



HAL
open science

**AVANTAGES DE L'IMMUNODIAGNOSTIC DE
L'HYPODERMOSE BOVINE ÉTABLI PAR
HÉMAGGLUTINATION PASSIVE ET PAR ELISA, À
PARTIR DU SÉRUM ET DU LACTOSÉRUM, SUR
LA NUMÉRATION DES VARONS**

Chantal Boulard

► **To cite this version:**

Chantal Boulard. AVANTAGES DE L'IMMUNODIAGNOSTIC DE L'HYPODERMOSE BOVINE ÉTABLI PAR HÉMAGