*, *G. schirazensis*, *G. viatrix*, *G. neotropica*, *G. cubensis*. Indeed, the combination of several anatomical parameters of the reproductive system is useless to discriminate these different species (Pointier et al., 2006; Correa et al., 2011) although DNA-based approaches (barcoding) unambiguously ascribe individuals to one species or another. In Ecuador, three lymnaeid species have been reported: *G. cousini* (Paraense, 1995, 2004), *P. columella* (Paraense, 1982b, 2004) and *G. schirazensis* (Bargues et al., 2011a). Only *G. cousini* was so far recorded to be naturally infested with *F. hepatica* in this country (Villavicencio and Vasconcellos, 2005) with a very high prevalence of 31.43% (22/70). Neither *P. columella* nor *G. schirazensis* were described as infected in Ecuador, despite the fact that *P. columella* was recently found naturally infected in Brazil (Coelho and Lima, 2003), Argentina (Prepelitchi et al., 2003) and Cuba (Gutierrez et al., 2011) and that *G. schirazensis* from Colombia seemed able experimentally to harbour some larval stages of *F. hepatica* (Dreyfuss et al., 2014). The detection of *Fasciola* sp. in the intermediate host is feasible through different techniques (Caron et al., 2008). Generally, microscopical techniques are chosen in the developing countries because they are cheap but this could lead to an underestimation of prevalence or

false identification of parasite larval forms. Only one study used molecular-based technique to assess infection status in field-collected lymnaeids in South America (Argentina)(Cucher et al., 2006). The aim of the present study was to provide new insight in the epidemiology of *F. hepatica* in Ecuador especially regarding lymnaeid species in an endemic area. For this purpose we monitored the lymnaeids infection status during a 3 month longitudinal survey and search the presence of *Fasciola hepatica* larvae by microscopic detection and DNA analysis.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *Sampling location*

Snails were sampled in two pastures belonging to a private farm called “La Fontana” located in Ecuador, near Machachi (Province of Pichincha, in the county of Meija). The first sampled site (site 1) (0°26'37.59”S; 78°32'24.12”W, 2794 m a. s. l.) and the second sampled site (site 2) (0°26'30.66”S; 78°32'38.21”W, 2781 m a. s. l.) were wet pastures regularly grazed by cattle belonging to the farm. Data concerning general information of the farm, cattle management, and fasciolosis history were also collected.

2.2. *Snail sampling*

Snails (>4mm) were collected every 2-3 weeks, between April and July 2013 (seven times), in both sites, for 30 minutes each, kept alive in plastic containers and transported to the International Center for Zoonosis in Quito for further analysis. The 1482 sampled snails were quickly sorted out according to genus identification before anatomical examination. The height of the shell of each sampled snails was measured from then apex to the anterior margin. For identification purpose, three snails were randomly selected half the time (4/7) for each biotope and identified following anatomical dissection (total 24) and molecular analysis (total 24).

2.3. *Snail identification*

2.3.1. Morphological analysis

Snails collected in the field were dipped in an isoflurane (Iso-Vet) solution (one drop in 5ml of tap water). They were then killed by plunging into hot water at 70°C for about 40 sec and transferred into cold water. Each specimen was gently pulled by the foot with a tweezer to disconnect the columellar muscle from the shell. The whole animal was drawn out of the shell and fixed in modified Raillet-Henry's solution (distilled water 930 ml, sodium chloride 6g, formalin (40%) 50 ml, acetic acid 20 ml) for anatomical examination. Several anatomical descriptions (Paraense, 1982a, b, 1984, 1986, 1995, 2004; Samadi et al., 2000) were used to identify species.

2.3.2. Sequencing reaction and alignment

A PCR assay was used to amplify the ITS-2 rDNA sequence specific for lymnaeids (500-600 bp). The primers used were News2 5'-TGT-GTC-GAT-GAA-GAA-CGC-AG-3' and Its2Rixo 5'-TTC-TAT-GCT-TAA-ATT-CAG-GGG-3' (Almeyda-Artigas et al., 2000; Bargues et al., 2001). The sequences were amplified using a commercial kit (Taq PCR Master Mix, Qiagen) in a total volume of 25 µl in a Peltier Thermal Cycler (MJ Research) with an initial denaturation step at 94°C for three minutes, followed by 40 cycles, each comprising denaturation at 94°C for thirty seconds, annealing at 55°C for thirty seconds, extension at 72°C for forty five seconds and a final extension step at 72°C for five minutes. ITS-2 rDNA sequences were then purified using MSB-Spin PCRapace (Invitek). Cycle sequencing reactions were performed (in triplicate and in both direction) by BigDye terminator v3.1 (3730 DNA analyzer; Applied Biosystems) by GIGA Genomics Facility (Liège University, Belgium). Consensus sequences were made according to the results of sequencing of the PCR products and were aligned using BioEdit 7.1.10 ([Hall 1999](#)) and MEGA 6 (Tamura et al., 2013) and analyzed using BLASTN 2.2.26 searches in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). The species identity of sequences obtained from PCR products was determined according to the closest BLAST match.

2. 4. Prevalences

2. 4. 1. Snail crushing

To assess the *Fasciola* sp. infection status, the collected snails were squashed between two microscopic slides and carefully examined under a microscope (x10 magnification). Larval forms (sporocyst, rediae and cercariae) of *Fasciola* sp. were identified following identification key (Schell, 1985). The squashed body of each snail was then delicately recovered and put in an individually annotated tube for molecular analysis.

2.4.2. DNA extraction and pooling

DNA extraction was based on Chelex® method as previously described (Caron et al., 2011). Briefly, the snail was mechanically disrupted with the help of a pellet mixer (Trefflab) in 100 µl of Chelex® 5% (BioRad) and incubated for one hour at 56°C and 30 min at 95°C in a Peltier Thermal Cycler (Techne TC). The mixture was centrifuged at 13,000 x g for seven minutes. The supernatant was collected and stored at -20°C until further analyses.

In order to reduce the number of PCRs, pools of individuals were formed by mixing together one µl of each DNA sample with a maximum of 10 snails per pool. This mixture was considered undiluted. One µl of the mixture was then tested in the multiplex PCR described below. In case of pool-positivity, snails were individually analysed with the same technique.

The absence of internal control amplification (PCR inhibitors) for a pooled or an individual sample was assessed through 1/10 and 1/100 dilutions. Furthermore, the addition of 0.05% Bovine Serum Albumin (BSA) in the PCR mixture at 1/10 dilution was tested for samples with absence of internal control amplification whereupon negative samples were definitely excluded from the study.

2.5. Parasite identification

2.5.1. Multiplex PCR

A multiplex PCR assay (Caron et al., 2011) was used to amplify a highly repeated 124 bp sequence (microsatellite) specific for *Fasciola* spp. (Kaplan et al., 1995) and ITS-2 rDNA sequence specific for lymnaeids (500-600 bp). ITS-2 sequence of the snail acts as a PCR internal control as its absence indicates potential presence of PCR inhibitors. The primers used for amplification of *Fasciola* spp. sequences were Fsh1 5'-GAT-CAA-TTC-ACC-CAT-

TTC-CGT-TAG-TCC-TAC-3' and Fsh2 5'-AAA-CTG-GGC-TTA-AAC-GGC-GTC-CTA-CGG-GCA-3' and for lymnaeids ITS-2 amplification were News2 5'-TGT-GTC-GAT-GAA-GAA-CGC-AG-3' and Its2Rixo 5'-TTC-TAT-GCT-TAA-ATT-CAG-GGG-3' (Almeyda-Artigas et al., 2000; Bargues et al., 2001). The sequences were amplified using a commercial kit (Taq PCR Master Mix, Qiagen) in a total volume of 25 µl in a Peltier Thermal Cycler (MJ Research) with an initial denaturation step at 95°C for five minutes, followed by 40 cycles, each comprising denaturation at 95°C for one minute, annealing at 56°C for one minute, extension at 72°C for one minute and a final extension step at 72°C for ten minutes. The amplification products were electrophoretically resolved in 2% agarose gels and stained with GelRed (Biotium). The limit of detection and specificity of this multiplex PCR were studied in a previous study (Caron et al., 2011).

2.5.2. Molecular parasite identification

Another PCR assay was used to amplify a 405 bp region of the cytochrome c oxidase subunit 1 gene (COX-1) to identify the species of fluke involved in the infected snails. The primers used were FhCO1F 5'-TAT-GTT-TTG-ATT-TTA-CCC-GGG-3' and FhCO1R 5'-ATG-AGC-AAC-CAC-AAA-CCA-TGT-3' as previously described (Cucher et al., 2006). The sequences were amplified using a commercial kit (Taq PCR Master Mix, Qiagen) in a total volume of 25 µl in a Peltier Thermal Cycler (MJ Research) with an initial denaturation step at 94°C for three minutes, followed by 30 cycles, each comprising denaturation at 94°C for sixty seconds, annealing at 56°C for sixty seconds, extension at 72°C for sixty seconds and a final extension step at 72°C for ten minutes. COX-1 sequences were then purified using MSB-Spin PCRapace (Invitex). Cycle sequencing reactions were performed (in duplicate and in both directions) by BigDye terminator v3.1 (3730 DNA analyzer; Applied Biosystems) by GIGA Genomics Facility (Liège University, Belgium). Consensus sequences were made according to the results of sequencing of the PCR products and were aligned using BioEdit 7.1.10 (Hall, 1999) and MEGA6 (Tamura et al., 2013) and analyzed using BLASTN 2.2.26 searches in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). The species identity of sequences obtained from PCR products was determined according to the closest BLAST match.

2.6. *Statistical analyses*

To compare microscope and PCR results in function of the biotope considered, a Fisher's exact test was used. The difference between the global prevalence in function of the time (date) was tested by Chi² test. The distribution of size of snails in function of the microscope or PCR results (positive *versus* negative) was assessed using two-sample Wilcoxon rank-sum test. The relative sensitivity and specificity of the microscope related to the PCR results was estimated with the exact binomial distribution (Petrie and Watson, 2006).

3. RESULTS

3.1 *Sampling location*

A total of 184 Holstein Jersey cattle producing milk and 13 horses belong to this private farm with 1200 ha of pastures. Pasture rotation took place every 2 months. Both sites were approximately separated by 1000 m and were crossed with little brooks ("acequias") with slow flow (without connection between sites) and the snails were sampled all along on the mud edge. This is the only source of water for the cattle in the field. The soil is volcanic in origin and vegetation was mainly composed of ray-grass (*Lolium* sp.) and aquatic plants. The farm had a long history of fasciolosis, as *F. hepatica* eggs were regularly observed during copro-parasitology. Approximately 50% of the animals were positive. Cattle were treated every 3 months with injectable nitroxynil (Nitromic®).

3.2 *Snail sampling*

A total of 1482 snails were collected; 1055 (71.2%) and 427 (28.8%) in the first and second sites respectively.

3.3. *Snail identification*

3.3.1. Morphological examination

The largest adult individual collected in the field was 6.2 mm in height (mean 4.83 +/- SD 0.68 mm). The mean heights of the shell were calculated in the site 1 (mean 4.32 +/- SD 0.51

mm) and site 2 (mean 4.51 +/- SD 0.68 mm). All the 24 examined snails belonged to small-shelled lymnaeids that are morphologically undistinguishable (“truncatula-like” *sensu* Correa et al. 2011). Indeed, the observed phenotypic traits do not allowed to distinguish between *G. truncatula* (Bargues et al., 2007; Samadi et al., 2000), *G. cubensis* (Bargues et al., 2007; Samadi et al., 2000), *G. neotropica* (Pointier et al., 2006), *G. viator* (Bargues et al., 2007; Paraense, 1976) and *G. schirazensis* (Bargues et al., 2011a).

3.3.2. Sequencing reaction and alignment

In order to accurately identify the collected lymnaeid species, ITS-2 of 24 snails were sequenced. All the sequences (144) were identical to only one. This sequence [GenBank: KJ590135] was found to be 100% identical to *L. schirazensis* [GenBank: JF272602]. The **Figure. 1** shows the sequence alignments of the consensus sequence and the 10 first ITS-2 sequences retrieved from the BLASTN analysis of *Lymnaeidae* found in South America.

3.4. Parasite prevalences

A crushing global prevalence of 1.75% (26/1482) was calculated. No positive snail to *Fasciola* spp. was detected through crushing in site 2; the prevalence in site 1 was 2.46% (26/1055). Only rediae were observed in the infected snails (**Table I**). Six percent (89/1482) of the collected snails contained DNA of *Fasciola* spp. This number corresponds to 8.15% (86/1055) in site 1 and 0.7% (3/427) in site 2. It was not possible to amplify the DNA of 3 snails collected in the site 1. Therefore those snails (0.2%) were excluded from the study (**Table I**).

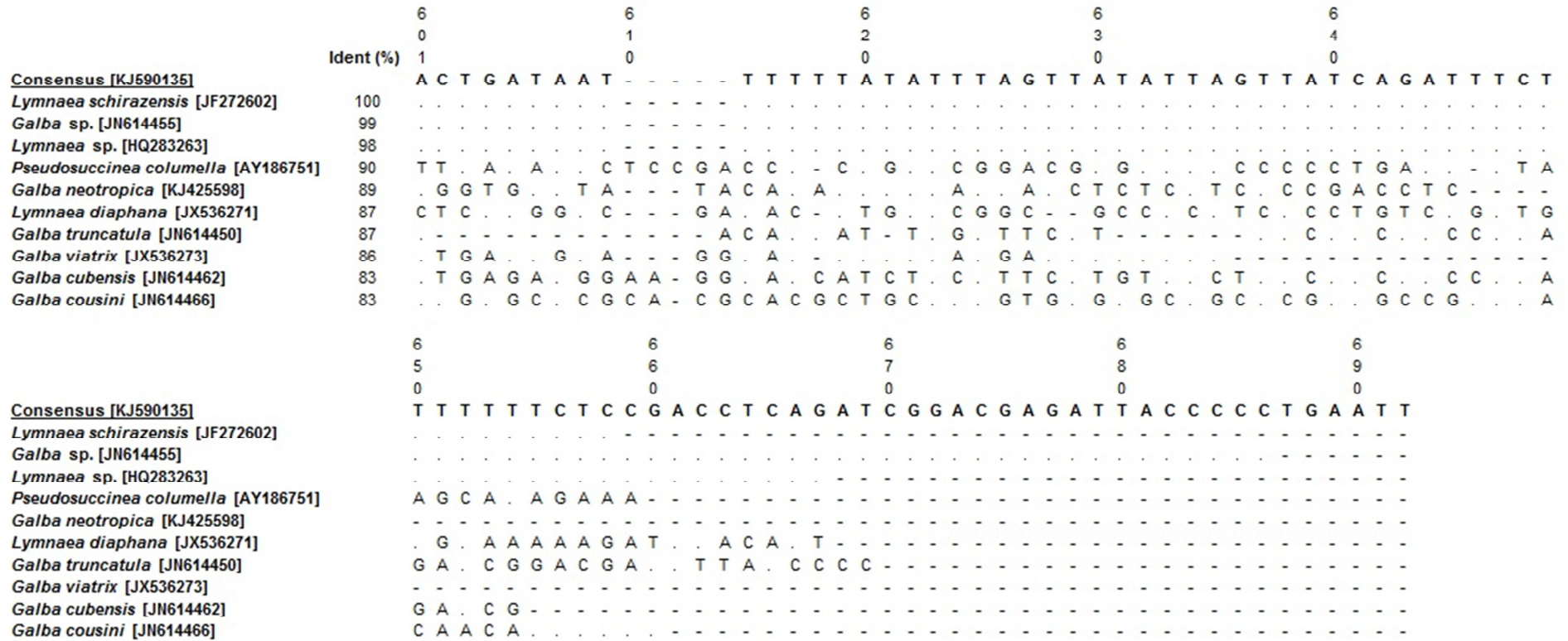


Figure 1 – Sequence alignments of the ITS-2 sequences (5'- 3') of *Lymnaeidae* retrieved from the BLASTN analysis of *Lymnaeidae* found in South America. Ident is for Identity. . indicates conservation; - indicates alignment gap; a letter indicate substitution.

Table I – Number of snails collected in the site 1 and 2 during the sampling campaign and infection status through microscopy and PCR

Sampling date	25/4/13=A		15/5/13=B		29/5/13=C		12/6/13=D		3/7/13=E		17/7/13=F		24/7/13=G	
Biotores	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
Collected snails	110	71	40	141	64	188	36	111	134	314	65	120	88	
Crushing positive snails (%)	9 (8.18)	6 (8.45)	0	5 (3.55)	0	5 (2.66)	0	1 (0.9)	0	0	0	0	0	
PCR positive snail (%)	14 (12.73)	11 (15.49)	0	9 (6.38)	1 (1.56)	15 (7.98)	0	10 (9.01)	2 (1.49)	19 (6.05)	0	8 (6.67)	0	

3.5. Molecular parasite identification

To assess the fluke species involved, ten percent (9) of the 86 snails containing DNA of *Fasciola* sp. were randomly selected in site 1 and three snails containing DNA of *Fasciola* sp. in site 2 were added. The region of the COX-1 of the 12 samples was amplified and sequenced in duplicate and in both direction (48 sequences). All the sequences were identical to only one. This sequence was found to be 99% identical to *F. hepatica* [GenBank: GQ121276] and 94% identical to *F. gigantica* [GenBank: GU112458].

3.6. Statistical analysis

Fisher's exact test was used to compare microscopy and PCR in function of the site considered. Concerning the site 1, the frequencies by date were not homogeneously distributed ($P < 0.001$) in function of the result issued by crushing, whereas result obtained by PCR were homogeneously distributed ($P = 0.10$). The difference between the data obtained by crushing in function of the time (date) was tested by χ^2 test for the site 1; prevalence for the sampling dates A and B were significantly higher than for the other dates ($\chi^2_{ddl\ 1} = 9.35$; $P = 0.002$). The frequencies by date were homogeneously distributed ($P = 0.78$) for results issued by PCR in the site 2.

The distribution of size of snails in function of the data obtained through microscopy or PCR in site 1 was assessed using two-sample Wilcoxon rank-sum test. The size of the snails recorded positive for *F. hepatica* through crushing was significantly higher ($P < 0.001$) than that of negative snails. For PCR results, the size of the positive snails had no effect ($P = 0.41$).

The relative sensitivity and specificity of the microscope related to the PCR results was estimated with the exact binomial distribution. The relative sensitivity and specificity was estimated to be 25.84% (IC 95%: 17.14–36.21) and 99.78% (IC 95%: 99.37–99.96) respectively. The kappa coefficient was calculated as 0.38 (weak agreement).

4. DISCUSSION

4.1 *Detection and identification of parasites*

The amplified 124 bp region was not sufficient to ascribe parasite species (Krämer and Schnieder, 1998); *F. hepatica* in infected snails was only identified according to COX-1 region in infected snails. This study showed overall prevalences of 1.75% and 6% using microscopy and PCR respectively. This difference is probably due to the low sensitivity of crushing technique (Caron et al., 2008). In a previous study, the infection rate of *F. hepatica* in *P. columella* was 17.5% and 51.3% by direct examination and PCR respectively (Cucher et al., 2006). The relative specificity of the crushing method was very high (99.78%) as only three microscopically positive snails were negative by PCR. In contrast, the sensitivity was low (25.84%) because crushing overestimates the number of false negatives. Indeed, an infection with sporocyst is very difficult to record and the presence of shell fragments can hamper parasite detection. Furthermore, the very high sensitivity of PCR could overestimate the “true prevalence” as it detects specific DNA but does not give information about the viability of the parasites.

Interestingly, the mean height of the snail positive by microscopy was higher when compared to PCR positive snails. This could be explained by the fact that bigger is the snail easier is the observation of parasite. Indeed, the size of the PCR positive snails was no statistically different from the size of negative snails.

4.2 *Natural prevalences of Fasciola hepatica*

The prevalence of *F. hepatica* in the intermediate host recorded here (6% with PCR method) is very low when compared to a prevalence of 31.43% (22/70) recorded in *G. cousini* and based on microscopic examination (Ecuador, Machachi) (Villavicencio and Vasconcellos, 2005). This latter prevalence is very high value for a lymnaeid snail under natural exposure (e.g. Rondelaud et al. 2009). This could be due to the low number of examined snails, high cattle density (10 adult bovines/ha/year) and high fasciolosis prevalence (90%) in the definitive host in the studied farm (Villavicencio et al., 2006). In addition, anthropogenic factors involving irrigation of pasture lands by flood or ditches and inappropriate management of grazing cattle are likely to promote infection in both intermediate and definitive hosts in Ecuador (Villavicencio and Vasconcellos,

2005). Lower prevalences were observed through microscopy in Brazil where *P. columella* showed infection rates between 0.14% (Ueta, 1980) and 5.26% (Oliveira et al., 2002) and in Corrientes, Argentina, where a prevalence of 8.8% was recorded (Prepelitchi et al., 2003).

The prevalence through microscopy was statistically higher for the first and second sampling dates. An effect of the season could have been hypothesized but this is ruled out by the fact that such a difference was not observed with PCR. In Brazil, a study of the population of *P. columella* (Amato et al., 1986) showed that snail density decreased from September to February and increased from March to September with higher metacercaria number on pasture between June – October and March – April. Flooding could be responsible of the observed density reduction during rainy season (Coelho and Lima, 2003). However, seasonal variations are very limited between wet and dry season in the province of Pichincha. The very marked difference of the PCR prevalence between both sites is very surprising (site 2 more than eleven times lower). This might be due to a difference in intermediate host population as it was previously recorded (Rondelaud, 1993) and experimentally demonstrated (Dreyfuss et al., 2014; Rondelaud et al., 2014a; Rondelaud et al., 2014b). In such a case, it would be hypothesized that snails of site 1 would be more susceptible to the parasite than snails of site 2. An alternative and non-exclusive hypothesis might be a lower probability of snail infection in site 2.

4.3 *G. schirazensis* part in fasciolosis in Ecuador

The ITS-2 sequence alignments undoubtedly ascribed the collected lymnaeid snail to *G. schirazensis*. This species was found for the first time in 2009 in Colombia as *Lymnaea* sp. (Correa et al., 2010) and was also reported in Venezuela, Spain and La Reunion Island as *Galba* sp. (Correa et al., 2011), as well as Iran, Mexico and Ecuador (Bargues et al., 2011a) according to phylogenetic analysis. This species was thus considered as a previously overlooked highly invasive species (Bargues et al., 2011a; Correa et al., 2011).

For the first time, our results show the presence of *F. hepatica* alive larvae and *F. hepatica* DNA in *G. schirazensis*, which would suggest a potential role of this snail in fasciolosis transmission. Natural infection studies and experimental infection of *G. schirazensis* with *F. hepatica* were

realized by Bargues et al. (2011a). None of the 8752 snails specimens collected in the field from 20 localities of eight countries showed cercarial shedding neither the 338 snails experimentally infected showed larval excretion (Bargues et al., 2011a). Nevertheless, all the experimental infections were allopatric, with few snails (hitherto 10), with only one miracidium and with very high mortality rate at 30 days post infection (hitherto 100%) that did not allow a correct evaluation of the vectorial capacity of *G. schirazensis*. Other experimental infections of *G. schirazensis* with allopatric *F. hepatica* were carried out during five successive snail generations and led to 1.75% (7/400) of snails harbouring several rediae (Dreyfuss et al., 2014). In our study, *G. schirazensis* was the only freshwater snail species collected in the field, with 8.15% of snails harbouring *F. hepatica* DNA and 2.46% of snails with alive larvae in site 1, in a farm endemic for fasciolosis. In Colombia and Venezuela, *G. schirazensis* was also the single species found in several very high endemic areas (J.-P. Pointier, personal observations).

Recently, three alternative developmental pathways of *F. hepatica* were identified in the area where *G. truncatula* (intermediate host of *F. hepatica* in Europe, North Africa and parts of America) has not been described, particularly in cattle-breeding farms known for high risks of animal fasciolosis (Rondelaud et al., 2014b). The first pathway involves lymnaeid snails able to sustain complete larval development of the parasite with cercarial shedding if they are infected by miracidia in their first week of life (Boray, 1978). Nevertheless, experimental infection demonstrated a strong mortality of the exposed snails, a low prevalence and a low cercarial shedding (Dreyfuss et al., 2000). The second was described during sequential experimental infection of snails with *Calicophoron daubneyi* followed by *F. hepatica*, showing successful infection (Abrous et al., 1996); this was also observed in some naturally infected snails (Abrous et al., 1999). A third one, probably more sustainable, was recorded during the infection of five successive generations of preadult snail originating from parents already infected with this parasite, resulting in a progressive increase in prevalence of snail infection and cercarial shedding (Rondelaud et al., 2014a).

Finally, further studies with sympatric experimental infection, attempt to cercarial excretion of naturally infected snails and longer sampling campaign could unravel the part of this snail species in fasciolosis in Ecuador.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was realized with the financial support of the Huynen Foundation (University of Liège, Belgium). The authors would also like to thank the interdisciplinary Group of Applied Genoproteomics (GIGA) Genomic Facility (<http://www.giga.ulg.ac.be>) for sequencing support and all the team of the International Center for Zoonosis (Ecuador). Finally, the authors are deeply indebted to the owner Marcelo Riviera and all the staff of the private farm “La Fontana” for their kindly help.

REFERENCES

- Abrous, M., Rondelaud, D., Dreyfuss, G. 1996 *Paramphistomum daubneyi* and *Fasciola hepatica*: the effect of dual infection on prevalence and cercarial shedding in preadult *Lymnaea glabra*. J. Parasitol. 82, 1026-1029.
- Abrous, M., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., Cabaret, J. 1999 Infection of *Lymnaea truncatula* and *Lymnaea glabra* by *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi* in farms of central France. Vet. Res. 30, 113-118.
- Almeyda-Artigas, R.J., Bargues, M.D., Mas-Coma, S. 2000 ITS-2 rDNA sequencing of *Gnathostoma* species (Nematoda) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis in the Americas. J. Parasitol. 86, 537-544.
- Amato, S.B., De Rezende, H.E., Gomes, D.C., Da Serra Freire, N.M. 1986 Epidemiology of *Fasciola hepatica* infection in the Paraiba River Valley, Sao Paulo, Brasil. Vet. Parasitol. 22, 275-284.
- Andrews, J.S. 1999 The life cycle of *Fasciola hepatica*., In: Dalton, J.P. (Ed.) Fasciolosis. CABI publishing, Wallingford, Oxon, U.K., pp. 1-29.
- Bargues, M.D., Vigo, M., Horak, P., Dvorak, J., Patzner, R.A., Pointier, J.P., Jackiewicz, M., Meier-Brook, C., Mas-Coma, S. 2001 European *Lymnaeidae* (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. Infect., Genet. Evol. 1, 85-107.
- Bargues, M.D., Artigas, P., Mera, Y.S.R.L., Pointier, J.P., Mas-Coma, S. 2007 Characterisation of *Lymnaea cubensis*, *L. viatrix* and *L. neotropica* n. sp., the main vectors of *Fasciola hepatica* in Latin America, by analysis of their ribosomal and mitochondrial DNA. Ann. Trop. Med. Parasitol. 101, 621-641.
- Bargues, M.D., Artigas, P., Khoubbane, M., Flores, R., Gloer, P., Rojas-Garcia, R., Ashrafi, K., Falkner, G., Mas-Coma, S. 2011a *Lymnaea schirazensis*, an overlooked snail distorting

- fascioliasis data: genotype, phenotype, ecology, worldwide spread, susceptibility, applicability. PLoS One 6, e24567.
- Bargues, M.D., Gonzalez, L.C., Artigas, P., Mas-Coma, S. 2011b A new baseline for fascioliasis in Venezuela: lymnaeid vectors ascertained by DNA sequencing and analysis of their relationships with human and animal infection. *Parasites & Vectors* 4, 200.
- Bernardo, C., Carneiro, M.B., Avelar, B.R., Donatele, D.M., Martins, I.V., Pereira, M.J. 2011 Prevalence of liver condemnation due to bovine fasciolosis in Southern Espirito Santo: temporal distribution and economic losses. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 20, 49-53.
- Boray, J.C. 1969 Experimental fascioliasis in Australia. *Ad. Parasitol.* 7, 95-210.
- Boray, J.C. 1978 The potential impact of exotic *Lymnaea* spp. on fascioliasis in Australasia. *Vet. Parasitol.* 4, 127-141.
- Caron, Y., Rondelaud, D., Losson, B. 2008 The detection and quantification of a digenean infection in the snail host with special emphasis on *Fasciola* sp. *Parasitol. Res.* 103, 735-744.
- Caron, Y., Righi, S., Lempereur, L., Saegerman, C., Losson, B. 2011 An optimized DNA extraction and multiplex PCR for the detection of *Fasciola* sp. in lymnaeid snails. *Vet. Parasitol.* 178, 93-99.
- Coelho, L.H., Lima, W.S. 2003 Population dynamics of *Lymnaea columella* and its natural infection by *Fasciola hepatica* in the State of Minas Gerais, Brazil. *J. Helminthol.* 77, 7-10.
- Correa, A.C., Escobar, J.S., Durand, P., Renaud, F., David, P., Jarne, P., Pointier, J.P., Hurtrez-Bousses, S. 2010 Bridging gaps in the molecular phylogeny of the *Lymnaeidae* (*Gastropoda: Pulmonata*), vectors of fascioliasis. *BMC Evol. Biol.* 10, 381.
- Correa, A.C., Escobar, J.S., Noya, O., Velasquez, L.E., Gonzalez-Ramirez, C., Hurtrez-Bousses, S., Pointier, J.P. 2011 Morphological and molecular characterization of Neotropic

Lymnaeidae (Gastropoda: Lymnaeidae), vectors of fasciolosis. *Infect., Genet. Evolut.* 11, 1978-1988.

Cucher, M.A., Carnevale, S., Prepelitchi, L., Labbe, J.H., Wisnivesky-Colli, C. 2006 PCR diagnosis of *Fasciola hepatica* in field-collected *Lymnaea columella* and *Lymnaea viatrix* snails. *Vet. Parasitol.* 137, 74-82.

Dreyfuss, G., Abrous, M., Rondelaud, D. 2000 The susceptibility of *Lymnaea fuscus* to experimental infection with *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* 86, 158-160.

Dreyfuss, G., Correa, A.C., Djuikwo-Teukeng, F.F., Novobilsky, A., Höglund, J., Pankrác, J., Kasny, M., Vignoles, P., Hurtrez-Bousses, S., Pointier, J.P., Rondelaud, D. 2014 Differences of compatibility for a Colombian population of *Galba* sp. between *Fascioloides magna* and *Fasciola hepatica*. *J. of Helminthol.* 7, 1-7.

Egas-Dávila, R., Villota-Burbano, M., Celi-Erazo, M., Ron-Román, J., Proaño-Perez, F., Rodríguez-Hidalgo, R., Benítez-Ortiz, W. 2006 Determinación de la prevalencia de *Fasciola hepatica* en bovinos sacrificados en el camal municipal de Machachi: Trazabilidad de los animales positivos. Universidad Central del Ecuador, Quito.

Espinoza, J.R., Terashima, A., Herrera-Velít, P., Marcos, L.A. 2010 Human and animal fascioliasis in Peru: impact in the economy of endemic zones. *Per. Rev. Exp. Med. Pub. Health* 27, 604-612.

Esteban, J.G., Flores, A., Angles, R., Mas-Coma, S. 1999 High endemicity of human fascioliasis between Lake Titicaca and La Paz valley, Bolivia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93, 151-156.

Gozalbo, M., Trueba, G., Fornasini, M., Fuentes, M.V., Bargues, M.D., Esteban, J.G., Mas-Coma, M.S. 2004 Coproparasitological survey in schoolchildren from the community of Planchaloma (Province de Cotopaxi, Ecuador). In: IX European Multicolloquium of Parasitology (EMOP 9), Valencia, Spain, Abstract No. 874, pp. 447.

Gutierrez, A., Vazquez, A.A., Hevia, Y., Sanchez, J., Correa, A.C., Hurtrez-Bousses, S., Pointier, J.P., Theron, A. 2011 First report of larval stages of *Fasciola hepatica* in a wild

- population of *Pseudosuccinea columella* from Cuba and the Caribbean. *J. Helminthol.* 85, 109-111.
- Hall, T.A. 1999 BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nuc. Acids Symp. Series* 41, 95-98.
- Hillyer, G.V., Soler de Galanes, M., Rodriguez-Perez, J., Bjorland, J., Silva de Lagrava, M., Ramirez Guzman, S., Bryan, R.T. 1992 Use of the Falcon assay screening test--enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) and the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) to determine the prevalence of human fascioliasis in the Bolivian Altiplano. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46, 603-609.
- Hurtrez-Bousses, S., Meunier, C., Durand, P., Renaud, F. 2001 Dynamics of host-parasite interactions: the example of population biology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Microb. Infect.* 3, 841-849.
- Kaplan, R.M., Dame, J.B., Reddy, G.R., Courtney, C.H. 1995 A repetitive DNA probe for the sensitive detection of *Fasciola hepatica* infected snails. *Int. J. Parasitol.* 25, 601-610.
- Keiser, J., Utzinger, J. 2005 Emerging foodborne trematodiasis. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1507-1514.
- Krämer, F., Schnieder, T. 1998 Sequence heterogeneity in a repetitive DNA element of *Fasciola*. *Int. J. Parasitol.* 28, 1923-1929.
- Mas-Coma, S. 2007 *Lymnaea cousini* (Gastropoda: Lymnaeidae) as transmitter of fascioliasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 241-243.
- Oliveira, S.M., Fujii, T.U., Sposito Filha, E., Martins, A. 2002 Ocorrência de *Lymnaea columella* Say, 1817 infectada naturalmente por *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758), no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. *Arquiv. Instit. Biol.* 69.
- Paraense, W.L. 1976 *Lymnaea viatrix*: a study of topotypic specimens (*Mollusca: Lymnaeidae*). *Rev. Bras. Biol.* 36, 419-428.

- Paraense, W.L. 1982a *Lymnaea rupestris* sp. n. from southern Brazil (*Pulmonata: lymnaeidae*). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 77, 437-443.
- Paraense, W.L. 1982b *Lymnaea viatrix* and *Lymnaea columella* in the neotropical region: a distribution outline. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 77, 181-188.
- Paraense, W.L. 1984 *Lymnaea diaphana*: a study of topotypic specimens (*Pulmonata: Lymnaeidae*). Mem. Instit. Oswaldo Cruz 79, 75-81.
- Paraense, W.L. 1986 *Lymnaea columella*: two new Brazilian localities in the state of Amazonas and Bahia. Mem. Instit. Oswaldo Cruz 81, 121-123.
- Paraense, W.L. 1995 *Lymnaea cousini* Jousseume, 1887, from Ecuador (*Gastropoda, Lymnaeidae*). Mem. Instit. Oswaldo Cruz 90, 605-609.
- Paraense, W.L. 2004 *Planorbidae, Lymnaeidae* and *Physidae* of Ecuador (*Mollusca: Basommatophora*). Mem. Instit. Oswaldo Cruz 99, 357-362.
- Petrie, A., Watson, P. 2006 Statistics for Veterinary and Animal Science, 2nd Edn. Edition Wiley, Ames.
- Pointier, J.P., Cazzaniga, N.J., Gonzalez-Salas, C., Gutierrez, A., Arenas, J.A., Bargues, M.D., Mas-Coma, S. 2006 Anatomical studies of sibling species within Neotropical lymnaeids, snail intermediate hosts of fascioliasis. Mem. Instit. Oswaldo Cruz 101, 431-435.
- Prepelitchi, L., Kleiman, F., Pietrokovsky, S.M., Moriena, R.A., Racioppi, O., Alvarez, J., Wisnivesky-Colli, C. 2003 First report of *Lymnaea columella* Say, 1817 (*Pulmonata: Lymnaeidae*) naturally infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (*Trematoda: Digenea*) in Argentina. Mem. Instit. Oswaldo Cruz 98, 889-891.
- Rondelaud, D. 1993 Variabilité interpopulationnelle de l'infestation fasciolienne chez le mollusque *Lymnaea truncatula* Müller. Influence du contact préalable de la population avec le parasite. Bull. Soc. Zool. France 118, 185-193.
- Rondelaud, D., Vignoles, P., Dreyfuss, G. 2009 La limnée tronquée, un mollusque d'intérêt médical et vétérinaire. PULIM, Limoges, France pp. 283.

- Rondelaud, D., Djuikwo-Teukeng, F.F., Vignoles, P., Dreyfuss, G. 2014a *Lymnaea glabra*: progressive increase in susceptibility to *Fasciola hepatica* through successive generations of experimentally-infected snails. *J. Helminthol.* 16, 1-6.
- Rondelaud, D., Titi, A., Vignoles, P., Mekroud, A., Dreyfuss, G. 2014b Adaptation of *Lymnaea fuscus* and *Radix balthica* to *Fasciola hepatica* through the experimental infection of several successive snail generations. *Parasites & Vectors* 7, 296-302.
- Samadi, S., Roumegoux, A., Bargues, M.D., Mas-Coma, M.S., Yong, M., Pointier, J.P. 2000 Morphological studies of Lymnaeid snails from the human fascioliasis endemic zone of Bolivia. *J. Molluss. Studies* 66, 31-44.
- Schell, S.C. 1985 Handbook of trematodes of North America north of Mexico Moscow, Idaho, 263 pp.
- Schweizer, G., Braun, U., Deplazes, P., Torgerson, P.R. 2005 Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *Vet. Rec.* 157, 188-193.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013 MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molec. Biol. Evol.* 30, 2725-2729.
- Torgerson, P., Claxton, J. 1999 Epidemiology and control, In: Dalton, J.P. (Ed.) Fasciolosis. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, U.K., pp. 113-149.
- Trueba, G., Guerrero, T., Fornasini, M., Casariego, I., Zapata, S., Ontaneda, S., Vasco, L. 2000 Detection of *Fasciola hepatica* infection in a community located in the Ecuadorian Andes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62, 518.
- Ueta, M.T. 1980 Ocorrência de infecção natural de *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 em *Lymnaea columella* Say, 1817 no Vale do Paraíba, SP, Brasil. *Rev. Saúde Pública* 14, 230-233.
- Utaaker, K.S., Robertson, L.J. 2014 Climate change and foodborn transmission of parasites: A consideration of possible interactions and impacts for selected parasites. *Food Res. Int.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.06.051>.

- Villavicencio, A., Vasconcellos, M.C. 2005 First report of *Lymnaea cousini* Jousseume, 1887 naturally infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (*Trematoda: Digenea*) in Machachi, Ecuador. Mem. Instit. Oswaldo Cruz 100, 735-737.
- Villavicencio, A., Gorochoy, V., Carvalho de Vasconcellos, M. 2006 *Lymnaea truncatula* Muller, 1774 (*Pulmonata: Lymnaeidae*) infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758)(*Trematoda: Digenea*), in Moscow districts, Russian Federation. Rev. Patol. Trop. 35, 59-64.

CHAPITRE 4 : DISCUSSION GÉNÉRALE

Identification des espèces de limnées

L'essor de nouvelles technologies peut donner des réponses à des questions que l'on ne se posait pas encore. La définition d'une espèce en est un exemple. L'espèce est en fait un concept qui n'a pas de réalité. La réalité biologique est celle des populations (variants géographiques) et c'est l'observateur humain qui en définit les critères. Dans le cadre de ce travail, il a fallu définir avec plus de précision ces critères. En effet, les faibles variations inter-spécifiques de l'anatomie et les fortes variations intra-spécifiques de la morphologie des mollusques *Lymnaeidae* (Samadi et al., 2000; Bargues et Mas-Coma, 2005; Pfenninger et al., 2006; Pointier et al., 2006; Correa et al., 2011) définissent des complexes d'espèces dont l'identification repose essentiellement sur des techniques moléculaires de séquençage de différentes régions du génome. Ceci est particulièrement le cas pour le complexe d'espèces « *R. peregra* » en Europe et « *G. truncatula* » (*Galba*-like) en Equateur. Comme l'a souligné Anderson en 2001, les données provenant d'une seule région du génome peuvent mener à des conclusions ambiguës ce qui donne plus de validité à des études basées sur plusieurs marqueurs (16S, 18S, ITS-1, ITS-2, COI) (Carvalho et al., 2004) comme celles réalisées dernièrement (Bargues et al., 2011b; Correa et al., 2011).

En 2001, une tentative de clarification du complexe « *R. peregra* » a été réalisée (Bargues et al., 2001). Ce complexe a été scindé en plusieurs espèces : *R. balthica* (Linnaeus, 1758) = *R. peregra* = *R. ovata*, *R. labiata* (Rossmassler, 1835) et *R. lagotis* (Schränk, 1803) mais cette tentative était basée uniquement sur une région d'ADN (ITS2). De plus, la synonymie de *R. peregra* et *R. ovata* reste contestée. Si certains pensent qu'il s'agit d'espèces conspécifiques (Bargues et al., 2001; Bargues et al., 2003; Bargues et Mas-Coma, 2005; Mas-Coma, 2005) d'autres pensent qu'il s'agit d'espèces différentes (Wulschleger et Jokela, 2002; Wulschleger et al., 2002; Correa et al., 2010). On peut émettre l'hypothèse que comme les travaux séparant les deux espèces se basent sur plusieurs séquences ADN, cette hypothèse est plus probable. Ainsi, le genre *Radix* (**Figure 11 - C3b**) serait composé de deux groupes monophylétiques: un groupe incluant *R. balthica* (= *R. peregra*), *R. labiata* et *R. lagotis* et un autre incluant, entre autres, *R. ovata*, et *R. auricularia* (Correa et al., 2010). D'autres études combinant l'approche moléculaire et morphologique vont dans le même sens (Schniebs et al., 2011; Hunova et al., 2012; Schniebs et al., 2013) ainsi qu'une publication très récente et utilisant les régions ITS-2 et COX-1 (Lawton et al., 2015).

En Amérique du Sud, une espèce appelée « *Galba* sp. » a été observée pour la première fois en Colombie en 2009, a aussi été décrite au Venezuela et en Espagne (Correa et al., 2011) et de la même façon en Iran, au Mexique et en Equateur mais avec le nom « *G. schirazensis* » (Küster, 1862) suite à une analyse phylogénétique (Bargues et al., 2011a). Cette espèce (*Galba* sp.= *G. schirazensis*) est considérée comme une espèce hautement invasive (Bargues et al., 2011a; Correa et al., 2011). Ce nom d'espèce « schirazensis » est problématique pour plusieurs raisons: (1) la description originelle de *G. schirazensis* est uniquement basée sur des caractères morphologiques de la coquille et ces caractères ont montré leur faible valeur dans le cadre de l'identification au niveau de l'espèce au sein des *Lymnaeidae*, (2) il fait référence à une espèce de l'ancien monde alors qu'elle est probablement originaire du Nouveau Monde puisque quatre haplotypes ont été trouvés en Amérique et seulement un seul dans l'Ancien Monde (Jean-Pierre Pointier communication personnelle). Il aurait sans doute mieux valu lui donner un autre nom. Toutefois, comme le nom d'espèce « schirazensis » a été validé par le Code International de Nomenclature Zoologique, il doit être maintenu (Pointier et al., 2015).

Diagnostic de l'infestation chez les limnées

Il est important de détecter qualitativement et quantitativement l'infestation des limnées par *Fasciola* spp. La connaissance précise des hôtes intermédiaires impliqués et de leur biotope spécifique permet de contrôler plus efficacement le parasite (Kaplan et al., 1995). Les techniques utilisées doivent être optimisées pour être simples, économiques, fiables, rapides et utilisables sur de grands échantillons de mollusques prélevés sur le terrain. Cela implique, au moins pour les étapes de mise au point, une modélisation du cycle complet au laboratoire comme cela a été fait pour l'**étude 1**.

La détection de l'infestation chez les mollusques par l'observation au microscope (dissection, écrasement ou *crushing*) n'est pas une technique très sensible comme cela a été démontré lors des **études 1** et **4**, principalement parce qu'il n'est pas facile de visualiser des stades larvaires précoces (sporocystes) du fait de leur taille et de leur localisation. Cela implique d'identifier l'espèce de parasite parmi de nombreuses possibilités sur base de clés morphologiques souvent complexes. Ces techniques sont toutefois très économiques, simples à mettre en œuvre et elles

peuvent apporter des informations complémentaires aux techniques plus modernes (intensité de l'infestation et mobilité des larves par exemple).

La détection de l'infestation parasitaire chez le mollusque peut aussi se faire via des techniques de biologie moléculaire. La première étape est l'extraction de l'ADN. L'ADN nécessaire à l'amplification doit être extrait par un procédé rapide, bon marché et qui ne fait pas appel à des produits potentiellement toxiques pour le manipulateur. Généralement ce sont des protocoles basés sur le couple phénol/chloroforme et la protéinase K (Kaplan et al., 1995; Mostafa et al., 2003; Velusamy et al., 2004) qui sont utilisés mais cette technique comporte de nombreux inconvénients: utilisation de solvants organiques toxiques, transferts multiples de tube à tube, un minimum de trois centrifugations, une nuit d'incubation et un coût relativement élevé. D'autres techniques commercialement disponibles peuvent être utilisées mais elles sont relativement chères et de qualité variable (Capuano et al., 2007). Des techniques basées sur le Chelex®, une résine échangeuse d'ions, ont été développées au cours des 20 dernières années pour divers types d'échantillons (Walsh et al., 1991; Ko et al., 1999) et avec beaucoup de succès. En effet, cette technique présente un meilleur rendement, l'ADN est de qualité suffisante pour réaliser des séquençages ou du clonage, est très simple, très rapide (2 heures *versus* 36 heures), ne nécessite pas de solvant organique, ni de multiples transferts de tube à tube et est meilleur marché que la technique basée sur le phénol/chloroforme et la protéinase K (0,2 versus 0,4 € / mollusque), comme cela a été exposé dans l'**étude 2**. La technique a été optimisée et a prouvé son efficacité pour détecter des infestations naturelles sur de grands échantillons lors des **études 3, 4, 6, 7 et 8**. Une expérimentation récente a aussi fait appel à cette technique en la couplant avec une étape de digestion avec de la protéinase K (Alba et al., 2015b).

Suite à cette étape d'extraction d'ADN, il faut amplifier les séquences d'intérêt. Comme cela a déjà été dit la PCR est une technique très intéressante (*golden standard*) parce qu'elle amplifie avec beaucoup de sensibilité et de spécificité le parasite dans le mollusque et ceci pour des échantillons de tailles importantes et en relativement peu de temps. C'est pourquoi les prévalences obtenues avec cette technique sont souvent supérieures aux prévalences obtenues par microscopie (Cucher et al., 2006). Les **études 1 et 4** l'ont montrées. Néanmoins, cette amplification ne prouve pas que le parasite est vivant (parasite encapsulé ou dégénéré) et que l'infestation donnera lieu à une excrétion de cercaires. C'est le principal inconvénient de cette

technique. Une technique basée sur la détection des ARNm du parasite (et donc la mise en évidence d'une transcription active) permettrait peut-être de lever ce doute. Cependant, la détection des ARNm est beaucoup plus contraignante techniquement parlant que celle de séquence d'ADN. La PCR classique ne donne pas d'information sur l'intensité de l'infestation (aucune technique PCR quantitative comme la PCR en temps réel n'existe à ce jour pour *Fasciola* spp.) et elle implique un matériel onéreux qui réserve son utilisation à des laboratoires de recherche situés principalement dans les pays du Nord comme nous l'avons vu lors de l'**étude 5**. Il n'est pas nécessaire d'avoir une technique très sensible pour détecter le parasite puisque, si un mollusque est infesté par un seul miracidium, une technique ayant un seuil de détection égal à la quantité d'ADN contenue dans cette unité biologique sera suffisante (soit 1 ng) (Kaplan et al., 1995). La prévalence est souvent faible chez les mollusques, il est donc important d'analyser de grands échantillons. La PCR est relativement rapide d'autant plus que les échantillons peuvent être mis en lots et accélérer ainsi le processus (Rognlie et al., 1996; Cucher et al., 2006; Martinez-Ibeas et al., 2013). La présence d'un contrôle interne amplifié en même temps que la séquence d'intérêt (PCR multiplex) est très utile pour la détection d'éventuelles inhibitions de PCR comme cela a été le cas lors des **études 3** et **4**. La dilution des échantillons et la présence du contrôle interne permettent de réduire les inhibitions de PCR et donc le nombre de faux négatifs. Cette technique semble la plus prometteuse et a fait l'objet de publications récentes (Kaset et al., 2010; Martinez-Ibeas et al., 2013; Alba et al., 2015b). On peut regretter que ces techniques n'aient pas encore été utilisées dans le cadre d'infestations naturelles. Ce n'est pas le cas de la PCR multiplex développée dans l'**étude 2** qui a été utilisée pour la première fois en Belgique (**étude 3**), puis en Equateur (**étude 4**), en Algérie (**étude 6**) et au Vietnam (**étude 8**) avec succès et a ainsi démontré qu'elle pouvait s'utiliser dans d'autres contextes épidémiologiques (hôtes intermédiaires différents) sans adaptation préalable. La concentration molaire des amorces est relativement élevée par rapport à d'autres PCR multiplex comparables (Alba et al., 2015b). La technique a montré que de l'ADN ribosomal de *C. daubneyi* était amplifié (**étude 2**) mais sans que cela ne gêne la lecture du résultat pour *Fasciola* spp.. D'autres expérimentations seraient nécessaires pour essayer d'exploiter ce résultat comme cela a été fait par d'autres (Martinez-Ibeas et al., 2013).

Pour les **études 4 et 5**, l'idéal eût été de compléter les résultats par un suivi de l'excrétion de cercaires mais cela n'a pas été possible à cause du manque de temps et d'argent. En effet, si l'excrétion peut être stimulée par refroidissement, elle nécessite beaucoup de matériel pour sa mise en œuvre

Les trois voies d'infestation

Le génome de *F. hepatica* se classe parmi les plus grands de tous les pathogènes (trois fois celui de *Schistosoma mansoni*) avec 1,3 Gb (soit $1,3 \cdot 10^9$ paires de bases). De plus, un haut potentiel évolutif, lui permet de s'adapter rapidement à de nouveaux hôtes (définitifs et intermédiaires), à des changements environnementaux (température) ou à des traitements ou vaccins (Cwiklinski et al., 2015). Cela implique que l'on puisse considérer à côté des hôtes intermédiaires principaux, des hôtes intermédiaires facultatifs (soit vicariants, accessoires ou alternatifs). Très récemment, trois voies différentes de développement de *F. hepatica* ont été identifiées par Rondelaud et Dreyfuss dans la région de Limoges (France), dans des zones où *G. truncatula* n'est pas présente et plus particulièrement dans des fermes où l'élevage des ruminants connaît des risques importants de fasciolose (Rondelaud et al., 2014).

- La première voie implique des limnées capables d'héberger le développement larvaire du parasite avec excrétion de cercaires si elles sont infestées par des miracidia durant leur première semaine de vie (Boray, 1978). Des différences de susceptibilité ont ainsi été mises en évidence selon l'âge (ou la taille des mollusques). Si ces différences n'ont pas été démontrées pour *G. truncatula* (Boray, 1969), cela a été le cas pour d'autres espèces comme *R. balthica* (Dreyfuss et al., 1997) avec une prévalence de 38 % pour les nouveau-nés et de 9 % pour des juvéniles de 1 mm (Dreyfuss et al., 2000b) où la prévalence diminue en fonction de la taille des mollusques infestés et pour *L. stagnalis* où les mêmes observations ont été faites (Kendall, 1950; Boray, 1966; Furmaga et Gundlach, 1967b). Il a été émis comme hypothèse que le système immunitaire des limnées juvéniles (*L. stagnalis*) n'est pas suffisamment mûre pour empêcher leur infestation par *F. hepatica* (Dreyfuss et al., 2000a). Cependant, les infestations expérimentales ont montré une forte mortalité des mollusques exposés, une prévalence faible

accompagnée d'une faible excrétion de cercaires (Dreyfuss et al., 2000b). Cette voie est illustrée par l'**étude 1**.

- La deuxième voie a été décrite durant l'infestation expérimentale séquentielle des mollusques avec *C. daubneyi* puis *F. hepatica* et a montré des infestations réussies (Abrous et al., 1996; Dreyfuss et al., 2007) ; cela a aussi été observé lors d'infestations naturelles de mollusques (Abrous et al., 1999). On peut parler dans ce cas de facilitation ou de susceptibilité acquise. La prévalence est souvent basse et peu de cercaires sont émises. L'impact épidémiologique de ces deux premières voies est très certainement limité dans les conditions naturelles (Rondelaud et al., 2014) et elles n'expliquent pas tout. Par exemple, elles n'expliquent pas l'infestation d'*O. glabra* dans des jardins clos de particuliers et en l'absence totale de bovins ou d'ovins près de ces jardins pendant au moins 10 ans (Dreyfuss et al., 2003). Seuls des lagomorphes régulièrement infestés y étaient présents (Rondelaud et al., 2001a).

- Une troisième voie, qui a un impact épidémiologique probablement plus important, a été mise en évidence suite à l'infestation de cinq générations successives de mollusques pré-adultes provenant de parents déjà infestés par le parasite. L'étude révèle une augmentation progressive de la prévalence et de l'excrétion de cercaires (Rondelaud et al., 2015a). Cela a aussi été montré pour *F. hepatica* et *R. balthica* (Rondelaud et al., 2014), pour *O. glabra* (Rondelaud et al., 2015a) et pour *G. neotropica* et *G. viatrix* (Sanabria et al., 2012). On notera que le même résultat a été rapporté pour *G. schirazensis* (Dreyfuss et al., 2014) et *G. cubensis* (Vignoles et al., 2014) mais cette fois-ci avec *Fascioloides magna* une espèce relativement proche de *F. hepatica*. Une diminution de prévalence a été toutefois mise en évidence pour *G. truncatula* à la génération F1 dans une autre étude (Vignoles et al., 2003). Cette voie pourrait être illustrée par les résultats obtenus lors des **études 3 et 4**.

Il est difficile d'utiliser les données de la littérature publiées avant l'utilisation des données fournies par la biologie moléculaire et concernant les infestations naturelles ou expérimentales de mollusques appartenant à des complexes d'espèces pour lesquelles l'identification reposait essentiellement sur des caractéristiques morphologiques et anatomiques. En effet, pour des publications datant d'avant la publication de Bargues et collègues (2001) et portant sur des limnées appartenant au complexe « *R. peregra* » il n'est pas possible de déterminer s'il s'agit en

fait de *R. peregra*, de *R. balthica*, de *R. labiata*, ou de *R. ovata*. On peut néanmoins constater que les membres du complexe montrent une susceptibilité à *F. hepatica*, aussi bien lors d'infestations naturelles (**Tableau V**) qu'expérimentales (**Tableau VI**). L'**étude 1** a montré que *R. labiata* pouvait héberger le parasite lors d'infestations expérimentales et permettre l'excrétion de cercaires infestantes chez le rat de manière comparable à *G. truncatula*. On notera que lors de la campagne d'échantillonnage de l'**étude 3**, *R. labiata* était fortement sous-représentée contrairement à *R. balthica*. Les infestations expérimentales de *R. balthica* durant l'**étude 1** ont été peu concluantes ce qui semble contradictoire avec la littérature disponible à la fois ancienne (**Tableau V** et **VI**) et plus récente (Relf et al., 2009). On peut avancer comme hypothèse que le taux de mortalité de *R. balthica* dans l'élevage et durant l'infestation était relativement élevé (respectivement 38 % et 54 % (à 50 JPE)) et que seulement deux infestations ont été possibles. On peut aussi émettre l'hypothèse que la population n'était pas très réceptive au parasite. En effet, des variations importantes de prévalence peuvent exister au sein d'une même espèce. Ainsi pour *G. truncatula*, la prévalence au sein de sept populations varie de 5 à 80 % (Rondelaud et al., 2004a) et de la même façon pour *R. ovata*, où les prévalences s'étalaient de 2,7 à 43,7 % (Dreyfuss et al., 2000b). Une hypothèse émise pour expliquer cette variabilité inter-populationnelle est l'influence du contact préalable de la population de mollusques avec le parasite (le miracidium sélectionne le mollusque réceptif), le mollusque se sensibilisant au contact du parasite (Rondelaud, 1993; Abrous et al., 1998b) comme cela est décrit plus haut (voie 3). *Radix balthica* a en effet émis des cercaires suite à l'infestation successive de trois générations (Rondelaud et al., 2014) et ce mécanisme peut très probablement avoir lieu sur le terrain. La faune sauvage peut jouer un rôle à ce niveau (Valero et al., 1998; Menard et al., 2000; Menard et al., 2001; Rondelaud et al., 2001a) et ainsi favoriser la dissémination du parasite via des infestations allopatriques favorables (Gasnier et al., 2000). On notera que le chevreuil (*Capreolus capreolus*), lui, ne semble pas très impliqué (Arias et al., 2013). Deux hypothèses complémentaires doivent être prises en considération. Premièrement, comme les œufs utilisés lors des expérimentations d'infestation successives étaient produits par des parents infestés, peut-être y-a-t-il eu un phénomène de sélection qui a contribué à sélectionner les individus les plus sensibles en diminuant la variation génétique de la résistance à l'hôte. Deuxièmement, une réduction progressive du nombre de neurones ganglionnaires chez les générations successives de mollusques infestés ne peut pas être exclue (Szmidski-Adjide et al., 1996). En effet, il a été montré

que la réduction du nombre de ces neurones pouvait être impliquée dans des changements au niveau de la réponse du système immunitaire vis à vis de *F. hepatica* (de Jong-Brink, 1990; Rondelaud et al., 2014).

L'**étude 4** a montré pour la première fois en Equateur que *G. schirazensis* pouvait être naturellement infestée par *F. hepatica* ce qui suggère l'éventualité d'un rôle potentiel de ce mollusque dans la transmission de la fasciolose. Cependant, certains auteurs (Bargues et al., 2011a) ont indiqué qu'aucun des 8452 mollusques de cette espèce prélevés dans huit pays n'a montré d'excrétion de cercaires, pas plus que les 338 mollusques infestés expérimentalement. Il faut néanmoins noter que toutes les infestations expérimentales étaient allopatriques, avec peu de mollusques (jusqu'à 10), avec un seul miracidium et avec une mortalité très importante à 30 JPE (jusqu'à 100 %), ce qui ne permet pas une évaluation correcte de la compétence et de la capacité vectorielle de *G. schirazensis*. Dans l'**étude 4**, les deux biotopes contenaient deux populations de *G. schirazensis* qui semblaient présenter des différences de susceptibilité à *F. hepatica*. Des différences de susceptibilité ont aussi été mises en évidence pour *P. columella* (Gutierrez et al., 2003). Des expérimentations ont montré que, suite à l'infestation par *F. hepatica* de cinq générations successives de *G. schirazensis*, la prévalence n'augmentait pas et très peu de mollusques excrétaient des cercaires (Dreyfuss et al., 2014). Plusieurs hypothèses peuvent être émises dans ce cas : (1) une plus forte pression de sélection lors des générations successives ($n > 5$) doit être présente, (2) une co-infection avec un autre digène est nécessaire ou (3) une incompatibilité entre les souches de mollusques et de parasites rend l'infestation stérile. En effet, il s'agissait d'infestations expérimentales allopatriques utilisant des souches de parasites provenant de France avec des mollusques provenant de Colombie (Dreyfuss et al., 2014) et ce système n'est pas ce que l'on retrouve dans la nature où en suivant l'hypothèse de la reine rouge, une forte pression de sélection s'exerce sur les parasites pour s'adapter à la population locale (King et al., 2011). Il faut noter que dans l'**étude 4**, *G. schirazensis* a été la seule espèce de mollusque présente, que de l'ADN de *F. hepatica* a été détecté dans 8,5 % des mollusques du biotope 1 (avec des formes larvaires vivantes) et que la ferme présentait un historique de fasciolose au long cours. En Colombie et au Venezuela, *G. schirazensis* a aussi été la seule espèce retrouvée dans de nombreuses zones de haute endémicité (J.-P. Pointier, observation personnelle). On peut conclure que *G. schirazensis* ne semble pas totalement réfractaire à *F.*

hepatica et que d'autres expérimentations seraient nécessaires pour déterminer son importance dans le cycle de *F. hepatica* : des infestations expérimentales sympatriques, des échantillonnages sur une période plus longue et un suivi des excréments de cercaires.

Considérations écologiques

R. balthica est une espèce de type euryèce, c'est-à-dire qui a de grandes valences écologiques alors que *G. truncatula* à l'opposé est sténoèce. Cela a été mis en évidence dans l'**étude 3** en utilisant les analyses CART. *R. balthica* est aussi appelée « la limnée voyageuse » ; sa structure de population est très particulière car elle est dominée par une dispersion géographique passive dans laquelle les oiseaux sauvages aquatiques ont un rôle primordial (Pfenninger et al., 2011). Cette espèce présente une très grande adaptabilité. Ainsi, *R. balthica* est considérée comme une espèce très répandue en Europe (Faltynkova et al., 2006) et très résiliente (Pfenninger et al., 2011), qui est capable de vivre dans de l'eau très riche en matière organique (c'est-à-dire polluée) (Baur et Ringeis, 2002), contrairement à *G. truncatula*. Lors de l'**étude 3**, les deux tiers des mollusques récoltés étaient des *R. balthica*. Cette espèce est beaucoup plus aquatique que *G. truncatula* ; elle occupe donc une niche écologique différente composée de zones humides permanentes (mare, petit ruisseau, rivière), ce qui pourrait expliquer une extension de la fasciolose dans des régions auparavant indemnes, particulièrement si *G. truncatula* y est absente (Boray, 1966; Abrous et al., 1998a; Relf et al., 2009). En effet, *G. truncatula* n'est pas très résistante à des variations climatiques importantes (Rondelaud et Morel-Vareille, 1975; Rondelaud, 1994) et sous de telles conditions, d'autres vecteurs potentiels pourraient jouer un rôle important dans la transmission. Une étude sur la modélisation des niches écologiques a prédit une possible extension de *R. balthica* vers le Nord, et cela est déjà observé en Suède probablement du fait de l'augmentation de la température des lacs (Cordellier et Pfenninger, 2009).

Il faut ajouter ici le parallèle entre *R. balthica* en Belgique et *G. schirazensis* en Equateur. Selon les **études 3** et **4**, il s'agit d'espèces qui pourraient éventuellement intervenir dans le cycle de *F. hepatica*. Leur localisation dans des milieux plus aquatiques que l'hôte intermédiaire principal, leur haut potentiel invasif (et donc leur grande adaptabilité) et leur appartenance à des complexes

d'espèces difficilement identifiables ajoutent des dimensions supplémentaires à l'épidémiologie du parasite dont il faut tenir compte impérativement dans une optique de contrôle.

La modélisation de la distribution spatiale de l'hôte intermédiaire devrait être une étape importante vers le développement de cartes reprenant la répartition des risques à l'échelle d'une ferme et vers le contrôle de la fasciolose. L'abondance des mollusques est variable selon les types de biotopes mais on trouve souvent *G. truncatula* dans les fossés en Belgique (Charlier et al., 2014a). La localisation géographique a été le paramètre le plus explicatif en ce qui concerne la présence des *G. truncatula* dans les mares durant l'**étude 3**. Un système d'information géographique pertinent devrait être composé de plusieurs couches : les précipitations, le type de sol, et la localisation des petits points d'eau (Charlier et al., 2014a), ce qui semble problématique du fait de la résolution très fine que cela implique et du fait de l'aspect temporaire de ces biotopes. De façon très étonnante, la présence de limnées infestées ne semble pas liée à la présence de ruminants lors de l'**étude 3** ; il importe toutefois de considérer la combinaison de facteurs de gestion et des facteurs caractérisant les biotopes à limnées pour un modèle évaluant les risques d'infestation. Les résultats de l'**étude 4** pourraient permettre de valider en Equateur un précédent modèle validé en Bolivie et au Pérou (Fuentes et al., 2005).

Immunité des mollusques

Outre *F. gigantica* et même *Fascioloides magna*, la limnée tronquée peut héberger treize espèces connues de digènes dont des Echinostomatidés, des Plagiorchidés et des Paramphistomatidés et certainement aussi d'autres digènes non encore identifiés (Rondelaud et al., 2009, 2015b). Le genre *Radix* semble être très susceptible aux infestations par des trématodes puisque des infestations naturelles ont été enregistrées pour *F. gigantica* (Velusamy et al., 2004), *Fascioloides magna* (Faltynkova et al., 2006), *Trichobilharzia regenti* (Skirnisson et al., 2009), *T. franki* (Jouet et al., 2010) et pour des Echinostomatidés (Bargues et al., 2001). Les raisons de cette tolérance parasitaire sont peu connues bien que la vaste distribution géographique, la grande adaptabilité, la haute densité et des éléments immunologiques sont sans doute impliqués.

La littérature fournit principalement des données sur le système immunitaire des mollusques et les interactions hôtes-parasites dans le cadre d'études sur le modèle *Biomphalaria glabrata* et *Schistosoma mansoni*. La spécificité d'hôte peut s'exprimer très tôt chez certaines espèces de digènes (*Schistosoma mansoni*) qui peuvent avoir des miracidia qui ne pénètrent que les hôtes appropriés (Sullivan et Yeung, 2011) mais la pénétration d'hôtes inappropriés a été aussi montrée dans d'autres modèles (*decoy effect*) (Johnson et al., 2009). L'épithélium du mollusque joue assurément un rôle important de filtre. L'encapsulation spécifique du parasite par les hémocytes suite à sa pénétration (McReath et al., 1982) et l'implication de composés hormonaux spécifiques suggèrent que le phénomène de spécificité d'hôte n'est pas indépendant des capacités discriminatoires innées du système immunitaire du mollusque (Adema et Loker, 2015) (Rondelaud et al., 2009).

Des expérimentations ont montré il y a quatre décennies (Lie et al., 1975) que le système immunitaire de *B. glabrata* pouvait acquérir des mécanismes de défense efficaces ou non selon le parasite impliqué (*Echinostoma lindoense* versus *Schistosoma mansoni*). Des lectines (*fibrinogen related protein : FREP*) produites par le mollusque peuvent se lier à des antigènes glucidiques du parasite (*pathogen-associated molecular pattern: PAMP*) et ainsi activer les hémocytes vers la destruction de ceux-ci (via par exemple des *reactive oxygen species : ROS*). Ces lectines sont produites par de nombreuses familles de gènes et leur large variabilité (qui n'a rien à envier à celle des immunoglobulines des mammifères) est sous-tendue par des mécanismes de mutations génétiques aléatoires (Adema et Loker, 2015).

Un mécanisme d'échappement par mimétisme a été mis en évidence et consiste en la similarité entre les polysaccharides portés par les sporocystes et par les hémocytes (Yoshino et al., 2012). Ce mécanisme pourrait être à la base même de la spécificité d'hôte : une grande similarité étant associée à une compatibilité par échec de la reconnaissance du non-soi par le système immunitaire du mollusque (Kawasaki et al., 2013). Le parasitisme favoriserait donc la diversification des polysaccharides chez le mollusque. Cela pourrait être une explication de la troisième voie d'infestation vue plus haut : il y aurait sélection de génération en génération de mollusques avec des hémocytes qui présentent des polysaccharides identiques à ceux portés par les sporocystes. Ce mécanisme est peut-être déjà à l'œuvre lors de la pénétration du miracidium au niveau de l'épithélium du mollusque. D'autres scénarios seraient possibles pour expliquer

l'immuno-évasion des larves de trématodes comme par exemple des interférences liés à la production d'antigènes d'excrétion-sécrétion par le trématode (van der Knaap et Loker, 1990). Une revue très récente reprend les avancées effectuées dans ce domaine grâce aux techniques modernes (les « -omiques » : génomiques, transcriptomiques, protéomiques, ...) (Coustau et al., 2015). La spécificité de l'association digène-hôte est liée à la spécificité du système immunitaire des mollusques et est un moteur pour la diversification génétique des digènes et des mollusques (Adema et Loker, 2015), ce qui illustre parfaitement l'hypothèse de la reine rouge : une coévolution antagoniste qui accélère l'évolution moléculaire (Paterson et al., 2010).

CHAPITRE 5 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail a permis de mettre en évidence des hôtes intermédiaires alternatifs de *F. hepatica* en Belgique et en Equateur en réalisant des infestations expérimentales et en diagnostiquant l'infestation par des techniques microscopiques et moléculaires.

Galba truncatula n'est pas le seul mollusque *Lymnaeidae* impliqué et il importe de tenir compte de ces autres espèces dans le cadre d'une gestion agronomique et médicale globale et de l'évaluation des risques d'infestation chez le bétail et chez l'homme. Dans le contexte actuel de gestion raisonnée du parasitisme, la maîtrise des populations de ces hôtes intermédiaires constitue une cible de choix mais il ne faut pas sous-estimer les très fortes capacités adaptatives de la relation hôte-parasite.

La grande adaptabilité aussi bien du parasite que de l'hôte intermédiaire rend l'épidémiologie de ce parasite fascinant et de nombreux points d'interrogation demeurent. Une modélisation mathématique de l'évolution de la prévalence en fonction des générations de mollusques pourrait être faite puisque certains éléments peuvent être connus : vitesse d'accroissement de la prévalence au laboratoire, dynamique de population et nombre de générations de mollusques par an, pression d'infestation et cinétique de contamination de la pâture. Les générations de mollusques non-infestés tendent-elles à diluer cette augmentation de prévalence ? Quel est le R_0 ? Y-a-t-il une prévalence seuil chez l'hôte définitif pour observer une adaptation du mollusque ? Quel est le rôle de la faune sauvage ? Il faudrait aussi déterminer dans quelle mesure cette troisième voie d'infestation est active sous conditions naturelles en faisant un suivi à long terme d'une pâture sans l'hôte intermédiaire principal mais avec un hôte intermédiaire alternatif, en mettant régulièrement en pâture des bovins contaminés par la douve du foie et en suivant la prévalence chez les mollusques. De la même façon, il faudrait déterminer quels sont les mécanismes génétiques et immunitaires qui sous-tendent cette adaptation.

En Amérique du sud, le rôle épidémiologique de *G. schirazensis* doit être précisé. Des infestations expérimentales sympatriques au cours de plusieurs générations successives avec suivi par excrétion de cercaires doivent être réalisées. L'invasion de l'Amérique du sud par cette espèce (au détriment d'autres espèces comme *G. cousini* comme cela est noté par certains

spécialistes actuellement) va la mettre de plus en plus en contact avec le parasite et il serait étonnant que la situation n'évolue pas.

Les techniques optimisées d'extraction d'ADN et de PCR multiplex sont capables de mettre en évidence ces nouveaux acteurs dans des contextes épidémiologiques très variables. Néanmoins, le couplage avec des techniques microscopiques paraît important pour compléter ces données. Une adaptation de ces techniques pour d'autres trématodes est envisagée notamment pour les trichobilharzioses qui ont un impact certain en Santé Publique en Belgique (Lacs de l'Eau d'Heure) et dans d'autres pays européens (Soldanova et al., 2013).

Cette étude illustre le fait que le statut d'hôte intermédiaire est variable dans le temps et l'espace. Les rapides et fortes capacités adaptatives des différents acteurs du trio hôte intermédiaire – pathogène - milieu rendent ces relations modulables, comme cela a été prédit par l'hypothèse de la reine rouge.

CHAPITRE 6 : RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abrous, M., 1999. Les mollusques hôtes et les formes larvaires de *Paramphistomum daubneyi* Dinnik, 1962 (*Trematoda*) dans le centre de la France. Influence d'une co-infestation avec *Fasciola hepatica* Linné, 1758. Université de Limoges, Limoges.
- Abrous, M., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., 1996. *Paramphistomum daubneyi* and *Fasciola hepatica*: the effect of dual infection on prevalence and cercarial shedding in preadult *Lymnaea glabra*. J. Parasitol. 82, 1026-1029.
- Abrous, M., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., Cabaret, J., 1998a. Unusual transmission of the liver fluke, *Fasciola hepatica*, by *Lymnaea glabra* or *Planorbis leucostoma* in France. J. Parasitol. 84, 1257-1259.
- Abrous, M., Roumieux, L., Dreyfuss, G., Rondelaud, D., Mage, C., 1998b. Proposition of a simple method for the production of *Fasciola hepatica* metacercariae from the snail *Lymnaea truncatula*. Rev. Med. Vet. 149, 943-948.
- Abrous, M., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., Cabaret, J., 1999. Infection of *Lymnaea truncatula* and *Lymnaea glabra* by *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi* in farms of central France. Vet. Res. 30, 113-118.
- Abrous, M., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., 2000. A field study of natural infections in three freshwater snails with *Fasciola hepatica* and/or *Paramphistomum daubneyi* in central France. J. Helminthol. 74, 189-194.
- Abrous, M., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., 2001. The stress of *Lymnaea truncatula* just before miracidial exposure with *Fasciola hepatica* increased the prevalence of infection. Exp. Parasitol. 99, 49-51.
- Adema, C.M., Loker, E.S., 2015. Digenean-gastropod host associations inform on aspects of specific immunity in snails. Dev. Comp. Immunol. 48, 275-283.
- Ai, L., Li, C., Elsheikha, H.M., Hong, S.J., Chen, J.X., Chen, S.H., Li, X., Cai, X.Q., Chen, M.X., Zhu, X.Q., 2010. Rapid identification and differentiation of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. Vet. Parasitol. 174, 228-233.
- Alba, A., Hernandez, H.M., Marcet, R., Vazquez, A.A., Figueredo, M., Sanchez, J., Otero, O., Sarracent, J., 2015a. A novel monoclonal antibody-based immunoenzymatic assay for epidemiological surveillance of the vector snails of *Fasciola hepatica* (*Trematoda: Digenea*). Int. J. Parasitol. 45, 113-119.
- Alba, A., Vazquez, A.A., Hernandez, H., Sanchez, J., Marcet, R., Figueredo, M., Sarracent, J., Fraga, J., 2015b. A multiplex PCR for the detection of *Fasciola hepatica* in the intermediate snail host *Galba cubensis*. Vet. Parasitol. 211, 195-200.

- Alvarez Rojas, C.A., Jex, A.R., Gasser, R.B., Scheerlinck, J.P., 2014. Techniques for the diagnosis of *Fasciola* infections in animals: room for improvement. *Adv. Parasitol.* 85, 65-107.
- Amato, S.B., De Rezende, H.E., Gomes, D.C., Da Serra Freire, N.M., 1986. Epidemiology of *Fasciola hepatica* infection in the Paraiba River Valley, Sao Paulo, Brasil. *Vet. Parasitol.* 22, 275-284.
- Andrews, J.S., 1999. The life cycle of *Fasciola hepatica*., In: Dalton, J.P. (Ed.) Fasciolosis. CABI publishing, Wallingford, Oxon, U.K., pp. 1-29.
- Arias, M., Pineiro, P., Hillyer, G.V., Suarez, J.L., Francisco, I., Cortinas, F.J., Diez-Banos, P., Morrondo, P., Sanchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., 2010. An approach of the laboratory to the field: assessment of the influence of cattle management on the seroprevalence of fascioliasis by using polyclonal- and recombinant-based ELISAs. *J. Parasitol.* 96, 626-631.
- Arias, M.S., Pineiro, P., Sanchez-Andrade, R., Suarez, J.L., Hillyer, G.V., Diez-Banos, P., Paz-Silva, A., Morrondo, P., 2013. Relationship between exposure to *Fasciola hepatica* in roe deer (*Capreolus capreolus*) and cattle extensively reared in an endemic area. *Res. Vet. Sci.* 95, 1031-1035.
- Armour, J., Urquhart, G.M., Jennings, F.W., Reid, J.F., 1970. Studies on ovine fascioliasis. II. The relationship between the availability of metacercariae of *Fasciola hepatica* on pastures and the development of the clinical disease. *Vet. Rec.* 86, 274-277.
- Ashrafi, K., Bargues, M.D., O'Neill, S., Mas-Coma, S., 2014. Fascioliasis: a worldwide parasitic disease of importance in travel medicine. *Travel. Med. Infect. Dis.* 12, 636-649.
- Audousset, J.C., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., Varelle-Morel, C., 1989. Les émissions cercariennes de *Fasciola hepatica* L. chez le mollusque *Lymnaea truncatula* Müller. A propos de quelques observations chronobiologiques. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* 7, 217-224.
- Augot, D., 1998. Génération rédienne de *Fasciola hepatica* Linné, 1758 (*Trematoda* : *Fasciolidae*) chez *Lymnaea truncatula* Müller, 1774 (*Gasteropoda* : *Lymnaeidae*). Identification et influence sur la productivité parasitaire. Thèse de doctorat, Université de Limoges, Limoges.
- Augot, D., Abrous, M., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., 1996. *Paramphistomum daubneyi* and *Fasciola hepatica*: the redial burden and cercarial shedding in *Lymnaea truncatula* subjected to successive unimiracidial cross-exposures. *Parasitol. Res.* 82, 623-627.
- Augot, D., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., Cabaret, J., Bayssade-Dufour, C., Albaret, J.L., 1998. Characterization of *Fasciola hepatica* redial generations by morphometry and chaetotaxy under experimental conditions. *J. Helminthol.* 72, 193-198.

- Barber, I.W., 1962. The pathology produced in the snail *Lymnaea columella* Say, 1817, by the larval stages of *Fasciola hepatica* L., 1758. Univ. California, Berkeley.
- Bargues, M.D., Mas-Coma, S., 2005. Reviewing lymnaeid vectors of fascioliasis by ribosomal DNA sequence analyses. *J. Helminthol.* 79, 257-267.
- Bargues, M.D., Oviedo, J.A., Mas-Coma, M.S., 1995. Infestaciones experimentales y naturales por *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758)(Trematoda: *Fasciolidae*) en *Lymnaea* sp. (Gastropoda: Lymnaeidae) del Altiplano Norte boliviano. In: VI Congreso Ibérico de Parasitología, Santiago de Compostela, Espagne, 24-28 July 1995, pp. 139-140.
- Bargues, M.D., Vigo, M., Horak, P., Dvorak, J., Patzner, R.A., Pointier, J.P., Jackiewicz, M., Meier-Brook, C., Mas-Coma, S., 2001. European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. *Infect. Genet. Evol.* 1, 85-107.
- Bargues, M.D., Horak, P., Patzner, R.A., Pointier, J.P., Jackiewicz, M., Meier-Brook, C., Mas-Coma, S., 2003. Insights into the relationships of Palearctic and Nearctic lymnaeids (*Mollusca: Gastropoda*) by rDNA ITS-2 sequencing and phylogeny of stagnicoline intermediate host species of *Fasciola hepatica*. *Parasite* 10, 243-255.
- Bargues, M.D., Artigas, P., Khoubbane, M., Flores, R., Gloer, P., Rojas-Garcia, R., Ashrafi, K., Falkner, G., Mas-Coma, S., 2011a. *Lymnaea schirazensis*, an overlooked snail distorting fascioliasis data: genotype, phenotype, ecology, worldwide spread, susceptibility, applicability. *PLoS One* 6, e24567.
- Bargues, M.D., Artigas, P., Khoubbane, M., Mas-Coma, S., 2011b. DNA sequence characterisation and phylogeography of *Lymnaea cousini* and related species, vectors of fascioliasis in northern Andean countries, with description of *L. meridensis* n. sp. (*Gastropoda: Lymnaeidae*). *Parasit. Vectors* 4, 132.
- Bargues, M.D., Gonzalez, L.C., Artigas, P., Mas-Coma, S., 2011c. A new baseline for fascioliasis in Venezuela: lymnaeid vectors ascertained by DNA sequencing and analysis of their relationships with human and animal infection. *Parasit. Vectors* 4, 200.
- Bargues, M.D., Artigas, P., Khoubbane, M., Ortiz, P., Naquira, C., Mas-Coma, S., 2012. Molecular characterisation of *Galba truncatula*, *Lymnaea neotropica* and *L. schirazensis* from Cajamarca, Peru and their potential role in transmission of human and animal fascioliasis. *Parasit. Vectors* 5, 174.
- Barker, R.H., Jr., 1994. Use of PCR in the field. *Parasitol. Today* 10, 117-119.
- Baur, B., Ringeis, B., 2002. Changes in gastropod assemblages in freshwater habitats in the vicinity of Basel (Switzerland) over 87 years. *Hydrobiologia* 479, 1-10.

- Belfaiza, M., Abrous, M., Rondelaud, D., Moncef, M., Dreyfuss, G., 2004a. The use of Tetraphyll as food for snails increases the intensity of cercarial shedding in *Galba truncatula* infected with *Fasciola hepatica*. Parasitol. Res. 94, 86-90.
- Belfaiza, M., Rondelaud, D., Moncef, M., Dreyfuss, G., 2004b. *Fasciola hepatica*: cercarial productivity of redial generations in long-surviving *Galba truncatula*. J. Helminthol. 78, 115-120.
- Belfaiza, M., Rondelaud, D., Moncef, M., Dreyfuss, G., 2004c. *Fasciola hepatica*: the effect of food quality on the development of redial generations in *Galba truncatula* infected with allopatric miracidia. Parasitol. Res. 92, 12-17.
- Belfaiza, M., Moncef, M., Rondelaud, D., 2005. *Fasciola hepatica*: an unusual case of adaptation to a Moroccan population of *Galba truncatula*. Parasitol. Res. 95, 374-378.
- Bennema, S.C., Ducheyne, E., Vercruyssen, J., Claerebout, E., Hendrickx, G., Charlier, J., 2010. Relative importance of management, meteorological and environmental factors in the spatial distribution of *Fasciola hepatica* in dairy cattle in a temperate climate zone. Int. J. Parasitol. 40, 103-110.
- Bergeron, P., Laurent, M., 1970. Différences entre la morphologie testiculaire de *Fasciola hepatica* et *F. gigantica*. 23, 223-227.
- Berghen, P., 1964. Some Lymnaeidea as intermediate host of *Fasciola hepatica* in Belgium. Exp. Parasitol. 15, 118-124.
- Bernardo, C., Carneiro, M.B., Avelar, B.R., Donatele, D.M., Martins, I.V., Pereira, M.J., 2011. Prevalence of liver condemnation due to bovine fasciolosis in Southern Espirito Santo: temporal distribution and economic losses. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 20, 49-53.
- Beynon, S.A., 2012. Potential environmental consequences of administration of anthelmintics to sheep. Vet. Parasitol. 189, 113-124.
- Boray, J.C., 1966. Studies on the relative susceptibility of some lymnaeids to infection with *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* and on the adaptation of *Fasciola* spp. Ann. Trop. Med. Parasitol. 60, 114-124.
- Boray, J.C., 1967. Host-parasite relationship between Lymnaeid snails and *Fasciola hepatica*. Vet. Med. Rev., 132-140.
- Boray, J.C., 1969. Experimental fascioliasis in Australia. Adv. Parasitol. 7, 95-210.
- Boray, J.C., 1978. The potential impact of exotic *Lymnaea* spp. on fascioliasis in Australasia. Vet. Parasitol. 4, 127-141.
- Born-Torrijos, A., Poulin, R., Raga, J.A., Holzer, A.S., 2014. Estimating trematode prevalence in snail hosts using a single-step duplex PCR: how badly does cercarial shedding underestimate infection rates? Parasit. Vectors 7, 243.

- Bossaert, K., 2000. Influences de la réponse immunitaire des bovins et de paramètres climatiques sur l'épidémiologie de la fasciolose (*Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758). Thèse de doctorat, Université de Liège, Liège.
- Bossaert, K., Lonnew, J.F., Godeau, J.M., Peeters, J., Losson, B., 1999. Serological and biochemical follow-up in cattle naturally infected with *Fasciola hepatica*, and comparison with a climate model for predicting risks of fasciolosis. *Vet. Res.* 30, 615-628.
- Bouchet, P., Rocroi, J.P., 2005. Classification and nomenclator of gastropod families. G.T. Poppe & S.P. Tagaro, Lapu-Lapu city, Philippines.
- Bronmark, C., Lakowitz, T., Hollander, J., 2011. Predator-induced morphological plasticity across local populations of a freshwater snail. *PLoS One* 6, e21773.
- Busson, P., Busson, D., Rondelaud, D., Pestre-Alexandre, M., 1982. Données expérimentales sur l'infestation des jeunes de cinq espèces de limnées par *Fasciola hepatica* L. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 57, 555-563.
- Cancrini, G., Iori, A., 2004. Traditional and innovative diagnostic tools: when and why they should be applied. *Parassitologia* 46, 173-176.
- Capuano, F., Rinaldi, L., Maurelli, M.P., Perugini, A.G., Musella, V., Cringoli, G., 2007. A comparison of five methods for DNA isolation from liver and rumen flukes to perform ITS-2 amplification. *Parassitologia* 49, 27-31.
- Caron, Y. 2004. Une étude de la faune malacologique associé aux petites surfaces aquatiques en Belgique et évaluation préliminaires par des techniques de biologie moléculaire du rôle potentiel de différentes espèces dans le maintien du cycle de *Fasciola hepatica* (*Trematoda*, Linnaeus 1758) (Liège, Université de Liège), p. 35. .
- Charlier, J., Duchateau, L., Claerebout, E., Williams, D., Vercruysse, J., 2007. Associations between anti-*Fasciola hepatica* antibody levels in bulk-tank milk samples and production parameters in dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 78, 57-66.
- Charlier, J., De Meulemeester, L., Claerebout, E., Williams, D., Vercruysse, J., 2008. Qualitative and quantitative evaluation of coprological and serological techniques for the diagnosis of fasciolosis in cattle. *Vet. Parasitol.* 153, 44-51.
- Charlier, J., De Cat, A., Forbes, A., Vercruysse, J., 2009. Measurement of antibodies to gastrointestinal nematodes and liver fluke in meat juice of beef cattle and associations with carcass parameters. *Vet. Parasitol.* 166, 235-240.
- Charlier, J., Hostens, M., Jacobs, J., Van Ranst, B., Duchateau, L., Vercruysse, J., 2012. Integrating fasciolosis control in the dry cow management: the effect of closantel treatment on milk production. *PLoS One* 7, e43216.

- Charlier, J., Meyns, T., Soenen, K., Vercruyse, J., 2013. Monitoring gastrointestinal nematode and liver fluke infections in Belgium by bulk tank milk ELISA: are we making progress in parasite control? *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 82, 17-22.
- Charlier, J., Soenen, K., De Roeck, E., Hantson, W., Ducheyne, E., Van Coillie, F., De Wulf, R., Hendrickx, G., Vercruyse, J., 2014a. Longitudinal study on the temporal and micro-spatial distribution of *Galba truncatula* in four farms in Belgium as a base for small-scale risk mapping of *Fasciola hepatica*. *Parasit. Vectors* 7, 528.
- Charlier, J., Vercruyse, J., Morgan, E., van Dijk, J., Williams, D.J., 2014b. Recent advances in the diagnosis, impact on production and prediction of *Fasciola hepatica* in cattle. *Parasitol.* 141, 326-335.
- Claridge, J., Diggle, P., McCann, C.M., Mulcahy, G., Flynn, R., McNair, J., Strain, S., Welsh, M., Baylis, M., Williams, D.J., 2012. *Fasciola hepatica* is associated with the failure to detect bovine tuberculosis in dairy cattle. *Nat. Commun.* 3, 853.
- Coelho, L.H., Lima, W.S., 2003. Population dynamics of *Lymnaea columella* and its natural infection by *Fasciola hepatica* in the State of Minas Gerais, Brazil. *J. Helminthol.* 77, 7-10.
- Conceicao, M.A., Duraõ, R.M., Costa, I.H., da Costa, J.M., 2002. Evaluation of a simple sedimentation method (modified McMaster) for diagnosis of bovine fascioliasis. *Vet. Parasitol.* 105, 337-343.
- Cordellier, M., Pfenninger, M., 2009. Inferring the past to predict the future: climate modelling predictions and phylogeography for the freshwater gastropod *Radix balthica* (*Pulmonata*, *Basommatophora*). *Molec. Ecol.* 18, 534-544.
- Correa, A.C., Escobar, J.S., Durand, P., Renaud, F., David, P., Jarne, P., Pointier, J.P., Hurtrez-Bousses, S., 2010. Bridging gaps in the molecular phylogeny of the *Lymnaeidae* (*Gastropoda: Pulmonata*), vectors of fascioliasis. *BMC Evol. Biol.* 10, 381.
- Correa, A.C., Escobar, J.S., Noya, O., Velasquez, L.E., Gonzalez-Ramirez, C., Hurtrez-Bousses, S., Pointier, J.P., 2011. Morphological and molecular characterization of Neotropical *Lymnaeidae* (*Gastropoda: Lymnaeidae*), vectors of fasciolosis. *Infect. Genet. Evol.* 11, 1978-1988.
- Coustau, C., Gourbal, B., Duval, D., Yoshino, T.P., Adema, C.M., Mitta, G., 2015. Advances in gastropod immunity from the study of the interaction between the snail *Biomphalaria glabrata* and its parasites: A review of research progress over the last decade. *Fish Shellfish Immunol.* 46, 5-16.
- Cruz-Mendoza, I., Quiroz-Romero, H., Correa, D., Gomez-Espinoza, G., 2011. Transmission dynamics of *Fasciola hepatica* in the Plateau Region of Mexico. Effect of weather and treatment of mammals under current farm management. *Vet. Parasitol.* 175, 73-79.

- Cucher, M.A., Carnevale, S., Prepelitchi, L., Labbe, J.H., Wisnivesky-Colli, C., 2006. PCR diagnosis of *Fasciola hepatica* in field-collected *Lymnaea columella* and *Lymnaea viatrix* snails. *Vet. Parasitol.* 137, 74-82.
- Cwiklinski, K., Dalton, J.P., Dufresne, P.J., La Course, J., Williams, D.J., Hodgkinson, J., Paterson, S., 2015. The *Fasciola hepatica* genome: gene duplication and polymorphism reveals adaptation to the host environment and the capacity for rapid evolution. *Genome Biol.* 16, 71.
- Czapski, Z., 1962. The snail *Galba occulta* Jackiewicz, 1959--another intermediate host of *Fasciola hepatica* L. *Z. Tropenmed. Parasitol.* 13, 332-337.
- Czapski, Z., 1965. Studies on the biology of *Gaba occulta* Jack. 1959 -- A new intermediate host of *Fasciola hepatica* L. *Wiad. Parazytol.* 11, Suppl:273-277.
- Czapski, Z., 1968a. Invasive potential of *Galba trunculata* Mull. and *Galba occulta* Jack. Against larvae of *Fasciola hepatica* L. *Wiad. Parazytol.* 14, 521-522.
- Czapski, Z., 1968b. Mortality of snails *Galba occulta* Jack. infected with *Fasciola hepatica* L. larvae. *Wiad. Parazytol.* 14, 523-524.
- Dalton, J.P., McGonigle, S., Rolph, T.P., Andrews, S.J., 1996. Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin. *Infect. Immun.* 64, 5066-5074.
- Dauchy, F.A., Vincendeau, P., Lifermann, F., 2006. Eight cases of fascioliasis: clinical and microbiological features. *Med. Mal. Infect.* 36, 42-46.
- de Jong-Brink, M., 1990. How trematode parasites interfere with reproduction of their intermediate hosts, freshwater snails. *J. Med. App. Malacol.* 2, 101-133.
- Degueurce, F., Abrous, M., Dreyfuss, G., Rondelaud, D., Gevrey, J., 1999. *Paramphistomum daubneyi* and *Fasciola hepatica*: the prevalence of natural or experimental infections in four species of freshwater snails in eastern France. *J. Helminthol.* 73, 197-202.
- Diawara, M., Ayadi, A., Rondelaud, D., 2003. *Fasciola hepatica*: the development of tissue lesions and their frequencies in naturally-infected *Galba truncatula*. *Parasitol. Res.* 90, 257-260.
- Doy, T.G., Hughes, D.L., 1984. Early migration of immature *Fasciola hepatica* and associated liver pathology in cattle. *Res. Vet. Sci.* 37, 219-222.
- Dreyfuss, G., Abrous, M., Rondelaud, D., 1997. *Fasciola hepatica* Linné : la charge rédienne et les émissions cercariennes chez les juvéniles de *Lymnaea peregra peregra* Müller. *Rev. Med. Vet. (Toulouse)* 148, 609-612.
- Dreyfuss, G., Abrous, M., Rondelaud, D., 2000a. The susceptibility of *Lymnaea fuscus* to experimental infection with *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* 86, 158-160.

- Dreyfuss, G., Vignoles, P., Rondelaud, D., 2000b. Variability of *Fasciola hepatica* infection in *Lymnaea ovata* in relation to snail population and snail age. *Parasitol. Res.* 86, 69-73.
- Dreyfuss, G., Vignoles, P., Abrous, M., Rondelaud, D., 2002. Unusual snail species involved in the transmission of *Fasciola hepatica* in watercress beds in central France. *Parasite* 9, 113-120.
- Dreyfuss, G., Vignoles, P., Rondelaud, D., 2003. Natural infections of *Omphiscola glabra* (*Lymnaeidae*) with *Fasciola hepatica* in central France. *Parasitol. Res.* 91, 458-461.
- Dreyfuss, G., Vignoles, P., Rondelaud, D., 2005. *Fasciola hepatica*: epidemiological surveillance of natural watercress beds in central France. *Parasitol. Res.* 95, 278-282.
- Dreyfuss, G., Novobilsky, A., Vignoles, P., Bellet, V., Koudela, B., Rondelaud, D., 2007. Prevalence and intensity of infections in the lymnaeid snail *Omphiscola glabra* experimentally infected with *Fasciola hepatica*, *Fascioloides magna* and *Paramphistomum daubneyi*. *J. Helminthol.* 81, 7-12.
- Dreyfuss, G., Correa, A.C., Djuikwo-Teukeng, F.F., Novobilsky, A., Höglund, J., Pankrác, J., Kasny, M., Vignoles, P., Hurtrez-Bousses, S., Pointier, J.P., Rondelaud, D., 2014. Differences of compatibility for a Colombian population of *Galba* sp. between *Fascioloides magna* and *Fasciola hepatica*. *J. Helminthol.* 7, 1-7.
- Duffy, T., Kleiman, F., Pietrokovsky, S., Issia, L., Schijman, A.G., Wisnivesky-Colli, C., 2009. Real-time PCR strategy for rapid discrimination among main lymnaeid species from Argentina. *Acta Trop.* 109, 1-4.
- Egas-Dávila, R., Villota-Burbano, M., Celi-Erazo, M., Ron-Román, J., Proaño-Perez, F., Rodríguez-Hidalgo, R., Benítez-Ortiz, W., 2006. Determinación de la prevalencia de *Fasciola hepatica* en bovinos sacrificados en el camal municipal de Machachi: Trazabilidad de los animales positivos. Thesis de doctorat, Universidad Central del Ecuador, Quito.
- Espinoza, J.R., Terashima, A., Herrera-Velít, P., Marcos, L.A., 2010. Human and animal fascioliasis in Peru: impact in the economy of endemic zones. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica* 27, 604-612.
- Esteban, J.G., Flores, A., Angles, R., Mas-Coma, S., 1999. High endemicity of human fascioliasis between Lake Titicaca and La Paz valley, Bolivia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93, 151-156.
- Faltynkova, A., Horackova, E., Hirtova, L., Novobilsky, A., Modry, D., Scholz, T., 2006. Is *Radix peregra* a new intermediate host of *Fascioloides magna* (Trematoda) in Europe? Field and experimental evidence. *Acta Parasitol.* 51, 87-90.
- Faria, R.N., Cury, M.C., Lima, W.S., 2005. Prevalence and dynamics of natural infection with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) in brazilian cattles. *Rev. Med. Vet.* 156, 85-86.

- Fuentes, M.V., Malone, J.B., 1999. Development of a forecast system for fasciolosis in central Chile using remote sensing and climatic data in a Geographic Information System. *Res. Rev. Parasitol.* 59, 129-134.
- Fuentes, M.V., Sainz-Elipe, S., Nieto, P., Malone, J.B., Mas-Coma, S., 2005. Geographical information systems risk assessment models for zoonotic fascioliasis in the South American Andes region. *Parassitologia* 47, 151-156.
- Furmaga, S., Gundlach, J.L., 1967a. *Lymnaea stagnalis* as a source of infection with *Fasciola hepatica*. *Acta Parasitol.* 15, 237-241.
- Furmaga, S., Gundlach, J.L., 1967b. *Lymnaea stagnalis* L. as one more intermediate host of *Fasciola hepatica*. *Acta Parasitol.* 15, 231-235.
- Furmaga, S., Gundlach, J.L., 1969. Studies on the participation of some snail species of the family *Lymnaeidae* in the life cycle of *Fasciola hepatica*. *Acta Parasitol.* 17, 115-118.
- Fürst, T., Duthaler, U., Sripa, B., Utzinger, J., Keiser, J., 2012. Trematode infections: liver and lung flukes. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 26, 399-419.
- Gaillet, P., 1983. Contribution à l'étude épidémiologique de la distomatose humaine à *Fasciola hepatica* en France métropolitaine depuis 1956. A propos de quelques 10000 cas. Thèse de doctorat, Université Paris - Val de Marne,
- Gasnier, N., Rondelaud, D., Abrous, M., Carreras, F., Boulard, C., Diez-Banos, P., Cabaret, J., 2000. Allopatric combination of *Fasciola hepatica* and *Lymnaea truncatula* is more efficient than sympatric ones. *Int. J. Parasitol.* 30, 573-578.
- Gasser, R.B., 1999. PCR-based technology in veterinary parasitology. *Vet. Parasitol.* 84, 229-258.
- Genicot, B., Mouligneau, F., Lekeux, P., 1991. Economic and production consequences of liver fluke disease in double-muscled fattening cattle. *Zentralblatt für Veterinärmedizin (Reihe B)* 38, 203-208.
- Gonzalez, L.C., Esteban, J.G., Bargues, M.D., Valero, M.A., Ortiz, P., Naquira, C., Mas-Coma, S., 2011. Hyperendemic human fascioliasis in Andean valleys: an altitudinal transect analysis in children of Cajamarca province, Peru. *Acta Trop.* 120, 119-129.
- Gozalbo, M., Trueba, G., Fornasini, M., Fuentes, M.V., Bargues, M.D., Esteban, J.G., Mas-Coma, M.S., 2004. Coproparasitological survey in schoolchildren from the community of Planchaloma (Province de Cotopaxi, Ecuador). In: IX European Multicolloquium of Parasitology (EMOP 9), Valencia, Spain, Abstract No. 874, pp. 447.
- Graber, M., Delavenay, R.P., Tesfamariam, G., 1978. Inventaire parasitologique de l'Ethiopie : helminthes des zébus adultes de la région de Kofele (Arussi) 30, 341-352.

- Grabner, D.S., Mohamed, F.A., Nachev, M., Meabed, E.M., Sabry, A.H., Sures, B., 2014. Invasion biology meets parasitology: a case study of parasite spill-back with egyptian *Fasciola gigantica* in the invasive snail *Pseudosuccinea columella*. PLoS One 9, e88537.
- Graczyk, T.K., Fried, B., 1999. Development of *Fasciola hepatica* in the intermediate host, In: Dalton, J.P. (Ed.) Fasciolosis. CABI publishing, Wallingford, Oxon, U.K., pp. 31-46.
- Greischar, M.A., Koskella, B., 2007. A synthesis of experimental work on parasite local adaptation. Ecol. Lett. 10, 418-434.
- Gutierrez, A., Perera, G., Yong, M., Sanchez, J., Lin, W., 2000. Life-history traits of *Fossaria cubensis* (Gastropoda: Lymnaeidae) under experimental exposure to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 95, 747-752.
- Gutierrez, A., Yong, M., Perera, G., Sanchez, J., Theron, A., 2002. *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea): its effect on the life history traits of *Pseudosuccinea columella* (Gasteropoda: Lymnaeidae), an uncommon interaction. Parasitol. Res. 88, 535-539.
- Gutierrez, A., Pointier, J.P., Fraga, J., Jobet, E., Modat, S., Perez, R.T., Yong, M., Sanchez, J., Loker, E.S., Theron, A., 2003. *Fasciola hepatica*: identification of molecular markers for resistant and susceptible *Pseudosuccinea columella* snail hosts. Exp. Parasitol. 105, 211-218.
- Hammami, H., Mezghani-Jarraya, R., Damak, M., Ayadi, A., 2011. Molluscicidal activity of various solvent extracts from *Solanum nigrum* var. *villosum* L. aerial parts against *Galba truncatula*. Parasite 18, 63-70.
- Heussler, V., Kaufmann, H., Strahm, D., Liz, J., Dobbelaere, D., 1993. DNA probes for the detection of *Fasciola hepatica* in snails. Mol. Cell. Probes 7, 261-267.
- Hillyer, G.V., Haroun, E.T., Hernandez, A., de Galanes, M.S., 1987. Acquired resistance to *Fasciola hepatica* in cattle using a purified adult worm antigen. Am. J. Trop. Med. Hyg. 37, 363-369.
- Hillyer, G.V., Soler de Galanes, M., Rodriguez-Perez, J., Bjorland, J., Silva de Lagrava, M., Ramirez Guzman, S., Bryan, R.T., 1992. Use of the Falcon assay screening test--enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) and the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) to determine the prevalence of human fascioliasis in the Bolivian Altiplano. Am. J. Trop. Med. Hyg. 46, 603-609.
- Hodasi, J.K., 1972. The output of cercariae of *Fasciola hepatica* by *Lymnaea truncatula* and the distribution of metacercariae on grass. Parasitol. 64, 53-60.
- Houin, G., 2009. Fasciolosis, a re-emerging zoonosis? Bull. Acad. Vet. France 162, 161-164.
- Hubendick, B., 1951. Recent *Lymnaeidae*. Fjärde Serien, 223 p.

- Hubscher, U., 1991. DNA diagnosis in veterinary medicine: II. Polymerase chain reaction (PCR). *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 133, 27-31.
- Hunova, K., Kasny, M., Hampl, V., Leontovyc, R., Kubena, A., Mikes, L., Horak, P., 2012. *Radix* spp.: Identification of trematode intermediate hosts in the Czech Republic. *Acta Parasitol.* 57, 273-284.
- Imani-Baran, A., Yakhchali, M., Malekzadeh Viayeh, R., Paktarmani, R., 2012. Molecular study for detecting the prevalence of *Fasciola gigantica* in field-collected snails of *Radix gedrosiana* (*Pulmonata: Lymnaeidae*) in northwestern Iran. *Vet. Parasitol.* 189, 374-377.
- Jackiewicz, M., 1998. European species of the family *Lymnaeidae* (*Gastropoda: Pulmonata: Basommatophora*). Genus 9, 1-93.
- Johnson, P.T., Lund, P.J., Hartson, R.B., Yoshino, T.P., 2009. Community diversity reduces *Schistosoma mansoni* transmission, host pathology and human infection risk. *Proc. Biol. Sci.* 276, 1657-1663.
- Jouet, D., Skirnisson, K., Kolarova, L., Ferte, H., 2010. Molecular diversity of *Trichobilharzia franki* in two intermediate hosts (*Radix auricularia* and *Radix peregra*): a complex of species. *Infect. Genet. Evol.* 10, 1218-1227.
- Kaplan, R.M., Dame, J.B., Reddy, G.R., Courtney, C.H., 1995. A repetitive DNA probe for the sensitive detection of *Fasciola hepatica* infected snails. *Int. J. Parasitol.* 25, 601-610.
- Kaplan, R.M., Dame, J.B., Reddy, G.R., Courtney, C.H., 1997. The prevalence of *Fasciola hepatica* in its snail intermediate host determined by DNA probe assay. *Int. J. Parasitol.* 27, 1585-1593.
- Kaset, C., Eursitthichai, V., Vichasri-Grams, S., Viyanant, V., Grams, R., 2010. Rapid identification of lymnaeid snails and their infection with *Fasciola gigantica* in Thailand. *Exp. Parasitol.* 126, 482-488.
- Kawasaki, M., Delamare-Deboutteville, J., Dang, C., Barnes, A.C., 2013. Hemiuroid trematode sporocysts are undetected by hemocytes of their intermediate host, the ark cockle *Anadara trapezia*: potential role of surface carbohydrates in successful parasitism. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 1937-1947.
- Keiser, J., Utzinger, J., 2005. Emerging foodborne trematodiasis. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1507-1514.
- Kendall, S.B., 1950. Snail hosts of *Fasciola hepatica* in Britain. *J. Helminthol.* 26, 63-74.
- Kendall, S.B., McCullough, F.S., 1951. The emergence of cercariae of *Fasciola hepatica* from the snail *Limnaea truncatula*. *J. Helminthol.* 25, 77-92.
- Kendall, S.B., 1953. The life-history of *Limnaea truncatula* under laboratory conditions. *J. Helminthol.* 27, 17-28.

- Kendall, S.B., Ollerenshaw, C.B., 1963. The effect of nutrition on the growth of *Fasciola hepatica* in its snail host. Proc. Nutr. Soc. 22, 41-46.
- Kenyon, F., Sargison, N.D., Skuce, P.J., Jackson, F., 2009. Sheep helminth parasitic disease in south eastern Scotland arising as a possible consequence of climate change. Vet. Parasitol. 163, 293-297.
- Khan, M.K., Sajid, M.S., Riaz, H., Ahmad, N.E., He, L., Shahzad, M., Hussain, A., Khan, M.N., Iqbal, Z., Zhao, J., 2013. The global burden of fasciolosis in domestic animals with an outlook on the contribution of new approaches for diagnosis and control. Parasitol. Res. 112, 2421-2430.
- Kim, H.Y., Choi, I.W., Kim, Y.R., Quan, J.H., Ismail, H.A., Cha, G.H., Hong, S.J., Lee, Y.H., 2014. *Fasciola hepatica* in snails collected from water-dropwort fields using PCR. Korean J. Parasitol. 52, 645-652.
- King, K.C., Jokela, J., Lively, C.M., 2011. Trematode parasites infect or die in snail hosts. Biol Lett 7, 265-268.
- Kleiman, F., Pietrokovsky, S., Paraense, W.L., Wisnivesky-Colli, C., 2004. Southernmost finding of *Lymnaea viatrix* orbigny, 1835 (*Pulmonata: Lymnaeidae*), intermediate host of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (*Trematoda: Digenea*), in urban and rural areas of Patagonia, Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 99, 23-24.
- Kleiman, F., Pietrokovsky, S., Prepelitchi, L., Carbajo, A.E., Wisnivesky-Colli, C., 2007. Dynamics of *Fasciola hepatica* transmission in the Andean Patagonian valleys, Argentina. Vet. Parasitol. 145, 274-286.
- Knubben-Schweizer, G., Ruegg, S., Torgerson, P.R., Rapsch, C., Grimm, F., Hassig, M., Deplazes, P., Braun, U., 2010. Control of bovine fasciolosis in dairy cattle in Switzerland with emphasis on pasture management. Vet. J. 186, 188-191.
- Knubben-Schweizer, G., Torgerson, P.R., 2015. Bovine fasciolosis: control strategies based on the location of *Galba truncatula* habitats on farms. Vet. Parasitol. 208, 77-83.
- Ko, Y.T., Chan, M.M.Y., Ford, S.E., Fong, D., 1999. A PCR-ELISA method for direct detection of the oyster pathogen *Haplosporidium nelsoni*. Mar. Biotech. 1, 147-154.
- Kozak, M., Wedrychowicz, H., 2010. The performance of a PCR assay for field studies on the prevalence of *Fasciola hepatica* infection in *Galba truncatula* intermediate host snails. Vet. Parasitol. 168, 25-30.
- Krämer, F., 1999. Eignung einer Gensonde zum nachweis Derentwicklungsstadien von *Fasciola hepatica* Linne 1758 im Zwischenwirt. Tierärztliche Hochschule, Hannover.
- Krämer, F., Schnieder, T., 1998. Sequence heterogeneity in a repetitive DNA element of *Fasciola*. Int. J. Parasitol. 28, 1923-1929.

- Krämer, F., Schnieder, T., 1999. Untersuchungen über den Zwischenwirt von *Fasciola hepatica* mittels einer DNA-Sonde zur Etablierung eines epidemiologischen Diagnostikverfahrens. *Praktische Tierarzt* 80, 520-529.
- Kuerpick, B., Fiedor, C., von Samson-Himmelstjerna, G., Schnieder, T., Strube, C., 2012. Bulk milk-estimated seroprevalence of *Fasciola hepatica* in dairy herds and collecting of risk factor data in East Frisia, northern Germany. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 125, 345-350.
- Kuerpick, B., Conraths, F.J., Staubach, C., Frohlich, A., Schnieder, T., Strube, C., 2013a. Seroprevalence and GIS-supported risk factor analysis of *Fasciola hepatica* infections in dairy herds in Germany. *Parasitol.* 140, 1051-1060.
- Kuerpick, B., Schnieder, T., Strube, C., 2013b. Evaluation of a recombinant cathepsin L1 ELISA and comparison with the Pourquier and ES ELISA for the detection of antibodies against *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 193, 206-213.
- Lawton, S.P., Lim, R.M., Dukes, J.P., Kett, S.M., Cook, R.T., Walker, A.J., Kirk, R.S., 2015. Unravelling the riddle of *Radix*: DNA barcoding for species identification of freshwater snail intermediate hosts of zoonotic digeneans and estimating their inter-population evolutionary relationships. *Inf. Genet. Evol.* 35, 63-74.
- Leimbacher, F., 1978. Experience with the «Mt» system of forecasting fascioliasis in France., In: Gibson, T.E. (Ed.) *Weather and parasitic animal disease*. World Meteorological Organization, Geneva, pp. 6-13.
- Levine, N.D., 1970. Integrated control of snails. *Am. Zoologist* 10, 579-582.
- Lie, K.J., Heyneman, D., Lim, H.K., 1975. Studies on resistance in snails: specific resistance induced by irradiated miracidia of *Echinostoma lindoense* in *Biomphalaria glabrata* snails. *Int. J. Parasitol.* 5, 627-631.
- Lonneux, J.F., Boelaert, F., Vandergheynst, D., Biront, P., Meulemans, G. 2000. *Fasciola hepatica* in Belgium: survey of the disease's prevalence and comparison with previous simulations. *Veterinary and Agrochemical Research Center*, pp. 56-57.
- Luzon-Pena, M., Rojo-Vazquez, F.A., Gomez-Bautista, M., 1994. The overwintering of eggs, intramolluscal stages and metacercariae of *Fasciola hepatica* under the temperatures of a Mediterranean area (Madrid, Spain). *Vet. Parasitol.* 55, 143-148.
- Magalhaes, K.G., Passos, L.K., Carvalho Odos, S., 2004. Detection of *Lymnaea columella* infection by *Fasciola hepatica* through Multiplex-PCR. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99, 421-424.
- Magalhaes, K.G., Jannotti-Passos, L.K., Caldeira, R.L., Berne, M.E., Muller, G., Carvalho, O.S., Lenzi, H.L., 2008. Isolation and detection of *Fasciola hepatica* DNA in *Lymnaea viatrix*

- from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues through multiplex-PCR. *Vet. Parasitol.* 152, 333-338.
- Mage, C., 1989. Epidémiologie de l'infestation par *Fasciola hepatica* chez les bovins en Limousin. *Rev. Med Vet.* 140, 407-411.
- Mage, C., Bourgne, H., Toullieu, J.M., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., 2002. *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: changes in prevalences of natural infections in cattle and in *Lymnaea truncatula* from central France over the past 12 years. *Vet. Res.* 33, 439-447.
- Malone, J.B., Jr., 1986. Fascioliasis and cestodiasis in cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2, 261-275.
- Manga-Gonzalez, Y., Gonzalez-Lanza, C., Otero-Merino, C.B., 1991. Natural infection of *Lymnaea truncatula* by the liver fluke *Fasciola hepatica* in the Porma Basin, Leon, NW Spain. *J. Helminthol.* 65, 15-27.
- Marcos, L., Maco, V., Samalvides, F., Terashima, A., Espinoza, J.R., Gotuzzo, E., 2006. Risk factors for *Fasciola hepatica* infection in children: a case-control study. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 100, 158-166.
- Martinez-Ibeas, A.M., Gonzalez-Warleta, M., Martinez-Valladares, M., Castro-Hermida, J.A., Gonzalez-Lanza, C., Minambres, B., Ferreras, C., Mezo, M., Manga-Gonzalez, M.Y., 2013. Development and validation of a mtDNA multiplex PCR for identification and discrimination of *Calicophoron daubneyi* and *Fasciola hepatica* in the *Galba truncatula* snail. *Vet. Parasitol.* 195, 57-64.
- Mas-Coma, S., 2005. Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *J. Helminthol.* 79, 207-216.
- Mas-Coma, S., 2007. *Lymnaea cousini* (Gastropoda: Lymnaeidae) as transmitter of fascioliasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 241-243.
- Mas-Coma, S., Esteban, J.G., Bargues, M.D., 1999. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bull. World Health Organ.* 77, 340-346.
- Mas-Coma, S., Funatsu, I.R., Bargues, M.D., 2001. *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. *Parasitology* 123 Suppl, S115-127.
- Mas-Coma, S., Bargues, M.D., Valero, M.A., 2005. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int. J. Parasit.* 35, 1255-1278.
- Mas-Coma, S., Valero, M.A., Bargues, M.D., 2009. Chapter 2. Fasciola, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv. Parasitol.* 69, 41-146.

- McCann, C.M., Baylis, M., Williams, D.J., 2010a. The development of linear regression models using environmental variables to explain the spatial distribution of *Fasciola hepatica* infection in dairy herds in England and Wales. *Int. J. Parasitol.* 40, 1021-1028.
- McCann, C.M., Baylis, M., Williams, D.J., 2010b. Seroprevalence and spatial distribution of *Fasciola hepatica*-infected dairy herds in England and Wales. *Vet. Rec.* 166, 612-617.
- McLaughlin, G.L., Collins, W.E., Campbell, G.H., 1987. Comparison of genomic, plasmid, synthetic, and combined DNA probes for detecting *Plasmodium falciparum* DNA. *J. Clin. Microbiol.* 25, 791-795.
- McNeilly, T.N., Nisbet, A.J., 2014. Immune modulation by helminth parasites of ruminants: implications for vaccine development and host immune competence. *Parasite* 21, 51.
- McReath, A.M., Reader, T.A., Southgate, V.R., 1982. The development of the host-response in juvenile *Lymnaea palustris* to invasion by *Fasciola hepatica*. *Z. Parasitenkd.* 67, 175-184.
- Medeiros, C., Scholte, R.G., D'Avila, S., Caldeira, R.L., Carvalho Odos, S., 2014. Spatial distribution of *Lymnaeidae* (*Mollusca*, *Basommatophora*), intermediate host of *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (*Trematoda*, *Digenea*) in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 56, 235-252.
- Menard, A., L'Hostis, M., Leray, G., Marchandeau, S., Pascal, M., Roudot, N., Michel, V., Chauvin, A., 2000. Inventory of wild rodents and lagomorphs as natural hosts of *Fasciola hepatica* on a farm located in a humid area in Loire Atlantique (France). *Parasite* 7, 77-82.
- Menard, A., Agoulon, A., L'Hostis, M.L., Rondelaud, D., Collard, S., Chauvin, A., 2001. *Myocastor coypus* as a reservoir host of *Fasciola hepatica* in France. *Vet. Res.* 32, 499-508.
- Mera y Sierra, R., Artigas, P., Cuervo, P., Deis, E., Sidoti, L., Mas-Coma, S., Bargues, M.D., 2009. Fascioliasis transmission by *Lymnaea neotropica* confirmed by nuclear rDNA and mtDNA sequencing in Argentina. *Vet. Parasitol.* 166, 73-79.
- Mezo, M., Gonzalez-Warleta, M., Castro-Hermida, J.A., Muino, L., Ubeira, F.M., 2011. Association between anti-*F. hepatica* antibody levels in milk and production losses in dairy cows. *Vet. Parasitol.* 180, 237-242.
- Mezo, M., Gonzalez-Warleta, M., Castro-Hermida, J.A., Manga-Gonzalez, M.Y., Peixoto, R., Mas-Coma, S., Valero, M.A., 2013. The wild boar (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758) as secondary reservoir of *Fasciola hepatica* in Galicia (NW Spain). *Vet. Parasitol.* 198, 274-283.
- Mitchell, G.B., Maris, L., Bonniwell, M.A., 1998. Triclabendazole-resistant liver fluke in Scottish sheep. *Vet. Rec.* 143, 399.

- Molina-Hernandez, V., Mulcahy, G., Perez, J., Martinez-Moreno, A., Donnelly, S., O'Neill, S.M., Dalton, J.P., Cwiklinski, K., 2015. *Fasciola hepatica* vaccine: we may not be there yet but we're on the right road. *Vet. Parasitol.* 208, 101-111.
- Moll, L., Gaasenbeek, C.P., Vellema, P., Borgsteede, F.H., 2000. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. *Vet. Parasitol.* 91, 153-158.
- Mostafa, O.M., Taha, H.A., Ramadan, G., 2003. Diagnosis of *Fasciola gigantica* in snail using the polymerase chain reaction (PCR) assay. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 33, 733-742.
- Mulcahy, G., O'Connor, F., McGonigle, S., Dowd, A., Clery, D.G., Andrews, S.J., Dalton, J.P., 1998. Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine* 16, 932-939.
- Mulcahy, G., O'Connor, F., Clery, D., Hogan, S.F., Dowd, A.J., Andrews, S.J., Dalton, J.P., 1999. Immune responses of cattle to experimental anti-*Fasciola hepatica* vaccines. *Res. Vet. Sci.* 67, 27-33.
- Ndao, M., 2009. Diagnosis of parasitic diseases: old and new approaches. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2009, 278246.
- Novobilsky, A., Kasny, M., Beran, L., Rondelaud, D., Hoglund, J., 2013. *Lymnaea palustris* and *Lymnaea fuscus* are potential but uncommon intermediate hosts of *Fasciola hepatica* in Sweden. *Parasit. Vectors* 6, 251.
- Novobilsky, A., Engstrom, A., Sollenberg, S., Gustafsson, K., Morrison, D.A., Hoglund, J., 2014. Transmission patterns of *Fasciola hepatica* to ruminants in Sweden. *Vet. Parasitol.* 203, 276-286.
- Oliveira, S.M., Fujii, T.U., Sposito Filha, E., Martins, A., 2002. Ocorrência de *Lymnaea columella* Say, 1817 infectada naturalmente por *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758), no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. *Arq. Inst. Biológico* 69.
- Ollerenshaw, C.B., 1959. The ecology of liver fluke (*Fasciola hepatica*). 71, 957-963.
- Ollerenshaw, C.B., Rowlands, L.P., 1959. A method for forecasting the incidence of fascioliasis in Anglesey. *Vet. Rec.* 71, 591-598.
- Ollerenshaw, C.B., 1971. Some observations on the epidemiology of fascioliasis in relation to the timing of molluscicide applications in the control of the disease. *Vet. Rec.* 88, 152-164.
- Orlent, H., Selleslag, D., Vandecasteele, S., Jalal, P.K., Bank, S., Hines, J., 2007. Clinical challenges and images in GI. *Fasciola hepatica* infection and Von Hippel-Lindau disease type 1 with pancreatic and renal involvement. *Gastroenterology* 132, 15-16, 467-468.
- Ortiz, P., Scarcella, S., Cerna, C., Rosales, C., Cabrera, M., Guzman, M., Lamenza, P., Solana, H., 2013. Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): a clinical trial and an in vivo efficacy test in sheep. *Vet. Parasitol.* 195, 118-121.

- Over, H.J., 1982. Ecological basis of parasite control: trematodes with special reference to fascioliasis. *Vet. Parasitol.* 11, 85-97.
- Pantelouris, E.M., 1965. The common liver fluke *Fasciola hepatica*, Pergamon Press Edition Oxford, 259 p.
- Paraense, W.L., 1982. *Lymnaea viatrix* and *Lymnaea columella* in the neotropical region: a distribution outline. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 77, 181-188.
- Paraense, W.L., 1995. *Lymnaea cousini* Jousseume, 1887, from Ecuador (*Gastropoda, Lymnaeidae*). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 90, 605-609.
- Paraense, W.L., 2004. *Planorbidae, Lymnaeidae* and *Physidae* of Ecuador (*Mollusca: Basommatophora*). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99, 357-362.
- Parkinson, M., O'Neill, S.M., Dalton, J.P., 2007. Endemic human fasciolosis in the Bolivian Altiplano. *Epidemiol. Infect.* 135, 669-674.
- Paterson, S., Vogwill, T., Buckling, A., Benmayor, R., Spiers, A.J., Thomson, N.R., Quail, M., Smith, F., Walker, D., Libberton, B., Fenton, A., Hall, N., Brockhurst, M.A., 2010. Antagonistic coevolution accelerates molecular evolution. *Nature* 464, 275-278.
- Pêcheur, M., 1966. Distomatose et prophylaxie. Thèse de doctorat, Université Catholique de Louvain, Louvain.
- Pfenninger, M., Cordellier, M., Streit, B., 2006. Comparing the efficacy of morphologic and DNA-based taxonomy in the freshwater gastropod genus *Radix* (*Basommatophora, Pulmonata*). *BMC Evol Biol* 23, 100.
- Pfenninger, M., Salinger, M., Haun, T., Feldmeyer, B., 2011. Factors and processes shaping the population structure and distribution of genetic variation across the species range of the freshwater snail *Radix balthica* (*Pulmonata, Basommatophora*). *BMC Evol. Biol.* 11, 135.
- Piacenza, L., Acosta, D., Basmadjian, I., Dalton, J.P., Carmona, C., 1999. Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infect. Immun.* 67, 1954-1961.
- Pilet, B., Deckers, F., Pouillon, M., Parizel, P., 2010. *Fasciola hepatica* infection in a 65-year-old woman. *J. Radiol. Case Rep.* 4, 13-19.
- Pointier, J.P., Cazzaniga, N.J., Gonzalez-Salas, C., Gutierrez, A., Arenas, J.A., Bargues, M.D., Mas-Coma, S., 2006. Anatomical studies of sibling species within Neotropical lymnaeids, snail intermediate hosts of fascioliasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101, 431-435.
- Pointier, J.P., Coustau, C., Rondelaud, D., Theron, A., 2007. *Pseudosuccinea columella* (Say 1817) (*Gastropoda, Lymnaeidae*), snail host of *Fasciola hepatica*: first record for France in the wild. *Parasitol. Res.* 101, 1389-1392.

- Pointier, J.P., Noya, O., Alarcon de Noya, B., Theron, A., 2009. Distribution of *Lymnaeidae* (*Mollusca: Pulmonata*), intermediate snail hosts of *Fasciola hepatica* in Venezuela. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104, 790-796.
- Pointier, J.P., Gonzalez, C., Noya, O., Alarion, N., 2015. Family *Lymnaeidae*, In: Pointier, J.P. (Ed.) Freshwater molluscs of Venezuela and their medical and veterinary importance. ConchBooks, Perpignan, p. 228.
- Prepelitchi, L., Kleiman, F., Pietrokovsky, S.M., Moriena, R.A., Racioppi, O., Alvarez, J., Wisnivesky-Colli, C., 2003. First report of *Lymnaea columella* Say, 1817 (*Pulmonata: Lymnaeidae*) naturally infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (*Trematoda: Digenea*) in Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98, 889-891.
- Prichard, R., 1997. Application of molecular biology in veterinary parasitology. Vet. Parasitol. 71, 155-175.
- Pritchard, G.C., Forbes, A.B., Williams, D.J., Salimi-Bejestani, M.R., Daniel, R.G., 2005. Emergence of fasciolosis in cattle in East Anglia. Vet. Rec. 157, 578-582.
- Rangel-Ruiz, L.J., Marquez-Izquierdo, R., Bravo-Nogueira, G., 1999. Bovine fasciolosis in Tabasco, Mexico. Vet. Parasitol. 81, 119-127.
- Rapsch, C., Schweizer, G., Grimm, F., Kohler, L., Bauer, C., Deplazes, P., Braun, U., Torgerson, P.R., 2006. Estimating the true prevalence of *Fasciola hepatica* in cattle slaughtered in Switzerland in the absence of an absolute diagnostic test. Int. J. Parasitol. 36, 1153-1158.
- Rehbein, S., Visser, M., 2007. The endoparasites of Sika deer (*Cervus nippon*) in Austria. Wien. Klin. Wochenschr. 119, 96-101.
- Relf, V., Good, B., McCarthy, E., de Waal, T., 2009. Evidence of *Fasciola hepatica* infection in *Radix peregra* and a mollusc of the family *Succineidae* in Ireland. Vet. Parasitol. 163, 152-155.
- Rezende, H.E.B., Araujo, J.L., Gomes, P.A.C., Nurenberg, S., Neto, M.P., Oliviera, G.P., Mello, R.P., 1973. Notas sobre duas especies de *Lymnaea* Lamarck, 1799, hospedeiros intermediarios de *Fasciola hepatica* L. no estado do Rio de Janeiro (*Mollusca, Gastropoda, Basommatophora, Lymnaeidae*). Arq. Univ. Fed. Rural 3, 21-23.
- Rognlie, M.C., Dimke, K.L., Knapp, S.E., 1994. Detection of *Fasciola hepatica* in infected intermediate hosts using RT-PCR. J. Parasitol. 80, 748-755.
- Rognlie, M.C., Dimke, K.L., Potts, R.S., Knapp, S.E., 1996. Seasonal transmission of *Fasciola hepatica* in Montana, USA, with detection of infected intermediate hosts using a DNA-based assay. Vet. Parasitol. 65, 297-305.
- Rondelaud, D., 1975. the predation of *Lymnaea (Galba) truncatula* Müller by *Zonitoides nitidus* Müller, a means of biological control. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 50, 55-61.

- Rondelaud, D., 1993. Variabilité interpopulationnelle de l'infestation fasciolienne chez le mollusque *Lymnaea truncatula* Müller. Influence du contact préalable de la population avec le parasite. Bull. Soc. Zool. France 118, 185-193.
- Rondelaud, D., 1994. *Fasciola hepatica*: the infection rate and the development of redial generations in *Lymnaea truncatula* exposed to miracidia after experimental desiccation and activation in water. J. Helminthol. 68, 63-66.
- Rondelaud, D., 1998. Etat provisoire des connaissances sur les mollusques *Lymnaeidae* et leur détermination. Document dactylographié, Faculté de Médecine, Université de Limoges, 10 pp.
- Rondelaud, D., Morel-Vareille, C., 1975. Distribution estivale et survie des Limnées tronquées *Lymnaea (Galba) truncatula* Muller saines ou infestées par *Fasciola hepatica* L. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 50, 603-616.
- Rondelaud, D., Barthe, D., 1978. Histological study of the development of *Fasciola hepatica* in *Lymnaea truncatula*, *L. glabra* and *L. palustris* infested at hatching. C R Seances Soc. Biol. Fil. 172, 1194-1200.
- Rondelaud, D., Barthe, D., 1980. Données histopathologiques sur l'épithélium génital de *Lymnaea truncatula* Müller infestée par *Fasciola hepatica* L. Bull. Soc. Zool. Fr. 105, 481-490.
- Rondelaud, D., Barthe, D., 1982. Les générations rédiennes de *Fasciola hepatica* L. chez *Lymnaea truncatula* Müller. A Propos des effets de plusieurs facteurs. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 57, 245-261.
- Rondelaud, D., Barthe, D., 1983. Les modifications structurales du rein chez *Lymnaea truncatula* Müller infestée par *Fasciola hepatica* L. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 58, 109-116.
- Rondelaud, D., Barthe, D., 1987. *Fasciola hepatica* L.: the productivity of a sporocyst as a function of the size of *Lymnaea truncatula* Muller. Parasitol. Res. 74, 155-160.
- Rondelaud, D., Dreyfuss, G., 1997. Variability of *Fasciola* infections in *Lymnaea truncatula* as a function of snail generation and snail activity. J. Helminthol. 71, 161-166.
- Rondelaud, D., Dreyfuss, G., 1998. L'infestation naturelle de *Lymnaea glabra* par *Fasciola hepatica* dans deux cressonnières naturelles de Haute-Vienne. Bull. Soc. Fr. Parasitol. 16.
- Rondelaud, D., Vignoles, P., Abrous, M., Dreyfuss, G., 2001a. The definitive and intermediate hosts of *Fasciola hepatica* in the natural watercress beds in central France. Parasitol. Res. 87, 475-478.
- Rondelaud, D., Vignoles, P., Abrous, M., Dreyfuss, G., 2001b. Recherche sur les hôtes intermédiaires de *Fasciola hepatica* dans des cressonnières sauvage lorsque *Lymnaea truncatula* est absente. Bull. Soc. Fr. Parasitol. 19, 1.

- Rondelaud, D., Abrous, M., Dreyfuss, G., 2002. The influence of different food sources on cercarial production in *Lymnaea truncatula* experimentally infected with *Digenea*. Vet. Res. 33, 95-99.
- Rondelaud, D., Dreyfuss, G., Cabaret, J., 2003. Les mollusques d'intérêt vétérinaire, In: Provost, A., Uilenberg, G., Blancou, J., Lefèvre, P.C. (Eds.) Maladies infectieuses et parasitaires du bétail des régions chaudes. TEC et DOC, Lavoisier, pp. 177-193.
- Rondelaud, D., Denève, C., Belfaiza, M., Mekroud, A., Abrous, M., Moncef, M., Dreyfuss, G., 2004a. Variability in the prevalence of infection and cercarial production in *Galba truncatula* raised on a high-quality diet. Parasitol. Res. 92, 242-245.
- Rondelaud, D., Vignoles, P., Dreyfuss, G., 2004b. *Fasciola hepatica*: the developmental patterns of redial generations in naturally infected *Galba truncatula*. Parasitol. Res. 94, 183-187.
- Rondelaud, D., Vignoles, P., Dreyfuss, G., 2009. La Limnée tronquée, un mollusque d'intérêt médical et vétérinaire. Presses Universitaires de Limoges, Limoges, 283 p.
- Rondelaud, D., Hourdin, P., Vignoles, P., Dreyfuss, G., Cabaret, J., 2011. The detection of snail host habitats in liver fluke infected farms by use of plant indicators. Vet. Parasitol. 181, 166-173.
- Rondelaud, D., Titi, A., Vignoles, P., Mekroud, A., Dreyfuss, G., 2014. Adaptation of *Lymnaea fuscus* and *Radix balthica* to *Fasciola hepatica* through the experimental infection of several successive snail generations. Parasit. Vectors 7, 296-302.
- Rondelaud, D., Djuikwo-Teukeng, F.F., Vignoles, P., Dreyfuss, G., 2015a. *Lymnaea glabra*: progressive increase in susceptibility to *Fasciola hepatica* through successive generations of experimentally-infected snails. J. Helminthol. 16, 1-6.
- Rondelaud, D., Vignoles, P., Dreyfuss, G., 2015b. Larval trematode infections in *Galba truncatula* (*Gastropoda*, *Lymnaeidae*) from the Brenne Regional Natural Park, central France. J. Helminthol., 1-6.
- Ross, J.G., 1967. An epidemiology study of fascioliasis in sheep. Vet. Rec. 80, 214-217.
- Ross, J.G., 1968. The life span of *Fasciola hepatica* in cattle. Vet. Rec. 82, 587-589.
- Ross, J.G., 1970. The economics of *Fasciola hepatica* infections in cattle. Br. Vet. J. 126, 13-15.
- Ross, J.G., 1977. A five-year study of the epidemiology of fascioliasis in the North, East and West of Scotland. Br. Vet. J. 133, 263-272.
- Ross, J.G., Todd, J.R., 1970. Epidemiological studies of fascioliasis. Vet. Rec. 87, 370-372.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N., 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle-cell anemia. Science 230, 1350-1354.

- Salazar, L., Estrada, V.E., Velasquez, L.E., 2006. Effect of the exposure to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) on life history traits of *Lymnaea cousini* and *Lymnaea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae). *Exp. Parasitol.* 114, 77-83.
- Samadi, S., Roumegoux, A., Bargues, M.D., Mas-Coma, M.S., Yong, M., Pointier, J.P., 2000. Morphological studies of Lymnaeid snails from the human fascioliasis endemic zone of Bolivia. *J. Moll. Stud.* 66, 31-44.
- Sanabria, R., Mouzet, R., Courtioux, B., Vignoles, P., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., Cabaret, J., Romero, J., 2012. Intermediate snail hosts of French *Fasciola hepatica*: *Lymnaea neotropica* and *Lymnaea viatrix* are better hosts than local *Galba truncatula*. *Parasitol. Res.* 111, 2011-2016.
- Sanabria, R., Mouzet, R., Courtioux, B., Vignoles, P., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., Cabaret, J., Romero, J., 2013. Comparative strategies and success of sympatric and allopatric *Fasciola hepatica* infecting *Galba truncatula* of different susceptibilities. *Parasitol Res* 112, 2255-2259.
- Sanchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., Suarez, J., Panadero, R., Diez-Banos, P., Morrondo, P., 2000. Use of a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). *Vet. Parasitol.* 93, 39-46.
- Schepens, C., Ilef, D., Ajana, F., Volant, P., Flavigny, M.C., Therouanne, M., Lefort, M., Fillebeen, C., Mailles, V., Capek, I., De Valk, H. 2002. Epidémie de distomatose à *Fasciola hepatica* dans la région Nord Pas-de-Calais. In DRASS du Nord Pas-de-Calais Cellule interregionale d'épidémiologie Nord, Pas-de-Calais, P.d.N., ed. (Tourcoing, Institut de Veille Sanitaire), p. 40.
- Schniebs, K., Glöer, P., Vinarski, M.V., Hundsdoerfer, A.K., 2011. Intraspecific morphological and genetic variability in *Radix Balthica* (Linnaeus 1758) (Gastropoda: Basommatophora: Lymnaeidae) with morphological comparison to other European *Radix* species. *J. Conchol.* 40, 657-677.
- Schniebs, K., Glöer, P., Vinarski, M.V., Hundsdoerfer, A.K., 2013. Intraspecific morphological and genetic variability in the European freshwater snail *Radix labiata* (Rossmassler, 1835) (Gastropoda: Basommatophora: Lymnaeidae). *Contrib. Zool.* 82, 55-68.
- Schweizer, G., Braun, U., Deplazes, P., Torgerson, P.R., 2005. Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *Vet. Rec.* 157, 188-193.
- Schweizer, G., Meli, M.L., Torgerson, P.R., Lutz, H., Deplazes, P., Braun, U., 2007. Prevalence of *Fasciola hepatica* in the intermediate host *Lymnaea truncatula* detected by real time TaqMan PCR in populations from 70 Swiss farms with cattle husbandry. *Vet. Parasitol.* 150, 164-169.

- Selemetas, N., de Waal, T., 2015. Detection of major climatic and environmental predictors of liver fluke exposure risk in Ireland using spatial cluster analysis. *Vet. Parasitol.* 209, 242-253.
- Selemetas, N., Phelan, P., O'Kiely, P., Waal, T., 2014. Weather and soil type affect incidence of fasciolosis in dairy cow herds. *Vet. Rec.* 175, 371.
- Selemetas, N., Ducheyne, E., Phelan, P., O'Kiely, P., Hendrickx, G., de Waal, T., 2015a. Spatial analysis and risk mapping of *Fasciola hepatica* infection in dairy herds in Ireland. *Geospat. Health* 9, 281-291.
- Selemetas, N., Phelan, P., O'Kiely, P., de Waal, T., 2015b. Cluster analysis of fasciolosis in dairy cow herds in Munster province of Ireland and detection of major climatic and environmental predictors of the exposure risk. *Geospat. Health* 9, 271-279.
- Selemetas, N., Phelan, P., O'Kiely, P., de Waal, T., 2015c. The effects of farm management practices on liver fluke prevalence and the current internal parasite control measures employed on Irish dairy farms. *Vet. Parasitol.* 207, 228-240.
- Shaka, S., Nansen, P., 1979. Epidemiology of fascioliasis in Denmark. studies on the seasonal availability of metacercariae and the parasite stages overwintering on pasture. *Vet. Parasitol.* 5, 145-154.
- Shubkin, C.D., White, M.W., Abrahamsen, M.S., Rognlie, M.C., Knapp, S.E., 1992. A nucleic acid-based test for detection of *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* 78, 817-821.
- Silva Santos, S., Laranja, R.J., Costa, N.C., Bothelo, G.A., Ceresér, V.H., Martins, J.R., 1987. *Lymnaea columella* Say, 1817 interagindo na disseminação de fasciolose na Estação Experimental Zootécnica de Dom Pedrito, R. S. *Hora Veterinária* 6.
- Sindou, P., Cabaret, J., Rondelaud, D., 1991. Survival of snails and characteristic lesions of *Fasciola hepatica* infection in four European species of *Lymnaea*. *Vet. Parasitol.* 40, 47-58.
- Skirnisson, K., Aldhoun, J.A., Kolarova, L., 2009. A review on swimmer's itch and the occurrence of bird schistosomes in Iceland. *J. Helminthol.* 83, 165-171.
- Smith, G., 2011. Models of macroparasitic infections in domestic ruminants: a conceptual review and critique. *Rev. Sci. Tech.* 30, 447-456.
- Soldanova, M., Selbach, C., Kalbe, M., Kostadinova, A., Sures, B., 2013. Swimmer's itch: etiology, impact, and risk factors in Europe. *Trends Parasitol.* 29, 65-74.
- Soulsby, E.J.L., 1982. *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals*, Harcourt Publishers Ltd Edition. Bailliere Tindall, London, UK, 809 p.

- Spithill, T.W., Smooker, P.M., Sexton, J.L., Bozas, E., Morrison, C.A., Parsons, J.C., 1999. the development of vaccines against fasciolosis, In: J.P., D. (Ed.) Fasciolosis. CABI Publishing, Oxon, pp. 465-525.
- Steenstrup, J.J.S., 1845. On the alternation of generations; or, the propagation and development of animals through alternate generations (etc.). Translated from the German version of 1842, Ray Society Edition London, UK, 132 p.
- Sullivan, J.T., Yeung, J.T., 2011. Incompatibility between miracidia of *Schistosoma mansoni* and *Helisoma duryi* occurs at two stages: penetration and intramolluscan establishment. *J. Parasitol.* 97, 743-745.
- Szmidt-Adjide, V.V., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., Cabaret, J., 1996. The Effect of Parasitism by *Fasciola hepatica* and *Muellerius capillaris* on the Nerve Ganglia of *Lymnaea truncatula*. *J. Invertebr. Pathol.* 67, 300-305.
- Tavares, R.G., Staggemeier, R., Borges, A.L.P., Rodrigues, M.T., Castelan, L.A., Vasconcelos, J., Anschau, M.E., Spalding, S.M., 2011. Molecular techniques for the study and diagnosis of parasite infection. *J. Venom. Anim. Toxin. Includ. Trop. Dis.* 17, 239-248.
- Taylor, E.L., 1965. Fascioliasis and the liver fluke, Vol 64, FAO Agricultural Studies Edition Rome, 253 p.
- Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L., 2007. *Fasciola hepatica*, In: Publishing, B. (Ed.) Veterinary Parasitology. Blacwell Publishing Ltd, Oxford.
- Toet, H., Piedrafita, D.M., Spithill, T.W., 2014. Liver fluke vaccines in ruminants: strategies, progress and future opportunities. *Int. J. Parasitol.* 44, 915-927.
- Torgerson, P., Claxton, J., 1999. Epidemiology and control, In: Dalton, J.P. (Ed.) Fasciolosis. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, U.K., pp. 113-149.
- Trueba, G., Guerrero, T., Fornasini, M., Casariego, I., Zapata, S., Ontaneda, S., Vasco, L., 2000. Detection of *Fasciola hepatica* infection in a community located in the Ecuadorian Andes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62, 518.
- Ueta, M.T., 1980. Ocorrência de infecção natural de *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 em *Lymnaea columella* Say, 1817 no Vale do Paraíba, SP, Brasil. *Rev. Saúde Pública* 14, 230-233.
- Urquhart, G.M., Armour, J., Doyle, J., Jennings, F.W., 1970. Studies on ovine fascioliasis. 3. The comparative use of a molluscicide and an anthelmintic in the control of the disease. *Vet. Rec.* 86, 338-345.
- Valero, M.A., Marcos, M.D., Fons, R., Mas-Coma, S., 1998. *Fasciola hepatica* development in the experimentally infected black rat *Rattus rattus*. *Parasitol. Res.* 84, 188-194.

- van Aken, D. 1982. Detection of the larval stages of *Fasciola hepatica* in *Lymnaea truncatula* by enzyme electrophoresis (Antwerpen, Instituut voor Tropische Geneeskunde Afdeling Diergeneeskunde), p. 26.
- van Aken, D., Brandt, J., 1987. Preliminary observations on the detection of the larval stages of *Fasciola hepatica* in *Lymnaea truncatula* by enzyme-electrophoresis. Ann. Soc. Belge Med. Trop. 67, 295-298.
- van der Knaap, W.P., Loker, E.S., 1990. Immune mechanisms in trematode-snail interactions. Parasitol. Today 6, 175-182.
- van Valen, L., 1973. A New Evolutionary Law. Evolutionary Theory 1, 1-30.
- Vanheste, R., De Peuter, B., Van Hoe, L., Vanhoenacker, R., D'Haenens, P., 2008. MRI findings of hepatobiliary fascioliasis. JBR-BTR 91, 206-208.
- Vasoo, S., Pritt, B.S., 2013. Molecular diagnostics and parasitic disease. Clin. Lab. Med. 33, 461-503.
- Velusamy, R., Singh, B.P., Raina, O.K., 2004. Detection of *Fasciola gigantica* infection in snails by polymerase chain reaction. Vet. Parasitol. 120, 85-90.
- Vercruysse, J., Claerebout, E., 2001. Treatment vs non-treatment of helminth infections in cattle: defining the threshold. Vet. Parasitol. 98, 195-214.
- Vignoles, P., Dreyfuss, G., Rondelaud, D., 2002a. Larval development of *Fasciola hepatica* in experimental infections: variations with populations of *Lymnaea truncatula*. J. Helminthol. 76, 179-183.
- Vignoles, P., Dreyfuss, G., Rondelaud, D., 2002b. Redial growth and cercarial productivity of *Fasciola hepatica* in three species of young lymnaeid snails. J. Helminthol. 76, 269-272.
- Vignoles, P., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., 2003. A first infection of *Galba truncatula* with *Fasciola hepatica* modifies the prevalence of a subsequent infection and cercarial production in the F1 generation. Parasitol. Res. 91, 349-352.
- Vignoles, P., Novobilsky, A., Hoglund, J., Kasny, M., Pankrac, J., Dreyfuss, G., Pointier, J.P., Rondelaud, D., 2014. *Lymnaea cubensis*, an experimental intermediate host for *Fascioloides magna*. Folia Parasitol. 61, 185-188.
- Vignoles, P., Dreyfuss, G., Rondelaud, D., 2015. *Fasciola hepatica*: comparative metacercarial productions in experimentally-infected *Galba truncatula* and *Pseudosuccinea columella*. Parasite 22, 15.
- Villavicencio, A., Vasconcellos, M.C., 2005. First report of *Lymnaea cousini* Jousseume, 1887 naturally infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (*Trematoda: Digenea*) in Machachi, Ecuador. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 100, 735-737.

- Villavicencio, A., Gorochoy, V., Carvalho de Vasconcellos, M., 2006. *Lymnaea truncatula* Muller, 1774 (*Pulmonata: Lymnaeidae*) infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758)(*Trematoda: Digenea*), in Moscow districts, Russian Federation. *Rev. Pathol. Trop.* 35, 59-64.
- Vinarski, M.V., 2013. One, two, or several? How many lymnaeid genera are there? *Ruthenica* 23, 41-58.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R., 1991. Chelex®100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotech.* 10, 506-513.
- Wannasan, A., Khositharattanakool, P., Chaiwong, P., Piangjai, S., Uparanukraw, P., Morakote, N., 2014. Identification of *Fasciola* species based on mitochondrial and nuclear DNA reveals the co-existence of intermediate *Fasciola* and *Fasciola gigantica* in Thailand. *Exp. Parasitol.* 146, 64-70.
- Wardhaugh, K.G., Holter, P., Longstaff, B., 2001. The development and survival of three species of coprophagous insect after feeding on the faeces of sheep treated with controlled-release formulations of ivermectin or albendazole. *Aust. Vet. J.* 79, 125-132.
- Waters, A.P., McCuthan, T.F., 1990. Ribosomal RNA: nature's own polymerase-amplified target for diagnosis. *Parasitol. Today* 6, 56-59.
- Weiss, J.B., 1995. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 113-130.
- Winkelhagen, A.J., Mank, T., de Vries, P.J., Soetekouw, R., 2012. Apparent triclabendazole-resistant human *Fasciola hepatica* infection, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1028-1029.
- Wullschleger, E.B., Jokela, J., 2002. Morphological plasticity and divergence in life history traits between two closely related freshwater snails, *Lymnaea ovata* and *Lymnaea peregra*. *J. Mollusc. Stud.* 68, 1-5.
- Wullschleger, E.B., Wiehn, J., Jokela, J., 2002. Reproductive character displacement between the closely related freshwater snails *Lymnaea peregra* and *L. ovata*. *Evol. Ecol. Res.* 4, 247-257.
- Xavier, M.S., Fernandez, R., Mattos dos santos, M.A., 1968. The susceptibility to *Fasciola hepatica* of some fresh-water snails in Portugal and Spain. In: *Second Liverfluke Colloquium*, Wageningen, pp. 179-184.
- Yoshino, T.P., Wu, X.J., Liu, H., Gonzalez, L.A., Deelder, A.M., Hokke, C.H., 2012. Glycotope sharing between snail hemolymph and larval schistosomes: larval transformation products alter shared glycan patterns of plasma proteins. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1569.

ANNEXES

ÉTUDE 5

ÉTUDE 6

ÉTUDE 7

ÉTUDE 8

The detection and quantification of a digenean infection in the snail host with special emphasis on *Fasciola* sp.

Yannick Caron · Daniel Rondelaud · Bertrand Losson

Received: 29 May 2008 / Accepted: 5 June 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract In this review, ten methods used to study digenean infections in their intermediate hosts were compared to determine which one should be used either in the field or in the lab to establish the prevalence and intensity of infections in snails. Snail crushing and snail dissection allow quick establishing of prevalence in natural or experimental infections, whereas histology is considered as the most accurate approach to assess the intensity of infection. The follow-up of cercarial shedding only gave an idea on cercarial production. Among recently developed techniques, polymerase chain reaction (PCR) brings the most accurate information and shows high sensitivity and specificity levels when compared to blotting techniques. The easiness and relatively low cost of the basic PCR protocol make it interesting to investigate the epidemiology of the liver fluke in a lab with limited financial resources. Nevertheless, if this technique allows a relatively good estimation of the prevalence, information concerning the intensity of infection is best obtained through real time PCR. However, at the time being this technique is too expensive to be used routinely in the field. The choice between classical or new techniques is usually based on a compromise, as each technique has its advantages and drawbacks.

Introduction

In the life cycle of a digenean, several species of snails can act as intermediate hosts. However, the aptitude of the different species of snails to maintain the parasite life cycle during natural or experimental infections varies according to snail species and more particularly to the age of the snails when exposed to miracidia. For example, in the case of *Fasciola hepatica*, *Galba truncatula* is the main intermediate host in the Old World (Taylor 1965; Torgerson and Claxton 1999) but most of the other lymnaeid species of western Europe may also sustain the larval development of the liver fluke if they are exposed to miracidia during their first days of life (Boray 1978). To determine the ability of a snail species or a snail population to act as an intermediate host of a given species of digenean, it is necessary to measure several parameters such as the prevalence and intensity of snail infection, and metacercarial production (Graczyk and Fried 1999).

Several methods were developed by different authors to detect natural or experimental digenean infections in potential snail intermediate hosts and assess their parasite burdens. Snail crushing and/or dissection, with examination of the soft tissues under a dissecting microscope, are still widely used to detect a natural infection in snails collected from the field (Taylor 1965). Cercarial shedding during the patent period (Taylor 1965) is also commonly used. Examination of serial tissue sections from infected snails can also be used to determine the development of the redial burden and analyze the response of infected tissues (Barber 1962; Rondelaud and Barthe 1980a, 1983). However, the sensitivity and/or specificity of these classical techniques can be problematic and consequently, the development of highly sensitive and specific methods for detecting the liver fluke (and other digeneans) in the snails was undertaken (Kaplan et al. 1995). In 1982 already, enzymatic electrophoresis was developed (Van

Y. Caron (✉) · B. Losson
Faculty of Veterinary Medicine,
Department of Infectious Diseases, University of Liège,
20 Boulevard de Colonster, B-43a,
4000 Liège, Belgium
e-mail: ycaron@ulg.ac.be

D. Rondelaud
UPRES EA no. 3174, Faculty of Medicine,
2 rue du Docteur Raymond Marcland,
87025 Limoges Cedex, France

Aken 1982). In 1985, a strategy for amplifying target DNA sequences via in vitro DNA replication (polymerase chain reaction, (PCR)) was first described (Saiki et al. 1985). DNA or RNA probe based assays allow the study of *Fasciola* sp. genome and the elaboration of different PCR protocols, like multiplex or real time PCRs. Ideally these techniques should be used in the field.

As the results obtained for a given parameter in a given snail population showed variations according to the technique used, one may wonder what method is to be used for investigating the level of infection in the snails. The aim of the present review is to compare the different techniques available for the specific detection of *Fasciola* sp. in *G. truncatula* and other potential lymnaeids intermediate hosts. This should allow selection of the most appropriate technique in a given situation and for a specific purpose.

Techniques based on microscopy

As already mentioned the first available techniques (crushing, dissection, cercarial shedding, and/or histology) were extensively used before the introduction of molecular biology.

Snail crushing and dissection

The earliest and simplest method to detect a digenean infection was snail crushing. As the shell of *G. truncatula* is small (≤ 12 mm) and often very thin, especially in populations living on acid soils, the snail is squashed in a water-filled Petri dish by applying the jaws of a fine forceps on the last whorl of the shell. If live larval forms of *F. hepatica* are present, they can be easily observed among the fragments of the shell and snail's viscera. This is an easy and fast way to evaluate the prevalence of infection in snails collected from the field (Dreyfuss et al. 2005). However, the intensity of infection is difficult to establish, as only live free rediae and free cercariae present within the snail's hemocoel can be counted. Indeed, the sporocysts of *F. hepatica*, the immature or degenerated rediae (Rondelaud and Barthe 1980b) and a few free cercariae, often located within the snail's foot and mantle, cannot be observed. In the same way, the encystment of released cercariae into metacercariae on the dish walls is scarce making this technique unsuitable to study cercarial emission and metacercarial encystment.

To overcome these difficulties, snail dissection is preferable. After destruction of the shell, the dissection of viscera and their examination under a dissecting microscope or a microscope allow to record the numbers of live or degenerated free rediae and cercariae, whatever their state of maturity. This technique was used by numerous authors (Abrous et al. 1999, 2000; Mage et al. 2002) to follow the intensity of natural infections with *F. hepatica* in *G. truncatula* populations

living in swampy meadows on acid soils. Snail dissection was, for example, used to count sporocysts of *Fascioloides magna* in the foot and mantle of *G. truncatula* in the days following miracidial penetration (Erhardová-Kotrlá 1971). A similar method was also used by several authors to follow the development of redial generations in *G. truncatula* infected by *F. hepatica* (Belfaiza et al. 2004a, b, 2005), or to detect the presence of *F. hepatica* rediae in *Pseudosuccinea columella* 2 weeks after snail exposure to miracidia (Pointier et al. 2007). When compared to the first method, the calculation of the infection rate in snails infected with *F. hepatica* gives similar results. However, the parasite load is better evaluated, as it takes into account more rediae and all free cercariae present in the snail. Counting *F. hepatica* sporocysts is always difficult or even impossible, as these larvae are located in the mantle, a tentacle, or the kidney so that they cannot be observed. If the foot of the snail is removed from the Petri dish, many cercariae may encyst into metacercariae on the dish walls (Vignoles et al. 2008) and this allows to determine their state of maturity.

Monitoring of cercarial shedding

This approach was already used by the authors who had worked on the life-cycle of *F. hepatica* as early as 1880 (Taylor 1965). In the *Bulinus truncatus*/*Schistosoma haematobium* model, for example, sunlight stimulated cercarial shedding (Moukrim et al. 1995). However, this method is unsuitable for snails infected by digeneans other than *Schistosoma* sp. In the case of *F. hepatica*, cercarial shedding is recorded in the course of week 6 or 7 after maintenance at a temperature of 20°C. This interval is progressively reduced when the snails are maintained at increasing temperatures (Kendall and McCullough 1951; Hodasi 1972; Audousset et al. 1989). There are two main drawbacks at this technique. The first is the intermittent production of cercariae over time so that no shedding of *F. hepatica* may occur for a week or more (Kendall and McCullough 1951; Audousset et al. 1989). Secondly, variable numbers of infected snails died without shedding cercariae, as demonstrated in 70 different populations of *G. truncatula* infected with *F. hepatica* (Vignoles et al. 2002) (Table 1). As the prevalence of infection in snails can only be estimated through cercarial shedding, it is grossly underestimated. In the same way, the intensity of infection is difficult to establish as cercarial shedding is the only criterion taken into account. This last drawback can be overcome through the dissection of snail cadavers and the assessment of their larval burden (Dreyfuss and Rondelaud 1995). Additionally, the monitoring of cercarial shedding is time-consuming and the maintenance of infected snails required a specific material when compared with the use of squashing or dissection methods. According to our own experience, this method must be restricted to the study of cercarial shedding.

Table 1 Relationship between the prevalence of infection with *F. hepatica* in experimentally exposed snail populations ($n=70$) and the completion of the life cycle

Prevalence of <i>Fasciola hepatica</i> infections	Number of snail populations	Mean frequency for each group of infected snails (in %)		
		Cercarial shedding	No shedding but free cercariae and/or rediae containing cercariae present	Others ^a
>60%	17	56.8	29.3	13.9
40–59%	15	53.5	31.3	15.2
20–39%	23	50.1	32.3	17.6
5–19%	11	14.0	58.0	28.0
<5%	4	0	0	100

Snails were classed into three categories: cercarial shedding, infection but no cercarial shedding, and snails containing sporocysts and/or immature rediae only (Vignoles et al. 2002)

^a Snails containing sporocysts and/or immature rediae only

Histological examination

If larval forms of a digenean are present in a snail during its dissection, they need to be first identified before fixation. Indeed, histological examination does not allow parasite speciation, as sporocysts of all digeneans have the same aspect. As a consequence, this technique cannot be used to study parasite development during natural infections of snails. However, histological examination of experimentally infected snails allows an accurate count of the different larval forms (sporocysts, rediae, or cercariae), the evaluation of their physiological status (alive or degenerating) and of their location within the snail. In the case of *F. hepatica*, this method was used to study the development of redial generations (Rondelaud and Barthe 1982, 1987) and, also, the response of snail's viscera to larval development (Barber 1962; Rondelaud and Barthe 1980a, 1983). This technique is really interesting to determine the level of infection in the snails but a fairly long period of time (from 15 to 30 days) is required between exposure to miracidia and histological examination. Consequently, it is not appropriate for a rapid evaluation of the prevalence of infection in a given snail population. Finally it is a fairly expensive technique which is unsuitable for the routine monitoring of infection in large snail populations.

Iso-enzymatic and molecular biology techniques

In this part, we will describe the technical features, the sensitivity, and the specificity of each method. These techniques can be classified in two groups: biochemical (enzymatic electrophoresis) and molecular biology (blotting and PCR) techniques.

Biochemical technique

In 1982, Van Aken used a practical application of the thin-layer starch gel electrophoresis to reveal enzyme patterns of the glucose phosphate isomerase (GPI; E.C. 5.3.1.9.) of the larval

stages of *F. hepatica* in *G. truncatula* (Van Aken 1982; Van Aken and Brandt 1987). Thin-layer starch gel electrophoresis was able to detect a broad spectrum of diagnostic isoenzymes (Dassler and Schmiedel 1989) and was used in helminthology for the identification of taeniid cestodes (Le Riche and Sewell 1977, 1978b) and different strains of *Echinococcus granulosus* (Le Riche and Sewell 1978a). At the present time, enzyme electrophoresis is principally used to characterize isolates of parasites, for example *Leishmania* sp. (Calvopina et al. 2006) or *Trypanosoma* sp. (Yeo et al. 2007). The starch gel is prepared and poured in a glass mould. In the meantime, the infected snails are individually homogenized with an enzyme stabilizing solution. A cotton strand is soaked in this mixture and placed into a slot on the gel. This gel is placed on a plate connected to two compartments containing phosphate buffer with Whatman paper. Electrophoresis is performed during 3 h and an agar overlay containing the developing solution plus meldolablu is gently poured on the starch gel and an incubation (37°C) will follow until banding appears (Van Aken 1982). Snails individually exposed to one, two, or five to seven miracidia were electrophoretically analyzed at five, 12, 19, 26, and 33 days after exposure. No difference was observed between the GPI-patterns of adult or larval *F. hepatica* homogenates, both being situated more cathodally than the bands obtained from uninfected *G. truncatula*.

In the case of snails infected with one or two miracidia, the presence of larvae could be demonstrated, but not earlier than 12 days post-infection. When five or seven miracidia were used for infection, it was possible to demonstrate the infection from day 5 (Van Aken 1982). With this technique, it seems difficult to detect *F. hepatica* in the snail before day 5 post-infection. Outside the *F. hepatica*/*G. truncatula* model, no experiments concerning specificity were conducted.

RNA-based blotting

The use of nucleic acid techniques in the diagnosis of parasitic infection has become increasingly widespread (Hubscher

1991; Barker 1994; Weiss 1995; Prichard 1997; Gasser 1999). RNA or DNA can be separated on the basis of size and charge by electrophoresis and then transferred to a nylon membrane and exposed to a specific marked probe. This probe will bind to similar sequences. The process in which single-stranded DNA is hybridized to a single strand of DNA following electrophoresis is called Southern blot. The DNA can originate from RNA by reverse transcriptase reaction (RT) and is called complementary DNA (cDNA). These techniques were developed in the beginning of the 1990s. Nucleic acid probes derived from ribosomal RNA (rRNA) were developed successfully for several organisms including *Aeromonas salmonicida*, *Plasmodium berghei*, and *Trichostrongylus axei* (Barry et al. 1990; Waters and McCuthan 1990; Severson 1991). In 1992, Shubkin et al. developed this kind of technique for *F. hepatica*. Experimental infection with *F. hepatica* in *P. columella* was detected by reverse transcription PCR (RT-PCR) that amplified fragments of *F. hepatica* rRNA. Total RNA obtained from adult liver flukes was used in a polymerase chain reaction to isolate and amplify a region of approximately 650 bp in the small subunit rRNA. This portion of the ribosomal cDNA, which contains highly conserved regions as well as variable regions, was subcloned and sequenced. A sequence unique to *F. hepatica* was identified and an oligonucleotide probe (CS4) of 20 bp for detection of the liver fluke was first developed. A Southern blot analysis using CS4 and ³²P successfully identified small subunit rRNA from *F. hepatica* (Shubkin et al. 1992). The first technique was then improved and tested in an epidemiological study (Rognlie et al. 1994, 1996). In this case the RT reaction uses a non-specific primer (CS9) to produce cDNA from a rRNA template. Then fasciolid cDNA is amplified by the PCR using a second primer sequence (CS11) specific to fasciolids (Rognlie et al. 1994). This amplified sequence contained the fasciolid-specific probe hybridization site (CS6) that is a little bit longer than the CS4 sequence. The seasonal transmission of *F. hepatica* was then studied under natural conditions in Montana (USA) in batches of *Lymnaea modicella* and *Lymnaea bulimoides* (Rognlie et al. 1996).

Blotting analysis revealed that RNA isolated from a single miracidium was not detectable, whereas RNA derived from five miracidia was detected (Shubkin et al. 1992). In later experiments, the detection limit for purified fluke RNA was 10 fg and an approximative 100-fold increase in sensitivity was achieved through Southern blot. Using this technique, infection in snails was detectable as early as one to 37 days post exposure (Rognlie et al. 1994). The reliability of this assay was assessed. There was not false positive but 11% of false negative results were recorded (Rognlie et al. 1994). The latter might be due, either to a true technical problem, or to the absence of parasitic development in exposed snails (Rognlie et al. 1994). To examine sensitivity further, various numbers of snails exposed to three to five miracidia were

combined with unexposed snails and total RNA was extracted. The assay was able to detect a single infected snail out of 20 (Rognlie et al. 1994). In an epidemiological study (Rognlie et al. 1996), batches, each containing a maximum of 25 snails, were screened for fasciolid-specific ribosomal RNA sequence. Three thousand and seventy two individual lymnaeid snails were tested for infection and one batch contained liver fluke rRNA (Rognlie et al. 1996).

This technique allows the detection of *F. hepatica* in *P. columella* and *L. modicella*, with an oligonucleotide probe derived from a rRNA sequence. The oligonucleotide probe did not hybridize with the RNA of these two snail species, nor non-lymnaeid (*Aplexa elongata*, *Gyraulus* sp., and *Oxyloma* sp.) species (Shubkin et al. 1992; Rognlie et al. 1994, 1996). *F. magna* RNA and probably *Fasciolopsis buski* RNA were detected through Southern blot; cross reactivity with *Fasciola gigantica* was not checked. The assay is not expected to cross-react with other trematodes outside the family Fasciolidae (Rognlie et al. 1994). The oligonucleotide sequences (CS6 and CS11) were aligned with several rRNA sequences from organisms that could be considered as field contaminants (*Saccharomyces cerevisiae*, *Fucus distichus*, *Aspergillus fumigatus*, and *Escherichia coli*) with significant differences ruling out cross-reaction (Rognlie et al. 1994).

DNA-based blotting

DNA probes for the identification and detection of parasites, either in their definitive hosts or in different intermediate hosts, have been shown to be useful diagnostic and epidemiologic tools (Kukla et al. 1987; Delves et al. 1989; Webster et al. 1989). The first DNA-based technique that aimed to detect specifically *F. hepatica* in snails was described in 1993 (Heussler et al. 1993). *F. hepatica* DNA was extracted and digested with *Bam* HI. A distinct banding pattern of repetitive DNA sequences could clearly be detected. DNA fragments corresponding to these regions were isolated and cloned in a plasmid vector. Four clones, corresponding to highly repetitive DNA fragments, were isolated and tested by Southern blot hybridization to the DNA of various trematodes for specificity and sensitivity. The four probes detected parasite material in snail squash blots and no hybridization with snail DNA was observed. These four probes did not cross-react with *G. truncatula* DNA. Three probes, named Fhr-I, Fhr-II and Fhr-III, hybridized only to *F. hepatica* DNA whereas the Fhr-IV cross-hybridized with the DNA of various other trematode species (*Dicrocoelium dendriticum*, *Xiphidiocercaria* sp., *Diplostoma* sp., *Trichobilharzia* sp., and *Dendritobilharzia* sp.) and showed over 90% homology with the 18S rRNA genes of trematodes such as *Opisthorchis viverrini* and various *Schistosoma* sp. (Heussler et al. 1993). The probes were not tested for *F. magna* nor *Paramphistomum* sp.

In 1995, Kaplan and colleagues developed a repetitive DNA probe for the sensitive detection of *F. hepatica* in infected snails. After the isolation of genomic DNA with a new DNA extraction protocol using a cationic quaternary ammonium compound (CTAB), they constructed a *F. hepatica* genomic DNA library with the help of *Sau* 3A and plasmid transformations. Then, a selection of clones containing repetitive sequences was done using a radiolabelled probe. The sensitivity and specificity of the selected probe (GenBank Accession numbers, FHU 11818, FHU 11819) were determined through experimental infections. Quantitative blotting analysis revealed that this 124-bp repeat constitutes about 15% of the whole *F. hepatica* genome (Kaplan et al. 1995). In 1997, Kaplan and colleagues modified their previous protocol and used chemiluminescent detection which improved the assay efficiency. They collected from the field and analyzed more than 5,000 snails in Florida. The pFh5 probe was ³²P-labelled or digoxigenin-labelled (Kaplan et al. 1997). One nanogram of genomic DNA of the liver fluke was detected and this level of sensitivity was not reduced by the presence of 10 µg of snail DNA (*P. columella*, or *Fossaria cubensis*) (Kaplan et al. 1995). Infection was detected immediately following miracidial penetration; thus a sensitivity equivalent to the minimal biologic unit of the parasite (one miracidium) was achieved. Additionally, the signal increased in a logarithmic fashion over time so that it can be used to estimate the age of infection (Kaplan et al. 1995). Using the chemiluminescent detection in a blinded study (288 snails, 32 infected) both the sensitivity and the specificity reached 100% when 200 ng (an amount of DNA approximately equal to a 14–21-day-old infection) or less *F. hepatica* DNA was randomly added to snail DNA (Kaplan et al. 1997). However, the efficiency of the DNA-extraction protocol and the sensitivity of the probe were not confirmed in a later study (Krämer 1999). The pFh5 probe did not cross hybridize with 1 µg of genomic DNA of *F. magna*, of *Paramphistomum liorchis* or of *Heterobilharzia americana*, species which share the same enzootic range and the same intermediate hosts than those of *F. hepatica* in Florida, USA (Kaplan et al. 1995). The high degree of sequence identity explains the cross reactivity between the *Fasciola*-probe and DNA from *F. hepatica* and *F. gigantica*. This is a drawback in areas where both species are potentially present (Krämer and Schnieder 1998; Krämer 1999). The PCR performed on DNA from *G. truncatula* and *Lymnaea pervia* did not reveal any PCR products. In *Fasciola* sp. infected snails, PCR products with the characteristic ladder of multiple 120-bp repeats were visualized. Negative results were obtained with *Paramphistomum* sp. and *D. dendriticum* (Krämer and Schnieder 1998).

Classical PCR

PCR allows very small quantities of DNA or RNA to be selectively amplified. Several research teams used Kaplan's

experiments to design PCR protocol and confirm the usefulness of this tool under field or experimental conditions (Krämer and Schnieder 1998, 1999; Krämer 1999; Mostafa et al. 2003; Velusamy et al. 2004; Caron et al. 2007). Additionally, an original PCR protocol using a fragment of the cytochrome C oxidase subunit 1 gene of *F. hepatica* was compared to microscopic observation in naturally infected snails (Cucher et al. 2006).

The sequence heterogeneity of pFh5 was studied in *F. hepatica* and *F. gigantica* (36 specimens originating from five continents), by PCR, cloning and alignment (Krämer and Schnieder 1998). It was also used in a field study (Krämer 1999; Krämer and Schnieder 1999). The size of PCR-amplified sequences (usually about 120 bp) depends on the size and origin of the designed primers.

A PCR assay was used in Egypt to detect *F. gigantica* infection in *Lymnaea natalensis*. The amplified sequences gave the expected ladder pattern and the sensitivity and specificity were assessed during this study (Mostafa et al. 2003). The amplified products were detected as early as 1 h post-infection: 1 µl of DNA (unknown concentration) from *L. natalensis* infected by a single miracidium of *F. gigantica* for 24 h and diluted 20 times showed the expected 120-bp specific band. There was no cross reactivity with other three parasites: *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium* and *Echinostoma liei*, and with five snails: *L. natalensis*, *Physa acuta*, *Biomphalaria alexandrina*, *B. truncatus* and *Radix auricularia* (Mostafa et al. 2003). In the same way a PCR-assay was performed in India to detect *F. gigantica* in *R. auricularia*; the typical ladder pattern of the 120-bp sequence was also observed (Velusamy et al. 2004). In these two studies as well as in the work by Krämer and Schneider, the primers previously developed by Kaplan (Forward 5'-ATT CACCCATTTCTGTAGTCC-3'; reverse 5'-ACTAGGCT TAAAGGCGTCC-3') were used.

In Belgium, a PCR based on the pFh5 probe was performed on *G. truncatula*, *Radix labiata* and *Radix balthica* experimentally infected with *F. hepatica*. This study demonstrated that this PCR is a useful tool to study the epidemiology of fasciolosis since it revealed that *R. labiata* can act as an incidental intermediate host for *F. hepatica*. No cross reaction with *R. labiata* and *R. balthica* DNA were reported (Caron et al. 2007).

The complete mitochondrial DNA sequence of *F. hepatica* (GenBank accession number, X15613.1), was used to design the pair of primer used in the next study (Forward 5'-TATGT TTTGATTTTACCCGGG-3', reverse 5'-ATGAGCAACCA CAAACCATGT-3') (Cucher et al. 2006). The positions of the primers were selected to amplify a 405 bp region of the cytochrome c oxidase subunit 1 gene. The assay detects 10 pg of purified genomic *F. hepatica* DNA. This detection level was not modified by the presence of 10% of the total DNA extracted from an infection-free *Lymnaea* sp., but it

increased to 100 pg when 20% of snail DNA was added. Nevertheless, the presence of PCR inhibitors in samples was demonstrated as *F. hepatica* infected snails (as demonstrated microscopically) gave a negative PCR result. To overcome this problem, the PCR mix was modified by the addition of bovine serum albumine (BSA). No amplification was detected with DNA from uninfected, laboratory-reared *P. columella* and *Lymnaea viatrix* (Cucher et al. 2006).

Multiplex PCR

The multiplex PCR aims to amplify several sequences in the same tube and in the same time. This technique needs as much pairs of primers as sequences to be amplified. Mitochondrial DNA (mDNA) was used in a multiplex PCR technique to identify larval stages of *F. hepatica* in experimentally infected snails in Brazil (Magalhaes et al. 2004). From another complete mitochondrial DNA sequence of *F. hepatica* (Genbank accession number, AF216697), specific primers were designed for a conserved and repetitive region of this trematode. A pair of primers was used in *F. hepatica* experimentally infected *P. columella* during the prepatent period simultaneously with another pair of primers which amplified, under high stringency conditions, the internal transcribed spacer (ITS) region of the trematode and the mollusc rDNA, thus acting as an internal control (Magalhaes et al. 2004). PCR products were visualized on 6% silver-stained polyacrylamide gels. Amplification of *F. hepatica* specific mDNA was achieved and a ladder pattern with intervals of 85 nucleotides was visible. Such pattern mirrored the amplification of a tandem repeat DNA region (Magalhaes et al. 2004). The reaction was sensitive, as it detected a single miracidium (0.8 ng/μl) of *F. hepatica* in the presence of snail DNA (7 ng/μl). Specific amplification was obtained in infected snails as soon as 1 day post-exposure. The designed primers were specific for *F. hepatica* detection, as demonstrated by the band profiles obtained from snails infected with this trematode and other species commonly found in *P. columella* (Magalhaes et al. 2004).

Real time PCR

This technique is based on the 5'-3' exonuclease activity of the Taq DNA polymerase, which results in the cleavage of fluorescent dye-labelled TaqMan probe during PCR; the intensity of fluorescence is then measured by a sequence detection system which is proportional to the amount of PCR product formed. Recently, a quantitative real time PCR assay was designed and evaluated in naturally infected *G. truncatula* (Schweizer et al. 2007). Primers and probe were designed to amplify an 86-pb-long target of a repetitive 449-bp-long genomic DNA fragment cloned during a previous study (clone Fhr-II, Genbank accession number, S67037) (Heussler et al. 1993). The sensitivity of the de-

tection of *F. hepatica* with this technique was not evaluated (Schweizer et al. 2007).

Advantages and disadvantages of screening methods

Tables 2 and 3 list the advantages and drawbacks of the different methods used to study digenean infections in snails. If snail squashing is particularly well-adapted for detecting natural infections in snails collected from the field, its use is limited to the evaluation of the prevalence of infection. Snail dissection is the best method in the case of experimentally infected snails, as the infection rate and, in a lesser extent, the intensity of infection and metacercarial production can be assessed. Histological examination is time-consuming and fairly expensive but it allows an accurate evaluation of larval forms in the snail. Cercarial shedding has a limited value, as it gives only information on the dynamics of shedding in naturally or experimentally infected snails.

The enzyme electrophoresis in starch gel is a very cheap and simple biochemical method that could be used in a very

Table 2 Advantages and drawbacks of different techniques used to study the presence of *Fasciola* sp. in its intermediate host

Technique	Value of each technique (from 0 to +++) for determining		
	Prevalence of infection	Intensity of infection	Metacercarial production
Snail squashing ^a	+++	+	0/+
Snail dissection ^b	+++	++	++
Cercarial shedding ^c	+	+	+++
Histological methods ^d	++	+++	0
Enzyme electrophoresis ^e	+++	0	0
RNA-based blotting ^f	+++	+	0
DNA-based blotting ^g	+++	++	0
PCR basic ^h	+++	0	0
PCR multiplex ⁱ	+++	0	0
Real time PCR ^j	+++	No data	0

^a Dreyfuss et al. (2005)

^b Abrous et al. (1999, 2000), Mage et al. (2002)

^c Vignoles et al. (2002)

^d Rondelaud and Barthe (1982, 1987)

^e Van Aken (1982), Van Aken and Brandt (1987)

^f Shubkin et al. (1992), Rognlie et al. (1994, 1996)

^g Heussler et al. (1993), Kaplan et al. (1995, 1997)

^h Krämer and Schnieder (1998), Mostafa et al. (2003), Velusamy et al. (2004), Cucher et al. (2006), Caron et al. (2007)

ⁱ Magalhaes et al. (2004)

^j Heussler et al. (1993), Schweizer et al. (2007)

Table 3 Sensitivity, specificity, easiness, and cost of the techniques used for the detection of *Fasciola* sp. in their intermediate host

Technique	Interest of each technique (from 0 to +++) for determining			
	Sensitivity	Specificity	Easiness	Cost
Snail squashing ^a	+	+	+++	+
Snail dissection ^b	+	++	++	+
Cercarial shedding ^c	++	+	+	+
Histological methods ^d	++	++	+	+
Enzyme electrophoresis ^e	+	No data	+++	+
RNA-based blotting ^f	+++	++	+	+++
DNA-based blotting ^g	+++	++	++	+++
PCR basic ^h	+++	+++	+++	++
PCR multiplex ⁱ	+++	++	++	++
Real time PCR ^j	+++	++	+	+++

^a Dreyfuss et al. (2005)

^b Abrous et al. (1999, 2000), Mage et al. (2002)

^c Vignoles et al. (2002)

^d Rondelaud and Barthe (1982, 1987)

^e Van Aken (1982), Van Aken and Brandt (1987)

^f Shubkin et al. (1992), Rognlie et al. (1994, 1996)

^g Heussler et al. (1993), Kaplan et al. (1995, 1997)

^h Krämer and Schnieder (1998), Mostafa et al. (2003), Velusamy et al. (2004), Cucher et al. (2006), Caron et al. (2007)

ⁱ Magalhaes et al. (2004)

^j Heussler et al. (1993), Schweizer et al. (2007)

modest laboratory for a preliminary selection of possible intermediate hosts in a particular epidemiological context but the check out can be difficult (enzyme choice, temperature, chemical revelation). The specificity and sensitivity of the technique is poor when compared with DNA/RNA-based techniques and consequently it is not used anymore.

Blotting is not very easy and needs a fairly expensive equipment as it imposes the use of radiolabelled (³²P) or chemiluminescent-labelled (digoxigenin) probes. Several steps (which increase the contamination risk) are necessary: RNA or DNA extractions, reverse transcription if necessary, PCR, blotting, and hybridization: making this technique very time-consuming (at least 1 day). Contamination with RNAase is a real problem. However, the chemiluminescence detection is faster, safer, more sensitive, and less expensive than radioisotopic detection (Kaplan et al. 1997); with both revelation methods quantification is possible. For the entire assay including solutions, reagents, enzymes, and disposables, the cost is 0.22 to 0.24 Euro per sample (Kaplan et al. 1995). However, the laboratory must be equipped with heavy material such as thermal cycler, incubator, and radiological or chemiluminescent revelation system.

The molecular biology techniques are based on blotting or on PCR, and on various kinds of nucleic acids. The extraction

of DNA or RNA is always the first step. It has to be quick, cheap, safe, and easy to perform during large epidemiological surveys. This is not the case for the proteinase K/phenol/chloroform extraction protocol which necessitates many steps and is time consuming (overnight incubation). The use of CTAB (Kaplan et al. 1995) or even better, that of Chelex[®] (Walsh et al. 1991) eliminates the overnight incubation and allows the DNA extraction from 100 samples in less than 4 h at a very low cost (0.004 Euro per snail).

The principal advantage of the PCR is its high sensitivity and specificity contrary to DNA probes because the sequence amplified is always accurately targeted with primers. However, the hybridization process depends on the stringency of the reaction conditions. A thermal cycler (PCR), or a radiologic or luminescent detection system (DNA probe) is necessary. A disadvantage of the PCR is the possibility of false-negative (from PCR inhibitors) or false-positive (from carryover contamination) but the use of BSA or internal control can resolve this point (Magalhaes et al. 2004; Cucher et al. 2006). The PCR reaction takes only three to 4 h and many commercially available kits can facilitate the whole process. The amplification products are electrophoretically resolved in agarose gels and stained with ethidium bromide. This last step takes 2 h only. An optimized PCR protocol allows the analysis of up to 200 samples in less than 10 h. The cost is about 0.3 Euro per snail.

Magalhaes et al. (2004) recommended the use of an internal control in their multiplex PCR protocol. This is questionable because it complicates the process and cross hybridization between the four primers might occur.

In the case of *F. hepatica* infected snails, different types of nucleic acids can be amplified by PCR for *F. hepatica* diagnosis. First, in growing cells, rRNA is the most abundant nucleic acid present. An additional amplification system like PCR may not be even needed (Shubkin et al. 1992). Ribosomal DNA or RNA contain highly repeated sequences; sensitivity is high but specificity may be reduced because repeat sequences tend to be conserved between closely related species (Waters and McCuthan 1990). Secondly, repetitive DNA sequences (interspersed repetitive sequences) are interesting because they are often present in high levels. Additionally, these sequences evolve more rapidly than gene coding sequences making them excellent candidates for species-specific probes for eukaryotic organisms (McLaughlin et al. 1987). Thirdly, specific sequences of genomic DNA are highly specific for a given species (cytochrome C oxidase subunit 1 gene, or ITS for instance). While specificity is high, sensitivity may be lower when compared to highly repeated sequences. However, PCR can overcome a lack of sensitivity by greatly amplifying the sequence of interest (Prichard 1997).

Real time PCR is difficult to perform particularly with regard to the determination of the experimental conditions of the

reaction (design of the TaqMan probe, optimization of E_{PCR}) and result interpretation. It is an expensive technique because of the TaqMan probe (about 150 Euros), and the price of the fluorescence detection system (about 20,000 Euros). Real-time PCR has a major advantage: it allows the quantification of nucleic acid sequences in a sample. The signal intensity of a basic PCR is very difficult to interpret in a quantitative way because we cannot know if the signal reflects the exponential step or not, contrary to real time PCR where the cycle threshold (C_t) value is calculated in the exponential measurable step. Sensitivity and specificity are comparable in both techniques as well as reproductibility at a lower extent; However, real-time PCR is faster and does not need a detection step post-PCR (agarose or polyacrylamide gels) since amplification and detection are done simultaneously.

Conclusions

According to Barker (1994), “PCR is likely to have a profound effect upon parasitological studies precisely because it provides the means to answer questions which have otherwise been difficult to address”. We can add that in the case of *F. hepatica* and its snail hosts, the ideal screening technique does not exist simply because each available technique addresses different questions (Tables 2 and 3).

Snail crushing and dissection are simple and allow the direct detection of naturally and experimentally infected snails. Furthermore, distinct larval stages can be identified. However, the calculation of the prevalence and intensity of infection is slow, labor-consuming, tedious, and is only feasible in fairly heavily infected snails. Finally, it requires an experienced microscopist. Detection is usually feasible on day 8 onwards after exposure to miracidia and maintenance at 20°C. The monitoring of cercarial shedding is a very useful criterion which gives information on intermediate host capacity and pasture contamination. Histological methods allow the detection of the larval stages in the snail in a quantitative and qualitative way. The biochemical technique is not used anymore and will not be discussed further.

The different techniques based on the use of molecular biology were used mainly under experimental conditions. Indeed, very few studies assessed the level of infection under field conditions (Rognlie et al. 1996; Kaplan et al. 1997; Cucher et al. 2006; Schweizer et al. 2007) and in only two, a comparison was made with microscopic techniques (Kaplan et al. 1997; Cucher et al. 2006). Cucher and colleagues (2006) analyzed 240 snails naturally exposed to *F. hepatica* and found 17.5% and 51.3% of positive snails, respectively, by microscopy and PCR (this difference was statistically significant). Kaplan and colleagues (1997) compared the same techniques during the course of an experimental infection (take=90%): snails were examined on days 7, 14, 21, 28, and

42 post-infection. The DNA-based technique was more sensitive, especially at the beginning of the larval development.

Blotting is not acceptable for field use because it is a fairly complicated technique which implies the use of radiolabelled reporter molecules (Weiss 1995) or chemiluminescence. However, it allows the assessment of new sequences that can served to set up a PCR. Very often, PCR tends to be considered as the golden standard because of its high sensitivity and specificity (Barker 1994; Kaplan et al. 1997). However, a traditional PCR brings no information concerning the parasitic load in the snail and metacercarial production. Additionally, PCR does not give any information about the viability of the parasite. Consequently, a positive PCR signal in a given snail species does not mean necessarily that this species is able to sustain the whole parasite cycle leading to cercarial shedding. Real time PCR can give very accurate data concerning the intensity of infection. However, this is an expensive technique so that snail dissection or histological examination can accurately address this point. The choice of a technique must also take into consideration its cost and easiness and large differences can be noticed (Cancrini and Iori 2004).

It is important to point out that, at the time being, there is not a single technique which is simple, robust, reproducible and cheap enough for a field use. As PCR detects accurately parasite invasion and microscopic examination reveals successful infections in the snail host, both techniques could be used together to achieve a more comprehensive understanding of the epidemiological situation in a given area and to assess the capacity of different intermediate host to sustain larval development (Hamburger et al. 2004; Cucher et al. 2006).

References

- Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss G, Cabaret J (1999) Infection of *Lymnaea truncatula* and *Lymnaea glabra* by *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi* in farms of central France. *Vet Res* 30:113–118
- Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss G (2000) A field study of natural infections in three freshwater snails with *Fasciola hepatica* and/or *Paramphistomum daubneyi* in central France. *J Helminthol* 74:189–194
- Audousset JC, Rondelaud D, Dreyfuss G, Vareille-Morel C (1989) *Les émissions cercariennes de Fasciola hepatica* L. chez le mollusque *Lymnaea truncatula* Müller. A propos de quelques observations chronobiologiques. *Bull Soc Fr Parasitol* 7:217–224
- Barber IW (1962) The pathology produced in the snail *Lymnaea columella* Say, 1817, by the larval stages of *Fasciola hepatica* L., 1758. University of California, Berkeley
- Barker RH Jr. (1994) Use of PCR in the field. *Parasitol Today* 10:117–119
- Barry T, Rowel R, Gannon F (1990) A general method to generate DNA probes for microorganisms. *Biotechnology* 8:233–236
- Belfaiza M, Rondelaud D, Moncef M, Dreyfuss G (2004a) *Fasciola hepatica*: cercarial productivity of redial generations in long-surviving *Galba truncatula*. *J Helminthol* 78:115–120

- Belfaiza M, Rondelaud D, Moncef M, Dreyfuss G (2004b) *Fasciola hepatica*: the effect of food quality on the development of redial generations in *Galba truncatula* infected with allopatric miracidia. *Parasitol Res* 92:12–17
- Belfaiza M, Moncef M, Rondelaud D (2005) *Fasciola hepatica*: an unusual case of adaptation to a Moroccan population of *Galba truncatula*. *Parasitol Res* 95:374–378
- Boray JC (1978) The potential impact of exotic *Lymnaea* spp. on fascioliasis in Australasia. *Vet Parasitol* 4:127–141
- Calvopina M, Armijos RX, Marco JD, Uezato H, Kato H, Gomez EA, Korenaga M, Barroso PA, Mimori T, Cooper PJ, Nonaka S, Hashiguchi Y (2006) *Leishmania* isoenzyme polymorphisms in Ecuador: relationships with geographic distribution and clinical presentation. *BMC Infect Dis* 6:139
- Cancrini G, Iori A (2004) Traditional and innovative diagnostic tools: when and why they should be applied. *Parassitologia* 46:173–176
- Caron Y, Lasri S, Losson B (2007) *Fasciola hepatica*: an assessment on the vectorial capacity of *Radix labiata* and *R. balthica* commonly found in Belgium. *Vet Parasitol* 149:95–103
- Cucher MA, Carnevale S, Prepelitchi L, Labbe JH, Wisnivesky-Colli C (2006) PCR diagnosis of *Fasciola hepatica* in field-collected *Lymnaea columella* and *Lymnaea viatrix* snails. *Vet Parasitol* 137:74–82
- Dassler HG, Schmiedel T (1989) Ultrathin-layer starch gel electrophoresis: a method qualified to solve specific problems in enzyme analysis. *Pharmazie* 44:34–36
- Delves CJ, Goman M, Ridley RG, Matile H, Lensen TH, Ponnudurai T, Scaife JG (1989) Identification of *Plasmodium falciparum*-infected mosquitoes using a probe containing repetitive DNA. *Mol Biochem Parasitol* 32:105–112
- Dreyfuss G, Rondelaud D (1995) Comparative studies on the productivity of *Fasciola gigantica* and *F. hepatica* sporocysts in *Lymnaea tomentosa* that died after a cercarial shedding or without emission. *Parasitol Res* 81:531–536
- Dreyfuss G, Vignoles P, Rondelaud D (2005) *Fasciola hepatica*: epidemiological surveillance of natural watercress beds in central France. *Parasitol Res* 95:278–282
- Erhardová-Kotrlá B (1971) The occurrence of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) in Czechoslovakia. *Academia*, Prague
- Gasser RB (1999) PCR-based technology in veterinary parasitology. *Vet Parasitol* 84:229–258
- Graczyk TK, Fried B (1999) Development of *Fasciola hepatica* in the intermediate host. In: Dalton JP (ed) *Fasciolosis*. CABI, Wallingford, Oxon, pp 31–46
- Hamburger J, Hoffman O, Kariuki HC, Muchiri EM, Ouma JH, Koech DK, Sturrock RF, King CH (2004) Large-scale, polymerase chain reaction-based surveillance of *Schistosoma haematobium* DNA in snails from transmission sites in coastal Kenya: a new tool for studying the dynamics of snail infection. *Am J Trop Med Hyg* 71:765–773
- Heussler V, Kaufmann H, Strahm D, Liz J, Dobbelaere D (1993) DNA probes for the detection of *Fasciola hepatica* in snails. *Mol Cell Probes* 7:261–267
- Hodasi JK (1972) The output of cercariae of *Fasciola hepatica* by *Lymnaea truncatula* and the distribution of metacercariae on grass. *Parasitology* 64:53–60
- Hubscher U (1991) DNA diagnosis in veterinary medicine: II. Polymerase chain reaction (PCR). *Schweiz Arch Tierh.* 133:27–31
- Kaplan RM, Dame JB, Reddy GR, Courtney CH (1995) A repetitive DNA probe for the sensitive detection of *Fasciola hepatica* infected snails. *Int J Parasitol* 25:601–610
- Kaplan RM, Dame JB, Reddy GR, Courtney CH (1997) The prevalence of *Fasciola hepatica* in its snail intermediate host determined by DNA probe assay. *Int J Parasitol* 27:1585–1593
- Kendall SB, McCullough FS (1951) The emergence of cercariae of *Fasciola hepatica* from the snail *Limnaea truncatula*. *J Helminthol* 25:77–92
- Krämer F (1999) Eignung einer Gensonde zum nachweis Derentwicklungsstadien von *Fasciola hepatics* Linne 1758 im Zwischenwirt. Tierärztliche Hochschule, Hannover
- Krämer F, Schnieder T (1998) Sequence heterogeneity in a repetitive DNA element of *Fasciola*. *Int J Parasitol* 28:1923–1929
- Krämer F, Schnieder T (1999) Untersuchungen über den Zwischenwirt von *Fasciola hepatica* mittels einer DNA-Sonde zur Etablierung eines epidemiologischen Diagnostikverfahrens. *PraktTierarz* 80:520–529
- Kukla BA, Majiwa PA, Young JR, Moloo SK, ole-MoiYoi OK (1987) Use of species-specific DNA probes for detection and identification of trypanosome infection in tsetse flies. *Parasitology* 95:1–16
- Le Riche PD, Sewell MM (1977) Differentiation of *Taenia saginata* and *Taenia solium* by enzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 71:327–328
- Le Riche PD, Sewell MM (1978a) Identification of *Echinococcus granulosus* strains by enzyme electrophoresis. *Res Vet Sci* 25:247–248
- Le Riche PD, Sewell MM (1978b) Differentiation of taeniid cestodes by enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol* 8:479–483
- Magalhaes KG, Passos LK, Carvalho Odos S (2004) Detection of *Lymnaea columella* infection by *Fasciola hepatica* through Multiplex-PCR. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99:421–424
- Mage C, Bourgne H, Toullieu JM, Rondelaud D, Dreyfuss G (2002) *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: changes in prevalences of natural infections in cattle and in *Lymnaea truncatula* from central France over the past 12 years. *Vet Res* 33:439–447
- McLaughlin GL, Collins WE, Campbell GH (1987) Comparison of genomic, plasmid, synthetic, and combined DNA probes for detecting *Plasmodium falciparum* DNA. *J Clin Microbiol* 25:791–795
- Mostafa OM, Taha HA, Ramadan G (2003) Diagnosis of *Fasciola gigantica* in snail using the polymerase chain reaction (PCR) assay. *J Egypt Soc Parasitol* 33:733–742
- Moukrim A, Zekhnini A, Rondelaud D (1995) A comparative study of the shedding of cercariae of *Schistosoma haematobium* in newborn *Bulinus truncatus*. *Parasitol Res* 81:537–539
- Pointier JP, Coustau C, Rondelaud D, Theron A (2007) *Pseudosuccinea columella* (Say 1817) (Gastropoda, Lymnaeidae), snail host of *Fasciola hepatica*: first record for France in the wild. *Parasitol Res* 101:1389–1392
- Prichard R (1997) Application of molecular biology in veterinary parasitology. *Vet Parasitol* 71:155–175
- Rognlie MC, Dimke KL, Knapp SE (1994) Detection of *Fasciola hepatica* in infected intermediate hosts using RT-PCR. *J Parasitol* 80:748–755
- Rognlie MC, Dimke KL, Potts RS, Knapp SE (1996) Seasonal transmission of *Fasciola hepatica* in Montana, USA, with detection of infected intermediate hosts using a DNA-based assay. *Vet Parasitol* 65:297–305
- Rondelaud D, Barthe D (1980a) Données histopathologiques sur l'épithélium génital de *Lymnaea truncatula* Müller infestée par *Fasciola hepatica* L. *Bull Soc Zool Fr* 105:481–490
- Rondelaud D, Barthe D (1980b) *Fasciola hepatica* L.: les formes larvaires non évolutives ou en dégénérescence chez *Lymnaea truncatula* Müller. *Z Parasitenkd* 62:95–104
- Rondelaud D, Barthe D (1982) Les générations rédiennes de *Fasciola hepatica* L. chez *Lymnaea truncatula* Müller. A Propos des effets de plusieurs facteurs. *Ann Parasitol Hum Comp* 57:245–261
- Rondelaud D, Barthe D (1983) Les modifications structurales du rein chez *Lymnaea truncatula* Müller infestée par *Fasciola hepatica* L. *Ann Parasitol Hum Comp* 58:109–116
- Rondelaud D, Barthe D (1987) *Fasciola hepatica* L.: the productivity of a sporocyst as a function of the size of *Lymnaea truncatula* Muller. *Parasitol Res* 74:155–160

- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle-cell anemia. *Science* 230:1350–1354
- Schweizer G, Meli ML, Torgerson PR, Lutz H, Deplazes P, Braun U (2007) Prevalence of *Fasciola hepatica* in the intermediate host *Lymnaea truncatula* detected by real time TaqMan PCR in populations from 70 Swiss farms with cattle husbandry. *Vet Parasitol* 150:164–169
- Severson WE (1991) The development of a diagnostic assay for *Tritrichomonas foetus*. Montana State University, Bozeman
- Shubkin CD, White MW, Abrahamsen MS, Rognlie MC, Knapp SE (1992) A nucleic acid-based test for detection of *Fasciola hepatica*. *J Parasitol* 78:817–821
- Taylor EL (1965) Fascioliasis and the liver fluke. FAO agricultural studies edition. vol 64. FAO Agricultural Studies, Rome
- Torgerson P, Claxton J (1999) Epidemiology and control. In: Dalton JP (ed) Fasciolosis. CABI, Wallingford, Oxon, pp 113–149
- Van Aken D (1982) Detection of the larval stages of *Fasciola hepatica* in *Lymnaea truncatula* by enzyme electrophoresis. *Diergeneeskunde IvTGA*, ed. Instituut voor Tropische Geneeskunde Afdeling Diergeneeskunde, Antwerpen
- Van Aken D, Brandt J (1987) Preliminary observations on the detection of the larval stages of *Fasciola hepatica* in *Lymnaea truncatula* by enzyme-electrophoresis. *Ann Soc Belge Med Trop* 67:295–298
- Velusamy R, Singh BP, Raina OK (2004) Detection of *Fasciola gigantica* infection in snails by polymerase chain reaction. *Vet Parasitol* 120:85–90
- Vignoles P, Dreyfuss G, Rondelaud D (2002) Larval development of *Fasciola hepatica* in experimental infections: variations with populations of *Lymnaea truncatula*. *J Helminthol* 76:179–183
- Vignoles P, Rondelaud D, Dreyfuss G (2008) *Paramphistomum daubneyi*: production dynamics and infectivity of metacercariae originating from snails dissected at regular intervals. *J Helminthol* 82:175–180
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechnology* 10:506–513
- Waters AP, McCuthan TF (1990) Ribosomal RNA: nature's own polymerase-amplified target for diagnosis. *Parasitol Today* 6:56–59
- Webster P, Mansour TE, Bieber D (1989) Isolation of a female-specific, highly repeated *Schistosoma mansoni* DNA probe and its use in an assay of cercarial sex. *Mol Biochem Parasitol* 36:217–222
- Weiss JB (1995) DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clin Microbiol Rev* 8:113–130
- Yeo M, Lewis MD, Carrasco HJ, Acosta N, Llewellyn M, da Silva Valente SA, de Costa Valente V, de Arias AR, Miles MA (2007) Resolution of multiclonal infections of *Trypanosoma cruzi* from naturally infected triatomine bugs and from experimentally infected mice by direct plating on a sensitive solid medium. *Int J Parasitol* 37:111–120

COMPARAISON DES PERFORMANCES DE LA PCR ET DE LA TECHNIQUE D'ECRASEMENT DANS LA DETECTION DES FORMES LARVAIRES DE *FASCIOLA HEPATICA* CHEZ *GALBA TRUNCATULA* DANS LA REGION D'EL TARF : RESULTATS PRELIMINAIRES

Reçu le 05/10/2008 – Accepté le 25/04/2009

Résumé

Parmi les affections sévissant dans la région d'El Tarf, la fasciolose représente un problème pathologique majeur.

De nombreux outils de diagnostic sont utilisés pour dépister la maladie chez l'hôte définitif. Cependant les méthodes relatives à la détection de l'infestation naturelle chez le mollusque reposent essentiellement sur l'écrasement, la dissection microscopique, l'observation de l'émission cercarienne. Une méthode, relativement récente, plus spécifique et hautement sensible a été mise au point en utilisant une séquence d'ADN spécifique du génome de *Fasciola sp.*

L'essai a porté sur 59 mollusques prélevés dans la région d'El Tarf, et a permis de mettre en évidence une prévalence de 18,64% (11 des 59 mollusques analysés se sont révélés porteurs de parasite « *Fasciola sp.* »). Cette prévalence est extrêmement élevée par rapport aux données rapportées par la littérature.

Par ailleurs, un échantillon de 50 mollusques prélevé dans le même site à la même période et testé par la méthode d'écrasement n'a révélé qu'un taux de 10%.

Mots clés : *Fasciola hepatica*, *Galba truncatula*, PCR, écrasement.

Abstract

Among the affections prevailing in the area of EL Tarf, the fasciolosis represents a major pathological problem.

Many tools for diagnosis are used to detect the disease at the final host. However the methods relating to detection of natural infestation in mollusc rest primarily on crushing, microscopic dissection and the observation of the cercaria emission;

A new more specific and highly significant method was developed by using a specific sequence of AND of the genome of *Fasciola hepatica*.

The test related to 59 molluscs taken in the area of EL Tarf, and made it possible to highlight a prevalence of 18, 64% (11 of 59 molluscs analysed appeared carrying the larval forms of *Fasciola hepatica*). This prevalence is extremely high compared to the data brought back by the literature.

In addition, a sample of 50 molluscs taken in the same site at the same period and tested by the method of crushing revealed only one rate of 10% of positivity.

Key words: *Fasciola hepatica*, *Galba truncatula*, PCR, crushing.

S. RIGHI¹
Y. CARON²
B. LOSSON²
A. BENAKHLA¹

¹ Laboratoire de Parasitologie et des maladies parasitaires, Institut des Sciences Vétérinaires, Centre Universitaire d'EL Tarf, Algérie.

² Laboratoire de Parasitologie et des maladies parasitaires, faculté de Médecine Vétérinaire, Université de liège, Belgique.

ملخص

..... « la Fasciolose »

.....

..... « *Fasciola hepatica* »

..... « *Galba truncatula* » 59

%18.54 : « *F. hepatica* » PCR

..... 50

..... % 10

..... ; *Fasciola hepatica*, *Galba truncatula*, PCR:

La fasciolose constitue une dominante parasitaire chez les ruminants dans la région d'El Tarf [6]. En effet, cette dernière représente à l'instar des régions littorales d'Algérie un biotope favorable pour le développement de l'hôte intermédiaire (*Galba truncatula*) [5-8]. Seule la fasciolose à *F. hepatica* est présente en Algérie [7].

De nombreuses techniques sont utilisées pour détecter l'infestation du mollusque par les formes larvaires de différents trématodes; à titre indicatif citons : l'écrasement et/ou la dissection microscopique, l'observation de l'émission cercarienne [2] et l'histo-pathologie. Une technique plus récente faisant appel à la biologie moléculaire (PCR) a été mise au point et expérimentée en utilisant une séquence d'ADN spécifique du génome de *Fasciola* sp. [3]. Dans ce travail sont exposés les résultats préliminaires sur l'utilisation de cette technique pour la détection du parasite chez des mollusques et une comparaison de ses performances par rapport à la méthode d'écrasement.

MATERIELS ET METHODES

Les mollusques

Les échantillons de mollusques utilisés dans ces deux essais proviennent d'un lot de 230 spécimens (*G. truncatula*) prélevés le 14 avril 2007 dans des mares au niveau de Boutheldja, zone d'élevage bovin de type extensif. Cette dernière est située à 10 km d'El Tarf, région de l'extrême Nord Est algérien. Notons que pour l'identification nous nous sommes basé sur la clé de Rondelaud [9]. Un premier échantillon de 50 mollusques a été examiné au laboratoire de l'Institut des Sciences Vétérinaires (El Tarf) en utilisant la technique d'écrasement. Notons que pour le premier échantillon tous les mollusques ont été mesurés à l'aide de papier millimétré afin de comparer le taux d'infestation en fonction de la hauteur de la coquille. Le deuxième échantillon composé de 59 mollusques a été testé par PCR au sein du service de Parasitologie et Pathologie des Maladies Parasitaires, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège (Belgique).

Extraction d'ADN des mollusques

Les corps des 59 mollusques fixés dans l'éthanol à 70% ont été extraits, à l'aide d'une solution de Chelex (Biorad, Nazareth Eke) à 5% après broyage. Les échantillons ont ensuite été incubés une heure à 56°C et 30 minutes à 95°C, puis centrifugé à 14000 tr/min. Par la suite la concentration d'ADN a été mesurée au spectrophotomètre (Nanodrop) pour les différents tubes et une concentration moyenne de 400ng/µl a été obtenue.

Réaction de polymérisation en chaîne

Une PCR a été réalisée sur les mollusques à l'aide d'un Peltier Thermal Cycler et d'un kit Tac PCR Master Mix (Qiagen). Les amorces utilisées Fsh1 (sens) 5' GAT-CAA-TTC-ACC-CAT-TTC-CGT-TAG-TCC-TAC 3' et Fsh2 (antisens) 5' AAA-CTG-GGC-TTA-AAC-GGC-GTC-CTA-CGG-GCA 3' correspondent aux deux extrémités de

30 paires de bases (pb) d'un fragment d'ADN de 124 pb spécifique de *Fasciola* sp. De l'ADN de douve a été extrait avec la même procédure décrite ci-dessus et a fait office de témoin positif. Le mélange PCR est préparé selon les recommandations du fabricant avec 0,5 µl d'ADN pour un volume finale de 25 µl. Après les tubes ont été placés dans l'appareil avec le programme suivant : dénaturation initiale pendant 5 minutes à 95°C puis, pendant 40 cycles : dénaturation à 95°C durant une minute, hybridation à 56°C pendant une minute, et élongation à 72°C pendant une minute.

Electrophorèse

Après amplification, une électrophorèse a été réalisée sur un gel d'agarose à 2% préparé dans du tampon TAE contenant du bromure d'éthidium. Le rouge de crésol est utilisé pour visualiser le front de migration. L'électrophorèse est effectuée sous une tension de 90V (pendant : 1H30), puis le gel est visualisé sous UV et photographié (Figure 1).

Ecrasement des mollusques

Cinquante autres mollusques prélevés dans le même site et à la même période ont été analysés par écrasement. Il s'agit d'appliquer une pression ferme et progressive à un endroit bien précis de la coquille du mollusque (face supérieure du dernier tour de spire) pour libérer les formes larvaires du digène [1]. Les tissus sont observés sous une loupe binoculaire.

RESULTATS

Ecrasement

Cinq mollusques sur 50 (10%) contenaient des larves (sporocystes, rédies) de *Fasciola hepatica*. Parmi les mollusques infestés, il faut noter que le taux le plus élevé a été obtenu sur des mollusques dont la taille est comprise entre 7 et 8 mm (2/10), suivie de ceux dont la taille est comprise entre 6 et 7 mm (2/15). Les résultats sont consignés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Evaluation de l'infestation de *G. truncatula* prélevées dans la région de Boutheldja (El-Tarf) par les formes larvaires de *F. hepatica* selon méthode d'écrasement.

Taille	Nbre de <i>G truncatula</i> analysées	Nbre de <i>G truncatula</i> infestées
5-6 mm	21	1
6-7 mm	15	2
7-8 mm	10	2
8-9 mm	4	0
Total	50	5

La PCR

Sur les 59 mollusques analysés, 11 étaient positifs à *Fasciola hepatica* ce qui représente une prévalence de 18,64%. (fig. 1).

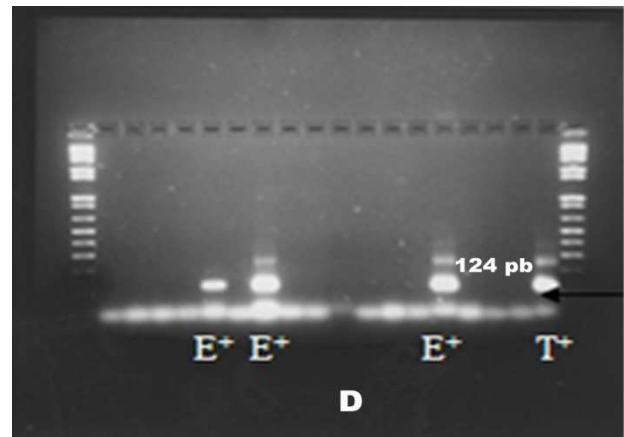
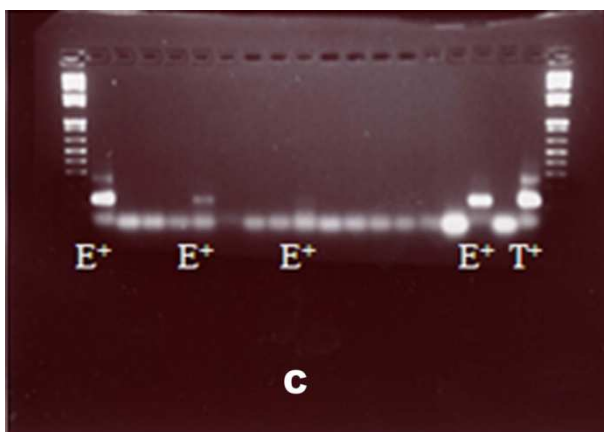
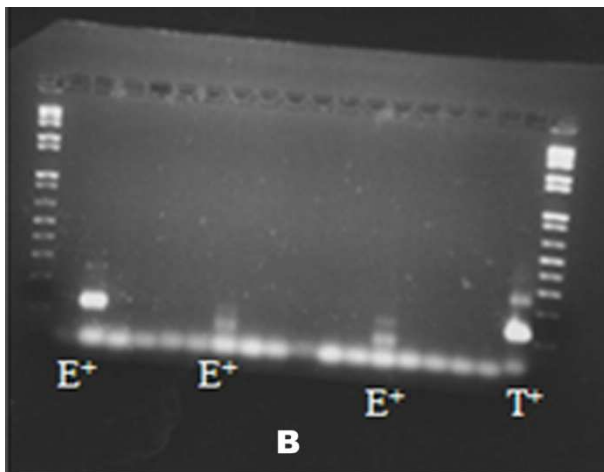
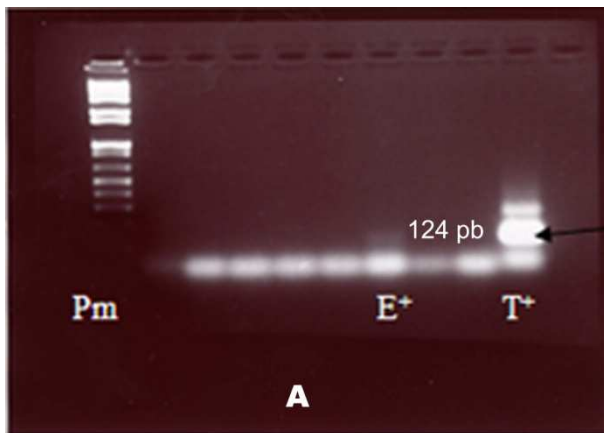


Figure 1 : Evaluation de l'infestation de *G. truncatula* prélevées dans la région de Boutheldja (El-Tarf) par *F. hepatica* selon la méthode PCR (gels d'électrophorèse obtenus suite aux PCR réalisées sur les 59 *G. truncatula* analysées), **A** : 1 *G. truncatula* positive ; **B** : 3 *G. truncatula* positives ; **C** : 4 *G. truncatula* positives ; **D** : 3 *G. truncatula* positives, Pm : Poids moléculaire ; E+ : échantillon positif ; T+ : Témoin positif.

DISCUSSION

A la lumière des résultats obtenus, il s'avère que la PCR est nettement plus sensible que la méthode d'écrasement, en effet le taux d'infestation des mollusques par *Fasciola hepatica* révélé par la PCR est de 18,64%. La méthode d'écrasement, quoique peu sensible (prévalence de 10%), peut être utilisée comme outil de diagnostic dans notre région car elle a l'avantage d'être rapide et peu onéreuse bien que peut être un peu laborieuse en routine.

Pour ce qui est de la prévalence en fonction de la taille, il apparaît globalement que plus les limnées sont grandes et plus elles sont susceptibles d'être infestées comme l'ont montré d'autres auteurs [4].

CONCLUSION

La région d'El Tarf, très favorable pour le développement de l'hôte intermédiaire constitue l'une des régions les plus hautement touchées par la fasciolose et cette prévalence élevée tient au fait que la région d'étude est une région humide par excellence avec un sous sol en grande partie argileux ce qui offre des conditions de vie plus appropriées pour le mollusque. De plus il faut noter aussi que la forte densité du cheptel bovin, la nature de l'élevage en grande partie de type extensif, l'application des traitements inappropriés ainsi que le rythme des traitements constituent des facteurs favorisant la grande fréquence de cette parasitose.

L'évaluation des performances, en matière de détection de formes larvaires de *F. hepatica*, par la PCR et la méthode d'écrasement met en évidence d'une part la grande sensibilité de la PCR par rapport aux méthodes microscopiques et d'autre part la possibilité d'analyser de grands échantillons. Toutefois son coût et son caractère laborieux restent les inconvénients majeurs.

REFERENCES

- [1]- Caron Y., Lassri S., Losson B., "*Fasciola hepatica*: An assessment on the vectorial capacity of *Radix labiata* and *R. balthica* commonly found in Belgium", *Vet. Parasitol.*, 149, (2007), pp. 95-103.
- [2]- Kaplan R. M., "Liver flukes in cattle: control based on seasonal transmission dynamics", *Comp. Cont. Ed. Pract. Vet.*, 16, (1994), pp. 687-693.
- [3]- Kaplan R. M., Dame J. B., Reddy G. R., Courtney C. H., "A repetitive DNA probe for the sensitive detection of *Fasciola hepatica* infected snails", *Int. J. parasitol.*, 25, (1995), pp. 601-610.
- [4]- Kaplan R. M., Dame J. B., Reddy G. R., Courtney C. H., "The prevalence of *Fasciola hepatica* in its snail intermediate host determined by DNA probe assay", *Int. J. Parasitol.*, 27, (1997), pp. 1585-1593.
- [5]- Mekroud A., Benakhla A., Belatrache C., Rondeleaud D., Dreyfus J., "First studies on the habitat of *Galba truncatula* the snail hote of *Fasciola hepatica* and the dynamics of snail populations in Northeastern Algeria", *Rev. Méd. Vét.*, 153, (2002), pp. 181-188.
- [6]- Mekroud A., Benakhla A., Rondeleaud D., Dreyfus J., "Preliminary studies on the prevalences of natural fasciolosis in cattle, sheep and the host snail (*Galba truncatula*) in Northeastern Algeria", *Parasitol. Res.*, 92, (2004a), pp. 502-507.
- [7]- Mekroud A., Contribution à l'étude de la distomatose à *Fasciola hepatica* linnaeus 1785, dans le Nord Est Algerien. Recherches sur les ruminants et le mollusque hôte, Thèse d'Etat en Sciences Vétérinaires, Université de Constantine, (2004b), Algérie, 299 p.
- [8]- Mekroud A., Titi A., Benakhla A., Vignole P., Rondeleaud D., "*Fasciola hepatica* : la sensibilité des *Galba truncatula* du nord est algérien à l'infestation expérimentale avec des miracidiums sympatriques", *Rev. Méd. Vét.*, 157, (2006), pp. 1-6.
- [9]- Rondelaud D. 1998. Etat provisoire des connaissances sur les mollusques Lymnaeidae et leur détermination en France. (En Ligne). Adresse Url :http://abela.Club.fr/articles/limnées/Limnées_de_la_Faune_de_France.html.

Towards assessing fine-scale indicators for the spatial transmission risk of *Fasciola hepatica* in cattle

Johannes Charlier¹, Sita Carolien Bennema¹, Yannick Caron², Michel Counotte¹, Els Ducheyne³, Guy Hendrickx³, Jozef Vercruyse¹

¹Department of Virology, Parasitology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, 3820 Merelbeke, Belgium; ²Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, 4000 Liège, Belgium; ³Avia-GIS, Risschotlei 33, 2980 Zoersel, Belgium

Abstract. In order to improve the spatial resolution of current risk maps for fasciolosis in cattle, more knowledge is needed with respect to farm-level factors that determine infection risk. In this study, we visited 39 dairy farms within a predefined low- and high-risk area for fasciolosis in Belgium and assessed their infection status by an indirect bulk tank milk enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Management factors were collected and all pastured lands of the farms were visited to identify and georeference potential snail habitats. The habitats were visually characterised, investigated for the presence of the intermediate host snails of *Fasciola hepatica* (i.e. *Galba truncatula* and *Radix* spp.) and used in a geographical information system (GIS) to construct overlays including information on soil and hydrology. A linear regression model was used to evaluate associations between bulk tank milk ELISA results and farm level management and habitat factors. A logistic, mixed model was used to identify possible risk factors for the presence of intermediate host snails on a potential habitat. Potential snail habitats were found in 35 out of 39 farms. A total of 87 potential habitats were identified and on 29% of these, intermediate host snails were found. The number of potential habitats, the presence of snails, drainage of pastures, month of turnout of the cows, stocking rate, type of watering place and risk area were significantly associated with the bulk tank milk ELISA result and explained 85% of the observed variation. Intermediate host snails were more likely to be present with increasing surface of the potential habitat and on loamy soils. This study confirms the importance of farm management factors in the infection risk for *F. hepatica* in cattle and highlights that the combination of management factors with characterization of snail habitats is a powerful means to predict the infection risk with *F. hepatica* at the individual farm level. Further research is needed to investigate how this knowledge can be incorporated in nation-wide spatial distribution models of the parasite.

Keywords: fasciolosis, *Fasciola hepatica*, *Galba truncatula*, cattle, epidemiology, geographical information system, Belgium.

Introduction

The liver fluke *Fasciola hepatica* is a trematode parasite with an economic impact on livestock production worldwide. In northern Belgium (Flanders), the yearly cost of infections with this parasite in dairy cattle has been estimated at € 8.2 million or € 30 per adult dairy cow present in the population (Charlier et al., 2007, 2009). Because of the dependence on climatic and environmental conditions of both the intermediate hosts and the free-living stages of *F. hepatica*, there is an important spatial component in the epidemiology of the disease and spatial distribution models have been developed for several regions across the world (Malone and Zukowski, 1992; Yilma and Malone,

1998; Cringoli et al., 2002; Tum et al., 2004; Durr et al., 2005; Fuentes, 2006; Rapsch et al., 2008; Dutra et al., 2010; McCann et al., 2010; Bennema et al., 2011).

Generally, validation of these models with field observations has shown that they are capable of identifying regions at high risk for *F. hepatica* presence, and hence may act as a means to increase awareness of the disease among animal health workers and farmers. However, thus far, in most studies, the risk areas comprise large regions (e.g. study of McCann et al., 2010 where the risk has been estimated per postcode area with a mean surface of 2,000 km²) and it is known that, both within low or high risk areas, *F. hepatica*-infected and uninfected farms can co-exist next to each other, depending on the presence/absence of suitable habitats for the principal intermediate host *Galba truncatula* and local farm management practices (Bennema et al., 2009). Therefore, to improve the usefulness of risk maps for fasciolosis, we ought to define the risk for infection on a finer scale, with the ultimate aim of providing farm-specific risk. The first attempt, to our knowledge, to address this issue was made by

Corresponding author:

Johannes Charlier

Department of Virology, Parasitology and Immunology

Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University

Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke, Belgium

Tel. + 32 9 264 7400; Fax: +32 9 264 7496

E-mail: johannes.charlier@ugent.be

Zukowski et al. (1991, 1993), who combined habitat mapping, soil characteristics and animal stocking rate using a geographical information system (GIS) to estimate the disease risk at the farm level in the southern part of the United States of America. Since then, however, no further progress has been achieved in this field.

The aim of this study was to explore the combined use of habitat characterization with pasture management factors to explain differing levels of exposure to *F. hepatica* of farms within a common risk area for fasciolosis in Belgium.

Materials and methods

Farm selection and collection of management information

Significant clustering, based on bulk tank milk enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) results, has been observed in the levels of exposure to *F. hepatica* in dairy farms in Flanders, Belgium (Bennema et al., 2009). A cluster with high and another one with low seroprevalence of *F. hepatica* were selected for this study and the locations from where they came were defined as a high and low risk area, respectively. Within each risk area, the farms were randomised, stratified by bulk tank milk *F. hepatica* ELISA result. The farm owners were contacted by phone until in each area 20 farms had been found that would participate in the study. In the high risk area, however, only 19 farms could be visited, resulting in a total of 39 farms in the study.

The farms were visited between 10 September and 31 October, 2008. During the visit, information was collected through a questionnaire asking for herd size (number of adult dairy cows), farm type (dairy only *versus* dairy and beef), average milk production per year, pasture management practices (i.e. amount of access to pasture, grazing time per day, month of turnout on pasture, month of stabling, grazing together of dry cows with replacement animals, average number of cows grazing per ha on a parcel, whether pastures were mowed, kind of watering place, drainage of pastures, spreading manure on pasture, use of molluscicides on pasture) and treatment with anthelmintics. In case a question could not be answered by the farmer or was not applicable, it was left blank. In addition, the farmer was asked to locate all his/her pastured land on the ground plan of his/her property for subsequent inspection.

Identification and characterization of possible snail habitats

All pastured lands were visited and potential snail habitats were georeferenced. A possible snail habitat was defined as a visible humid area on the pasture that could be (i) humid on the time of the visit or (ii) considered to remain humid during prolonged periods based on the location and vegetation. Additional registered information included size (<10 m², 10-20 m², >20 m²), type of habitat (diffuse humid area or border of drainage ditch, pool or water trough) and whether it was located on a pasture for adult cows or heifers.

*Snail collection and determination of infection status with *F. hepatica**

Thirty minutes were spent at potential habitats to search for snails and to collect them. The snail genus was determined in the laboratory based on size and morphology of the shell according to Frömring (1956) and Nisters (1999). Only snails identified as *G. truncatula* or *Radix* spp. were considered and counted as they were the only potential intermediate host snails for *F. hepatica* in the area. *G. truncatula* is the main intermediate host of *F. hepatica* in Europe, but *Radix* spp. may act as incidental intermediate hosts (Caron et al., 2007; Relf et al., 2009). The presence of *Fasciola* spp. DNA in the collected snails was assessed by polymerase chain reaction (PCR) amplification of a 124 bp *Fasciola* spp.-specific probe as previously described by Kaplan et al. (1995) and Caron et al. (2007). The sensitivity and specificity of this technique have been estimated at 99% and 100%, respectively (Kaplan et al., 1995).

Construction of a GIS

The potential habitats were overlaid onto a GIS soil map of Flanders (OC GIS Vlaanderen, Belgium) and a Flemish hydrological map (OC GIS Vlaanderen, Belgium). The soil texture and drainage classification of the habitats were deducted from the former map, while the latter made it possible to calculate the distance to the nearest water body with a precision of 50 m. The Belgian drainage classification system (Van Ranst and Sys, 2000) contains nine classes of natural drainage: a-b signifying (very) dry soils, c-d signifying moderately dry/humid soils and e-i, which are increasingly humid soils. The bulk-tank milk *F. hepatica* ELISA results, presence of snails overall, as well as presence of *F. hepatica*-infected snails, were included

in additional layers. GIS was constructed in Manifold System 7x Professional Edition and the habitats were plotted on a ecological map created for this purpose.

Statistical analysis

Two analyses were conducted to investigate the associations of management and habitat factors with (i) the bulk tank milk ELISA result of the farm (model 1); and (ii) the presence of an intermediate host on the farm (model 2). Model 1 was based on multivariable linear regression with a backward stepwise selection procedure (variables were retained only when their significance level was <0.05). The bulk tank milk ELISA result was the dependent variable and farm level variables concerning management or potential snail habitats were evaluated as independent variables. Because samplings were done in two distinct geographical zones (risk areas), observations within each zone could not be assumed to be independent from each other. Therefore, "risk area" was included to correct for possible bias introduced by the selection procedure. Once significant main effects were identified, all possible 2-way interactions were evaluated. Heteroscedasticity was evaluated by Levene's test for homogeneity of variances and a plot of the standardised residuals *versus* predicted values. Model 2 was based on a logistic mixed model where the presence of the intermediate host (yes/no) was the outcome variable and habitat factors were evaluated as fixed factors. Because more than one potential habitat was present for most farms, it was defined as a random effect. Only variables that were univariately associated with the outcome variable at a significance level of $\alpha = 0.20$ were considered for inclusion in the multivariate model. The variable soil type was re-categorized from the Belgian classification system (Van Ranst and Sys, 2000) into a 2-category variable: "loam", i.e. classification "A" according to the Belgian classification system) *versus* "no loam" that includes all other soil types. Model 1 was conducted in SPSS 16.0 (SPSS Inc.; 2008; www.spss.com), and model 2 was conducted in MLwiN 2.19 (Centre for Multilevel Modelling, University of Bristol; www.cmm.bristol.ac.uk/MLwiN).

Results

Factors related to farm management

The average [minimum, maximum] response per question in the questionnaire was 95% [69%, 100%]. The average [minimum, maximum] herd size was 33 [14, 65] adult dairy cows. In all farms, cows and

heifers had access to pasture, except for one farm where the cows were kept in the stable all year round. The grazing season typically started in April (76% of farms) and ended in October or November (47% in each month). Dry cows grazed on the pastures of replacement stock in 41% of the farms. Stocking rate (number of cows per ha on a parcel) was <5 , 5-10 or >10 on 54%, 40% and 6% of the farms, respectively. Cow pastures were completely or partially mowed by 66% of the farms. All types of watering were used, but most applied a pump (45%) or an open tub (40%). The pastures were completely or partially drained for 16% and 32% of the farms, respectively. In most of the farms (70%) pools or brooks were not fenced off and could be reached by the animals. Molluscicides (calcium cyanamide) or regular flukicide treatment were applied for 3% and 5% of the farms, respectively.

Snail habitats

Potential snail habitats were present in 35 out of the 39 farms. A total of 87 potential habitats were identified but intermediate host snails were only found in 25 (29%) of them. The total number of collected snails was 432 (380 *G. truncatula* and 52 *Radix* spp.) and *F. hepatica* DNA was only found in 3% ($n = 13$) of them (and only in *G. truncatula*).

All potential habitats were located at a distance of less than 900 m from a water stream: for 34% of the habitats this distance was ≤ 50 m and for 64% ≤ 200 m. Although a humid area around a water trough was also considered as a potential habitat, intermediate host snails were not found in any of them. Potential habitats were only found where the drainage classification of the soil indicated moderately humid to very wet soil (classification "c" or higher), though this variable was not available in every location. The further characterization of the potential habitats is described in Table 1. Proximity to water bodies and location in wet soils with poor drainage capacities is illustrated in Figure 1.

Factors associated with levels of exposure to *F. hepatica*

The results of the multivariable regression model to evaluate associations between farm level factors with regard to management and potential habitats are displayed in Table 2. Several factors were significantly associated with the level of exposure of the farm as assessed by *F. hepatica* bulk tank ELISA and explained 85% of the observed variation. The level of exposure

Table 1. Characterization of 87 potential habitats for the intermediate host snails of *F. hepatica* found in 39 Flemish dairy farms.

Property	Number of habitats
Surface	
<10 m ²	25
10-20 m ²	38
>20 m ²	24
Type of pasture	
Heifer	52
Cow	35
Drainage classification	
Not defined	17
Dry soils (a, b)	0
Moderately humid soils (c, d)	34
Very humid soils (e, f, g, h, i)	36
Distance to water stream	
≤50 m	30
51-200 m	26
201-900 m	31
Type of habitat	
Diffuse humid area	42
Drainage ditch/brook	22
Pool	14
Water trough	9
Soil type	
Non defined	16
Loam (A)	27
Clay (E)	7
Sandy loam (L, P)	31
Heavy clay (U)	6

increased with higher number of potential habitats and presence of snails on these habitats during the farm visit. Presence of snails was the most significant factor in predicting the level of exposure and explained by itself 24% of the observed variation. The next most significant factor was the watering place with evidence of lower levels of exposure when water was provided by a nipple or open tub instead of a pump or in the form of pool, pond or brook. Drainage of pastures, turnout after the beginning of May and stocking rate between 5 to 10 animals were also associated with lower levels of exposure. Finally, the risk area was a significant factor, suggesting that unmeasured and regionally dependent factors accounted for a significant part of the observed variation.

Factors associated with presence of intermediate host snails

As shown in Table 3, two factors indicated a significantly higher risk for the presence of *G. truncatula* and *Radix* spp. in the potential habitats: the habitat size (larger habitats meaning a higher risk for presence of snails) and the soil type (loam soils having higher risk than no-loam soils). No significant associations were found for type of pasture, presence of streaming water, distance to water, drainage classification or type of habitat.

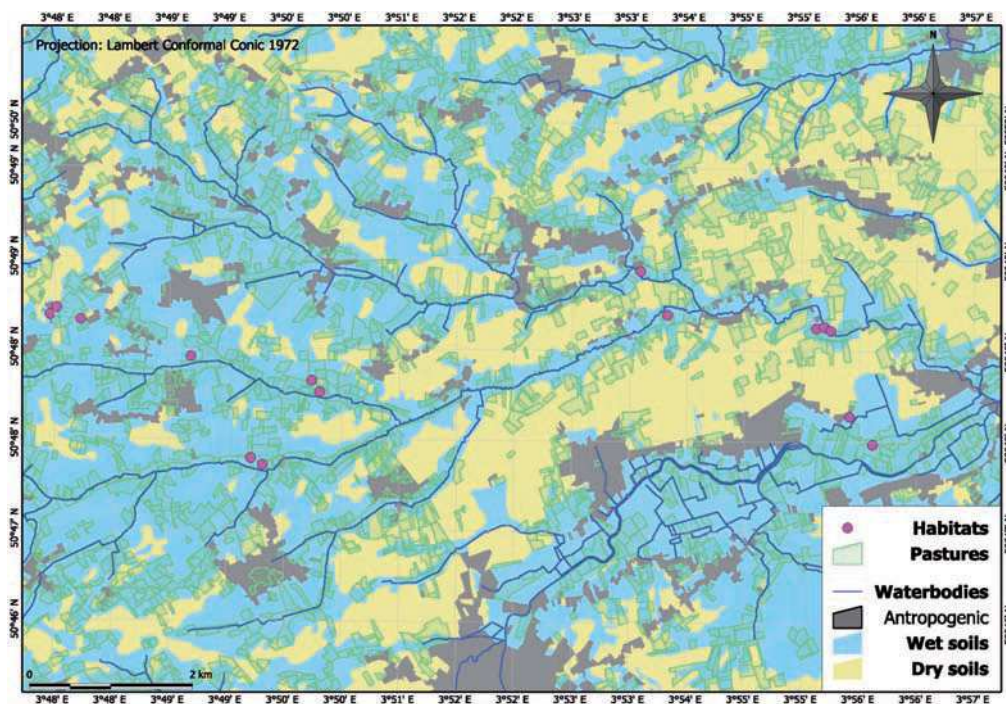


Fig. 1. Map of identified, potential habitats for *G. truncatula* illustrating their proximity to water bodies and preferential location in soils of poor drainage capacity. These soils, marked as blue, can be any of the humid/wet types classified by the Belgian drainage system as “c” through to “i”. The soils marked as dry belong to the “a” or “b” classifications.

Table 2. A multivariable regression model to evaluate associations between farm level factors concerning management and potential habitats for the intermediate host snail and *F. hepatica* bulk tank ELISA results ($N = 34$ dairy farms, $R^2 = 0.85$).

Variable	B	SE	P value
Intercept	0.772	0.181	<0.001
Risk area			0.033
High risk	-	-	
Low risk	0.178	0.078	
No. of potential habitats	0.080	0.025	0.004
Snail presence			<0.001
No	-	-	
Yes	0.390	0.086	
Drained pastures			0.023
Entirely	-	-	
Partly (<80%)	0.207	0.112	
No	0.290	0.097	
Month of turn out			0.006
March	-	-	
April	0.106	0.183	
May	-0.185	0.193	
Average no. of cows on parcel per ha			0.015
<5	-	-	
5-10	-0.208	0.067	
>10	0.047	0.170	
Watering place			0.030
Pump on pasture	-	-	
Pool/pond/brook	0.178	0.139	
Nipple	-0.292	0.124	
Open tub	-0.141	0.071	

SE, standard error

Discussion

This study indicates that combined assessment of applied management and the presence of the intermediate host snail is a powerful means to predict the *F. hepatica* infection risk at the farm level.

The importance of management is in agreement with the results of Bennema et al. (2011), as these authors showed that management variables explained the variation in the spatial distribution of *F. hepatica* in dairy farms better than meteorological or environmental variables. Although most of the identified associations

with factors related to management reflect common sense and are already considered risk factors for fasciolosis, few published data on this subject are available and it is only now that their impact is becoming clear.

Our results suggest that mapping potential habitats and assessing their suitability for intermediate host snails can significantly improve the accuracy and spatial resolution of distribution models for *F. hepatica*. This underlines the need for further research to investigate whether this can be achieved by high-resolution remote sensing techniques or whether physical inspection of farm premises will remain necessary (Gomez-

Table 3. A logistic mixed model to identify predictors for the presence of the intermediate host snails in 87 potential habitats in 39 Flemish dairy farms.

Variable	Odds ratio	95% CI	P value
Fixed effects:			
Surface (baseline <10 m ²)			0.011
10-20 m ²	13.4	1.4-129.1	
>20 m ²	34.1	3.3-357.8	
Soil type (loam versus no loam)	4.3	1.2-16.0	0.029
Random farm effect (variance ± SE)	0.869 ± 0.805		

CI, confidence interval; SE, standard error

Rodriguez et al., 2008). Further characterization of the habitats and of the factors that determine their suitability for the intermediate host snails (Schweizer et al., 2007; Rondelaud et al., 2009; Relf et al., 2011) are indispensable in this respect. The absence of any potential habitats in soils classified as “dry” (score a or b), or around water troughs and their location in parallel with water streams, was in our opinion remarkable (Fig. 1). However, the small scale of the survey and the fact that our observations were based on a single farm visit preclude any firm conclusions to be drawn.

This survey focused on *F. hepatica* transmission risk in cattle and infection of humans with this parasite is extremely rare in Belgium. Nonetheless, insights from this study could be used to improve mapping of *F. hepatica* in humans in endemic regions because cattle likely play a major role in the transmission risk to humans (Fuentes, 2006; Nguyen et al., 2010).

The prevalence of *F. hepatica* in the retrieved snails (3%) was lower than the 7% recently reported from Switzerland where a PCR assay was used (Schweizer et al., 2007) and particularly the high level (27%) from the Poland (Kozak and Wedrychowicz, 2010). This may be due to the period of sampling in our study, which was later in the year than the study of Kozak and Wedrychowicz (2010) and may be considered sub-optimal for retrieval of infected snails. However, although the monitoring of snail infection can be a valuable tool for epidemiological studies (Kozak and Wedrychowicz, 2010), our results suggest that, in Belgium, it is not necessary to assess the risk of infection of the animals: once the intermediate host has been found and is combined with a type of management that favours transmission, the risk for infection of the animals is obvious, irrespective whether *F. hepatica* infection of the snail can be demonstrated or not.

Acknowledgements

The authors would like to thank all 39 farmers for their participation in this survey. This work was supported by the agency for Innovation by Science and Technology of Flanders (IWT) (project no. OZM090697).

References

- Bennema S, Vercruyse J, Claerebout E, Schnieder T, Strube C, Ducheyne E, Hendrickx G, Charlier J, 2009. The use of bulk-tank milk ELISAs to study the spatial distribution of *Fasciola hepatica*, *Ostertagia ostertagi* and *Dictyocaulus viviparus* in Flanders (Belgium). *Vet Parasitol* 165, 51-57.
- Bennema SC, Ducheyne E, Vercruyse J, Hendrickx G, Claerebout E, Charlier J, 2011. Relative importance of management, meteorological and environmental factors in the spatial distribution of *Fasciola hepatica* in dairy cattle in a temperate climate zone. *Int J Parasitol* 41, 225-233.
- Caron Y, Lasri S, Losson B, 2007. *Fasciola hepatica*: an assessment on the vectorial capacity of *Radix labiata* and *R. balthica* commonly found in Belgium. *Vet Parasitol* 149, 95-103.
- Charlier J, Duchateau L, Claerebout E, Williams D, Vercruyse J, 2007. Associations between anti-*Fasciola hepatica* antibody levels in bulk-tank milk samples and production parameters in dairy herds. *Prev Vet Med* 78, 57-66.
- Charlier J, Sanders M, Vercruyse J, 2009. The direct costs of infections with gastrointestinal nematodes and liver fluke in the Flemish dairy population. *Vlaams Diergen Tijds* 78, 196-200.
- Cringoli G, Rinaldi L, Veneziano V, Capelli G, Malone JB, 2002. A cross-sectional coprological survey of liver flukes in cattle and sheep from an area of the southern Italian Apennines. *Vet Parasitol* 108, 137-143.
- Durr PA, Tait N, Lawson AB, 2005. Bayesian hierarchical modelling to enhance the epidemiological value of abattoir surveys for bovine fasciolosis. *Prev Vet Med* 71, 157-172.
- Dutra LH, Molento MB, Naumann CRC, Biondo AW, Fortes FS, Savio D, Malone JB, 2010. Mapping risk of bovine fasciolosis in the south of Brazil using geographic information systems. *Vet Parasitol* 169, 76-81.
- Frömming E, 1956. *Biologie der mitteleuropäischen Süßwasserschnecken*, Duncker & Humblot, Berlin, Germany, 313 pp.
- Fuentes MV, 2006. Remote sensing and climate data as a key for understanding fasciolosis transmission in the Andes: review and update of an ongoing interdisciplinary project. *Geospat Health* 1, 59-70.
- Gomez-Rodriguez G, Bustamante J, Koponen S, Diaz-Paniagua C, 2008. High-resolution remote-sensing data in amphibian studies: identification of breeding sites and contribution to habitat models. *Herpetol J* 18, 103-113.
- Kaplan RM, Dame JB, Reddy GR, Courtney CH, 1995. A repetitive DNA probe for the sensitive detection of *Fasciola hepatica* infected snails. *Int J Parasitol* 25, 601-610.
- Kozak M, Wedrychowicz H, 2010. The performance of a PCR assay for field studies on the prevalence of *Fasciola hepatica* infection in *Galba truncatula* intermediate host snails. *Vet Parasitol* 168, 25-30.
- Malone JB, Zukowski SH, 1992. Geographic models and control of cattle liver flukes in the southern USA. *Parasitol Today* 8, 266-270.
- McCann CM, Baylis M, Williams DJL, 2010. The development of linear regression models using environmental variables to explain the spatial distribution of *Fasciola hepatica* infection

- in dairy herds in England and Wales. *Int J Parasitol* 40, 1021-1028.
- Nguyen TG, Le TH, Dao TH, Tran TL, Praet N, Speybrouck N, Vercruyse J, Dorny P, 2011. Bovine fasciolosis in the human fasciolosis hyperendemic Binh Dinh province in central Vietnam. *Acta Trop* 117, 19-22.
- Nisters H, 1999. Freshwater shells. Visited on: <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html>? <http://www.microscopyuk.org.uk/mag/artsep99/hnshell3.html> (accessed on October 2008)
- Rapsch C, Dahinden T, Heinzmann D, Torgerson PR, Braun U, Deplazes P, Hurni L, Bar H, Knubben-Schweizer G, 2008. An interactive map to assess the potential spread of *Lymnaea truncatula* and the free-living stages of *Fasciola hepatica* in Switzerland. *Vet Parasitol* 154, 242-249.
- Relf V, Good B, Hanrahan JP, McCarthy E, Forbes AB, deWaal T, 2011. Temporal studies on *Fasciola hepatica* in *Galba truncatula* in the west of Ireland. *Vet Parasitol* 175, 287-292.
- Relf V, Good B, McCarthy E, de Waal T, 2009. Evidence of *Fasciola hepatica* infection in *Radix peregra* and a mollusc of the family of Succineidae in Ireland. *Vet Parasitol* 163, 152-155.
- Rondelaud D, Hourdin P, Vignoles P, Dreyfuss G, 2009. *Galba truncatula* (Gastropoda, Lymnaeidae): first findings on populations showing a single annual generation in lowland zones of central France. *Ann Limnol – Int J Lim* 45, 51-54.
- Schweizer G, Meli ML, Torgerson PR, Lutz H, Deplazes P, Braun U, 2007. Prevalence of *Fasciola hepatica* in the intermediate host *Lymnaea truncatula* detected by real time TaqMan PCR in populations from 70 Swiss farms with cattle husbandry. *Vet Parasitol* 150, 164-169.
- Tum S, Puotinen ML, Copeman DB, 2004. A geographic information systems model for mapping risk of fasciolosis in cattle and buffaloes in Cambodia. *Vet Parasitol* 122, 141-149.
- Van Ranst E, Sys C, 2000. Eénduidige legende voor de digitale bodemkaart van Vlaanderen (schaal 1:20 000). Laboratorium voor Bodemkunde, Ghent University, Belgium, 361 pp.
- Yilma JM, Malone JB, 1998. A geographic information system forecast model for strategic control of fasciolosis in Ethiopia. *Vet Parasitol* 78, 103-127.
- Zukowski SH, Hill JM, Jones FW, Malone JB, 1991. Development and validation of a soil-based geographic information-system model of habitat of *Fossaria bulimoides*, a snail intermediate host of *Fasciola hepatica*. *Prev Vet Med* 11, 221-227.
- Zukowski SH, Wilkerson GW, Malone JB, 1993. Fasciolosis in cattle in Louisiana. II. Development of a system to use soil maps in a geographic information system to estimate disease risk on Louisiana coastal marsh rangeland. *Vet Parasitol* 47, 51-65.

Morphological and Molecular Characterization of Lymnaeid Snails and Their Potential Role in Transmission of *Fasciola* spp. in Vietnam

Bui Thi Dung^{1,3*}, Pham Ngoc Doanh¹, Dang Tat The², Ho Thi Loan², Bertrand Losson³ and Yannick Caron³

¹Department of Parasitology, Institute of Ecology and Biological Resources, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Ha Noi, Vietnam; ²Department of Molecular Systematic and Conservation Genetic, Institute of Ecology and Biological Resources, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Ha Noi, Vietnam; ³Research Unit in Parasitology and Parasitic Diseases, Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Boulevard de Colonter 20, 4000 Liège, Belgium

Abstract: Freshwater snails of the family Lymnaeidae play an important role in the transmission of fascioliasis worldwide. In Vietnam, 2 common lymnaeid species, *Lymnaea swinhoei* and *Lymnaea viridis*, can be recognized on the basis of morphology, and a third species, *Lymnaea* sp., is known to exist. Recent studies have raised controversy about their role in transmission of *Fasciola* spp. because of confusion in identification of the snail hosts. The aim of this study is, therefore, to clarify the identities of lymnaeid snails in Vietnam by a combination of morphological and molecular approaches. The molecular analyses using the second internal transcribed spacer (ITS2) of the nuclear ribosomal DNA clearly showed that lymnaeids in Vietnam include 3 species, *Austropeplea viridis* (morphologically identified as *L. viridis*), *Radix auricularia* (morphologically identified as *L. swinhoei*) and *Radix rubiginosa* (morphologically identified as *Lymnaea* sp.). *R. rubiginosa* is a new record for Vietnam. Among them, only *A. viridis* was found to be infected with *Fasciola* spp. These results provide a new insight into lymnaeid snails in Vietnam. Identification of lymnaeid snails in Vietnam and their role in the liver fluke transmission should be further investigated.

Key words: *Fasciola*, *Austropeplea viridis*, *Radix auricularia*, *Radix rubiginosa*, Vietnam

INTRODUCTION

Fascioliasis is a worldwide parasitic disease caused by *Fasciola gigantica* and *Fasciola hepatica*. The latter species is common in temperate zones especially in Europe, the Americas, and Australia, whereas the former is the most prevalent species in tropical regions of Africa and Asia [1]. In Vietnam, human and animal fascioliasis has drawn a special interest. Indeed, the prevalence of human fascioliasis was found to be on the rise in the country. About 10,000 cases were detected in central Vietnam in 2011 alone [2]. Based on molecular data, *F. gigantica* and hybrid forms were identified.

The Lymnaeidae are one of the most widespread groups of freshwater snails and many of them act as intermediate hosts

of important digenetic trematodes that infect humans or livestock [3]. The correct taxonomic classification of these snails solely based on morphological characteristics was not always possible and the nomenclature of Lymnaeidae is extremely confused [4,5]. Additionally, environmental conditions are responsible for morphological variation which further complicates identification [5,6]. There are few studies dealing with morphology and phylogenetics of lymnaeids in Asia. Using morphological criteria, Thanh [7] recognized 2 common lymnaeid species, *Lymnaea viridis* and *Lymnaea swinhoei*, in northern Vietnam in 1980. Currently, the former is generally referred to as *Austropeplea viridis* and the second as *Radix auricularia* [8], and these are the names we shall use throughout this paper. An additional species, *Lymnaea* sp., was identified in Vietnam by Doanh [9] in 2012. Two species, *A. viridis* (as *L. viridis*) and *R. auricularia* (as *L. swinhoei*), were reported by some authors to act as intermediate hosts of *Fasciola* spp. in Vietnam [10,11]. Others indicated that only 1 of these species was an intermediate host [9, 12]. In Taiwan, China, Japan, and Thailand, *R. rubiginosa*, *R. auricularia*, and *A. viridis* have been reported as hosts

•Received 18 May 2013, revised 14 June 2013, accepted 11 October 2013.

*Corresponding author (dung_parasitologist@yahoo.com)

© 2013, Korean Society for Parasitology and Tropical Medicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

for *Fasciola* spp. [13-15]. Previous to this study, no analysis of molecular sequence data from lymnaeids had been done in Vietnam. Therefore, the aim of this study is to use both molecular and morphological criteria in order to identify the potential vectors of *Fasciola* spp. in the country.

MATERIALS AND METHODS

Snail sampling

Lymnaeid snails were collected in a variety of water bodies in 3 localities of Vietnam representing major climatic types: Thuong Tin district, Ha Noi capital (N: 20° 84' 75''; E: 105° 90' 87'' - northern part); An Nhon district, Binh Dinh Province (N: 13° 94' 47''; E: 109° 07' 96'' - central part); and Tieu Can district, Tra Vinh Province (N: 9° 80' 77''; E: 106° 18' 55'' - southern part) (Fig. 1). Individual snails were morphologically sorted out, then examined for the presence of *Fasciola* spp. larval stages by stereomicroscopy. Representatives of each morphological group were individually fixed in 100% ethanol for subsequent molecular identification.

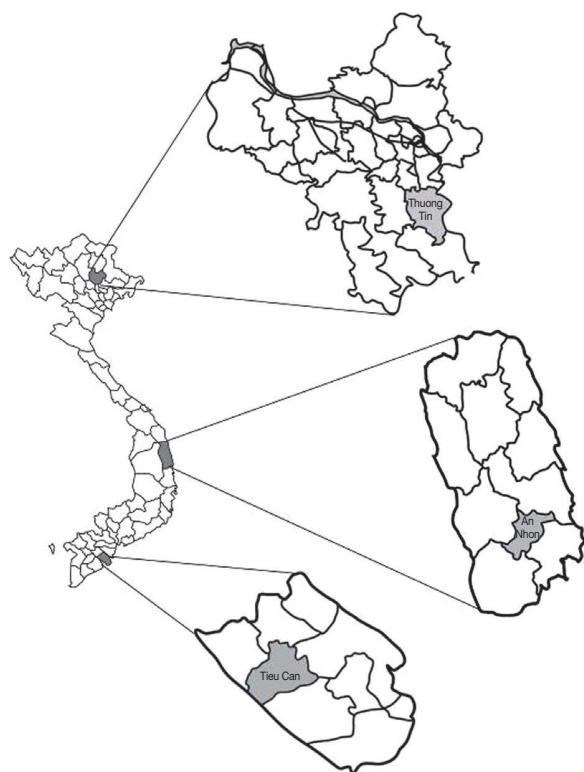


Fig. 1. Map of sampling locations (Thuong Tin districts, Ha Noi capital; An Nhon, BinhDinh Province; Tieu Can district, TraVinh Province)

Morphological examination

Snails were killed by immersion in hot water (70°C) for 15 sec and then transferred to water at room temperature. Stereomicroscopic examination was performed using an Olympus SZ51, SZX-ILL-B2 200 (Hai Ninh company, Ha Noi, Vietnam). The following criteria/measurements were recorded for each snail: form, apex whorls, body whorls, transparency, and the ratio of apex/body [16]. Pictures were taken with a digital camera Nikon D3x (Photogallery Liège-Sauvenière, Belgium), and manipulated for presentation using Adobe Illustrator CS3 (TDT company, Ho Chi Minh, Vietnam). Morphological identifications were based on Burch [17].

Detection of *Fasciola* spp. larval stages by microscopy

All samples were checked under the stereomicroscope for cercariae. For this purpose, whole snails were crushed between 2 glass plates. Larvae were identified according to the keys of Schell [18].

DNA extraction, PCR amplification, and sequencing

DNA was individually extracted from each snail type using the Chelex®-based DNA extraction technique [19]. A single individual was extracted for each shell type. Only a small piece of foot tissue was used for the extraction of DNA. The material was mechanically disrupted with the help of a Kimbe® Kontes disposable pellet mixer (Sigma-Aldrich, Chinh Chuong company, Ha Noi, Vietnam) in 100 µl of Chelex® 5% (Bio-Rad, TABC company, Ha Noi, Vietnam) and incubated for 1 hr and then for 30 min at 56°C and 95°C, respectively, in a Master Gradient thermal cycler (Eppendorf, BCE company, Ha Noi, Vietnam). Then, the mixture was centrifuged at 13,000 g for 7 min. The supernatant, containing the DNA, was carefully transferred to another tube. The rDNA ITS-2 was amplified using primers previously described [4]. Reactions were performed in a total volume of 10 µl containing 5 µl Mastermix 2X (Fermentas, TABC company, Ha Noi, Vietnam) 0.4 µl MgCl₂, 1 µl dNTP, 1 µl of each primer, 0.6 µl water, and 1 µl of genomic DNA. The thermal cycling profile was 3 min at 94°C followed by 35 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 55°C, 30 sec at 72°C, and a final elongation step at 72°C for 5 min [20]. Amplified fragments were sequenced by Macrogen Inc., using an ABI 3730XL (Seoul, Korea).

Sequence analyses

Sequences were carefully edited “by eyes” and then aligned

Table 1. Geographical location and Genbank accession number of the lymnaeid snails used in the phylogenetic study

Species name	Country (locality)	Accession no.	Reference
<i>Radix rubiginosa</i>	Australia	EU556316	[23]
<i>R. natalensis</i>	France	HQ283270	[8]
<i>R. rubiginosa</i>	Thailand	GU167910	Kaset et al. (unpublished)
<i>R. rubiginosa</i>	Australia	EU556317	[23]
<i>R. auricularia</i>	Italy	HQ637457	[24]
<i>R. auricularia</i>	France	AY795574	[25]
<i>R. auricularia</i>	Czech Republic	GU574308	[26]
<i>Austropeplea viridis</i>	Austria	EU556313	[23]
<i>A. viridis</i>	Thailand	GU167912	Kaset et al. (unpublished)
<i>A. tomentosa</i>	Australia	EU556272	[23]
<i>A. tomentosa</i>	Australia	EU556270	[23]
<i>A. tomentosa</i>	Australia	EU556290	[23]
<i>Lymnaea stagnalis</i>	Germany	FR797834	Vinarski et al. (unpublished)

using CLUSTAL-W version 1.8 [21] and MEGA v5.2.2 [22] (S. McAllister Ave, City, State, USA). Subsequently, minor corrections were manually introduced for a better fit of nucleotide correspondences in regions of simple sequence repeats. Tree construction was carried out in MEGA 5.2.2. The analyses were carried out using the sequences of our lymnaeid species together with 13 previously published ITS-2 sequences of closely related lymnaeid species. A sequence from *Lymnaea stagnalis* was used as an out-group (Table 1) [8,15,23-26]. A phylogenetic tree was constructed using the maximum likelihood (ML) method implemented in MEGA 5.2.2. The substitution model used was the Kimura 2 parameter model + gamma (allowing for unequal rates among sites). Clade support was assessed with 1,000 bootstrap replicates.

RESULTS

Morphological identification of lymnaeid snails

Three morphological types of snails were distinguished based on the key of Burch [17].

Type 1 (Fig. 2A): Shell is elongated and cylindrical. Shell height/width: 11-20/5-8 mm. There are 5 whorls; the last is large and inflated. Spire is high and aperture height/width: 7-11/4-5 mm. Aperture is large but not extended and moderately expanded. The outer margin is S-shaped. Columella generally twisted, is making a fold. This morphological description led to the identification of *Lymnaea* sp.

Type 2 (Fig. 2B): Shell is large but smaller than type 1. Shell

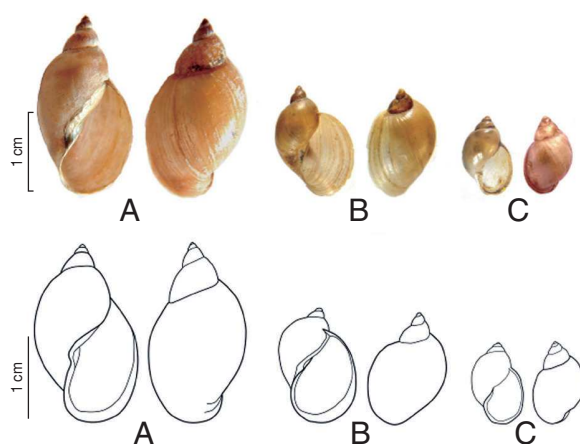


Fig. 2. Morphology of the snails. (A) *Radix rubiginosa* (= "*Lymnaea* sp."). (B) *Radix auricularia* ("*L. swinhoei*"). (C) *Austropeplea viridis* (= "*L. viridis*").

height/width: 12-18/8-10 mm. Shell is thin with sharp apex. There are 4 whorls, the last inflated with convex angle in the left. Shell surface is smooth, thin and brown with clear ribs. Aperture is large, ear-shaped, and extended. Aperture height/width: 9-10/6-8 mm. Columella is curved in the middle. The lower part of the outer lip is rounded. This morphological description led to the identification of *R. swinhoei* (= *L. swinhoei*) Adam, 1866.

Type 3 (Fig. 2C): Shell is much smaller than the 2 other species. Shell height/width: 10-13/4-6 mm. There are 4.5-5 well-rounded whorls, the first of which are small compared to the swollen last whorl. Shell surface is smooth, thin and brown with clear ribs. The aperture is regularly oval without angles. Aperture height/width: 5-6/3-4 mm. The outer lip is sharp, regularly curved. Columella is generally straight, without a fold. This morphological description led to the identification of *A. viridis* (= *L. viridis*) Quoy and Gaimard, 1832.

Ribosomal DNA sequence analysis and phylogenetic tree construction

The molecular analyses based on the ITS-2 sequences strongly supported 3 morphological types. Their length of ITS2 sequences (type 1, 450; type 2, 470, and type 3, 451 bp) which were deposited in Genbank with the accession no. KF042385 (for type 1), KF042386 (for type 2), and KF042387 (for type 3), were various. The results of Blastn showed that type 1 had a 99% identity with *R. rubiginosa* (EU556316), supporting its identification as this species. Similarly, ITS2 sequence of type 2 showed 99% homology with those of *R. auricularia* (HQ637457). Type

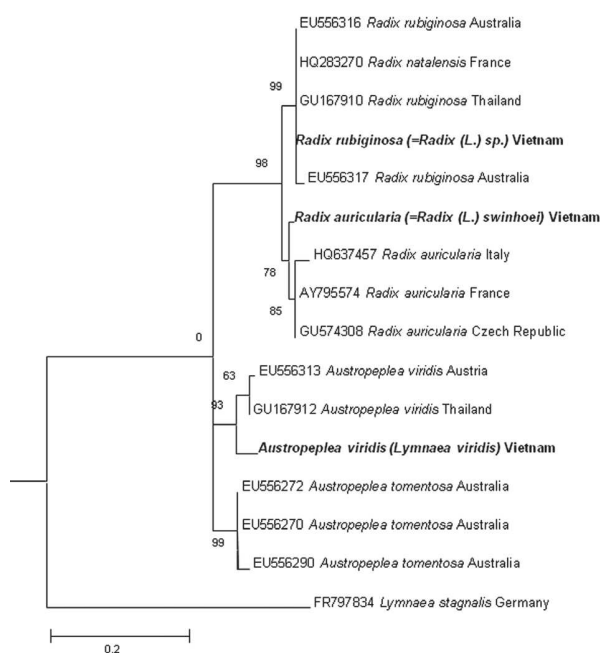


Fig. 3. Phylogenetic tree based on lymnaeid ITS-2 rDNA sequences constructed with MEGA 5.1 using maximum likelihood analysis. *Lymnaea stagnalis* from Germany was used as an out group. The bootstrap values are shown at the branches.

3 was closest to *A. viridis* (GU167912) with 94% identity. In the phylogenetic tree (Fig. 3), type 1, 2, and 3 from Vietnam were clustered with *R. rubiginosa*, *R. auricularia*, and *A. viridis*, respectively, confirming their identification.

Snail distribution

A. viridis is a common species found in various water bodies (rice fields, ditches, small canals, and submerged vegetable fields) and was present in the 3 areas investigated. *R. auricularia* was found in large canals in the northern part of Vietnam only, while *R. rubiginosa* was found only in small canals in the southern part (Table 2).

Prevalence of *Fasciola* spp. infection in field-collected snails

Table 3 shows that only 1 species (*A. viridis*) was infected with *F. gigantica* cercariae in the field with the infection rates of 0.11% (9/8,044) in Ha Noi and 1.57% (115/7,321) in Binh Dinh.

DISCUSSION

According to the key of Burch [17] reported in 1980, we

Table 2. Snail distributions in different areas under investigation

Study sites	Snail species	Habitat
Ha Noi	<i>Austropeplea viridis</i>	Rice field, small canal, submerged vegetable field
	<i>Radix auricularia</i>	Large canal
	<i>A. viridis</i>	Rice field, small canal, submerged vegetable field
Binh Dinh	<i>A. viridis</i>	Rice field, small canal, submerged vegetable field
Tra Vinh	<i>R. rubiginosa</i>	Small canal

Table 3. Prevalence of *Fasciola* spp. infection in lymnaeid snails

Study site	Prevalence (%) of <i>Fasciola gigantica</i> infection (no. infected/no. examined)		
	<i>Radix rubiginosa</i>	<i>Radix auricularia</i>	<i>Austropeplea viridis</i>
Ha Noi		0 (0/6,324)	0.11 (9/8,044)
BinhDinh			1.57 (115/7,320)
Tra Vinh	0 (0/1,000)		0 (0/1,800)

identified 2 genera of lymnaeids in Vietnam: *Austropeplea* Cotton, 1942 (columella generally straight, without a fold or plait at the apertural end) and *Radix* Montfort, 1810 (columella generally twisted, making a fold or plait at the apertural end). The genus *Austropeplea* was represented by a single species, *A. viridis* (= *L. viridis*). The 2 *Radix* species, *R. swinhoei* (= *L. swinhoei*) and *R. rubiginosa* (= *Lymnaea* sp.) had a quite similar morphology and consequently were difficult to identify according to morphological criteria only. This might be due to the phenotypic plasticity of the shell shape. Indeed, in numerous gastropod species, including the Lymnaeidae, the shell shape may vary according to environmental conditions [5,6]. In particular, shell morphology seems not to be critical for identifying species of the genus.

DNA-taxonomy is a reliable, comparable, and objective means for species identification in biological research and enabled to identify these species. Several gene regions have been used in taxonomic and phylogenetic studies of the Lymnaeidae, such as ITS-1, ITS-2, 16S, 18S, and CO1 [4,6,27]. Among them, the rDNA ITS-2 has been the most often used molecular marker in lymnaeid studies to date [27]. Our result has confirmed the correct name of 3 lymnaeid snail species in Vietnam based on molecular rDNA ITS-2 analysis, *R. rubiginosa*, *R. auricularia*, and *A. viridis*. Among them, *R. rubiginosa* is a new record for a freshwater snail fauna in Vietnam.

The 3 lymnaeids occur in somewhat different habitats. *A. viridis* is widely distributed [8,35]. In our investigation, this

species was common in all 3 regions (northern, central, and southern Vietnam). It can be found in rice fields, ditches, small canals, and submerged vegetable fields. By contrast, *R. auricularia* is found only in large stagnant canals. The species with the most restricted distribution was *R. rubiginosa*, which can be found at very low densities in small canals in southern Vietnam.

Based on microscopic examinations, *R. auricularia* (= *R. swinhoei*) and *A. viridis* (= *L. viridis*) were reported to be infected with *Fasciola* spp. in Vietnam [10,28]. Other authors reported that either *R. auricularia* or *A. viridis* could be infected with *Fasciola* spp. [9,12]. This was probably due to a lack of experience in mollusk identification; the name of the species was just given without pictures, description, or measurement, and the prevalence of infection. This point was also mentioned in a recent study [9]. Our results have shown that only *A. viridis* is infected with *Fasciola* spp. and at a low prevalence. The low prevalence observed might be a consequence of low sensitivity of microscopical examination in detecting intra-molluscan stages. Methods based on PCR might reveal higher incidences of infection [19], but this approach has yet to be used in the country.

In this study, we have confirmed that *R. swinhoei* (based on morphology) was in fact *R. auricularia* (based on PCR/sequencing). Although *R. auricularia* was reported to act as the intermediate host for *F. gigantica* in Africa, Asia, and USA, its role as the intermediate host for *F. gigantica* in Vietnam remains unclear because we did not find any infected individuals. The susceptibility of other lymnaeid snails to *Fasciola* spp. in Vietnam requires experimental studies.

The combined use of morphological and molecular data both under laboratory and field conditions, particularly on morphologically similar species of lymnaeid snails which act as potential intermediate hosts for *Fasciola* spp., should allow clarification of some key elements on the epidemiology of human and animal fascioliasis in Vietnam.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financially supported by the Belgian Technical Cooperation (BTC) Mixed PhD program, Belgium. We would like to thank our collaborators and staff in Laboratory of Parasitology and Parasitic Diseases, Department of Infectious and Parasitic diseases, University of Liège, Belgium, and Department of Parasitology, Department of Molecular Systematic and Conservation Genetic, Institute of Ecology and Bio-

logical Resources, Vietnam Academy of Science and Technology, Vietnam for technical help.

REFERENCES

- Mas-Coma MS, Esteban JG, Bargues MD. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. Bull World Health Organ 1999; 77: 340-346.
- Trung TN, Chuong NV. Raising number of human fascioliasis cases in 2011 and demand for disease prevention at the community. Annual Rep Instit Malariol Parasitol Entomol. Quy Nhon 2012 (in Vietnamese).
- Dalton JP. Fasciolosis. Wallingford Oxon OX10 8DE, UK. CABI Publishing. CAB International. 1998, p 1-544.
- Correa AC, Escobar JS, Noya O, Velásquez LE, Gonzáles-Ramírez C, Hurtrez-Boussès S, Poitier JP. Morphological and molecular characterization of neotropic Lymnaeidae (Gastropoda: Lymnaeidae), vectors of fasciolosis. Infect Genet Evol 2011; 11: 1978-1988.
- Hubendick B. Recent Lymnaeida, their variation, morphology, taxonomy, nomenclature and distribution. 17th ed. Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar. Stockholm Almqvist and Wiksells Boktryckeri AB. 1951, p 1-35.
- Pfenninger M, Cordellier M, Streit B. Comparing the efficacy of morphologic and DNA-based taxonomy in the freshwater gastropod genus *Radix* (Basommatophora, Pulmonata). BMC Evol Biol 2006; 6: 1-14.
- Thanh DN, Bai TT, Mien PV. Identification of invertebrate in northern Vietnam. Ha Noi, Vietnam. Science and Technology Publishing House. 1980, p 230-250 (in Vietnamese).
- Correa AC, Escobar JS, Durand P, Renaud F, David P, Jarne P, Poitier JP, Hurtrez-Boussès S. Bridging gaps in the molecular phylogeny of the Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), vectors of Fascioliasis. BMC Evol Biol 2010; 10: 1-12.
- Doanh PN, Hien HV, Duc NV, Thach DTC. New data on intermediate host of *Fasciola* in Vietnam. J Biol 2012; 34: 139-144 (in Vietnamese).
- Nguyen ST, Nguyen DT, Nguyen TV, Huyen VV, Le DQ, Fukuda Y, Nakai Y. Prevalence of *Fasciola* in cattle and of its intermediate host *Lymnaea* snails in central Vietnam. Parasite 2012; 19: 85-89.
- Kim NT, Vinh PT. Investigation on the prevalence of fasciolosis in cattle and snails in Ha Bac midland and prevention method. Annual Rep Instit Agricult Sci, Ha Noi, Vietnam. 1997; 407-411 (in Vietnamese).
- Ngai DD, Luc PV, Duc NV, Doanh PN, Ha NV, Minh NT. Animal raising practice and liver fluke prevalence in cattle in Daklak province. J Biol 2006; 8: 68-72 (in Vietnamese).
- Itagaki T, Fujiwara S, Mashima K, Itagaki H. Experimental infection of Japanese *Lymnaea* snails with Australian *Fasciola hepatica*. Nihon Juigaku Zasshi 1988; 50: 1085-1091.
- Li S, Xu L, Li L, Jiang L, Yang S, Yang G, Lang C. The experiment on artificial hatching and *Radix swinhoei* infection from *Fasciola*

- hepatica's* eggs. Yunnan Agricultural University 2004; 19: 360-364.
15. Kaset C, Eursithichai V, Vichasri-Grams S, Viyanant V, Grams R. Rapid identification of lymnaeid snails and their infection with *Fasciola gigantica* in Thailand. *Exp Parasitol* 2010; 126: 482-488.
 16. Samadi S, David P, Jarne P. Variation of shell shape in the clonal snail *Melanooides tuberculata* and its consequences for the interpretation of fossil series. *Evolution* 2000; 54: 492-502.
 17. Burch JB. A guide to the freshwater snails of the Philippines. *Malacol Rev* 1980; 13: 121-143.
 18. Shell SC. How to know the trematodes. Dubuque, Iowa, USA. WM C Brown Company Publisher. 1970, p 1-35.
 19. Caron Y, Righi S, Lempereur L, Saegerman C, Losson B. An optimized DNA extraction and multiplex PCR for the detection of *Fasciola* sp. in lymnaeid snails. *Vet Parasitol* 2011; 178: 93-99.
 20. Artigas P, Bargues MD, Sierra RLM, Agramunt VH, Mas-Coma S. Characterisation of fascioliasis lymnaeid intermediate hosts from Chile by DNA sequencing, with emphasis on *Lymnaea viator* and *Galba truncatula*. *Acta Trop* 2011; 120: 245-257.
 21. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 4673-4680.
 22. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. Mega molecular evolutionary genetics analysis. copyright 1993-2013. Available from: <http://www.megasoftware.net/>.
 23. Puslednik L, Ponder WF, Dowton M, Davis AR. Examining the phylogeny of the Australasian Lymnaeidae (Heterobranchia: Pulmonata: Gastropoda) using mitochondrial, nuclear and morphological markers. *Mol Phylogenet Evol* 2009; 52: 643-659.
 24. Cipriana P, Mattiucci S, Paoletti M, Scialana E, Nascetti G. Molecular evidence of *Trichobilharzia franki* Muller and Kimmig, 1994 (Digenea: Schistosomatidae) in *Radix auricularia* from Central Italy. *Parasitol Res* 2011; 109: 935-940.
 25. Ferté H, Depaquit J, Carré S, Villena I, Léger N. Presence of *Trichobilharzia szidati* in *Lymnaea stagnalis* and *T. franki* in *Radix auricularia* in northeastern France: molecular evidence. *Parasitol Res* 2005; 95: 150-154.
 26. Huňová K, Kašný M, Hampl V, Leontovych R, Kuběna A, Mikeš L, Horák P. *Radix* spp.: identification of trematode intermediate hosts in the Czech Republic. *Acta Parasitol* 2012; 57: 273-284.
 27. Durand P, Poitier JP, Escoubeyrou K, Arenas JA, Yong M, Amarista M, Bargues MD, Mas-Coma S, Renaud F. Occurrence of a sibling species complex within neotropical lymnaeids, snail intermediate hosts of fascioliasis. *Acta Trop* 2002; 83: 233-240.
 28. Bargues MD, Mas-Coma S. Reviewing lymnaeid vectors of fascioliasis by ribosomal DNA sequence analyses. *J Helminthol* 2005; 79: 257-267.
 29. Lan PD. Biological characteristic of *Fasciola gigantica* and fasciolosis in buffalo in northern Vietnam. *J Sci Technol* 1983; 12: 675-678 (in Vietnamese).



Presses de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège

4000 Liège (Belgique)

D/2015/0480/18
ISBN 978-2-87543-067-0



9 782875 430670

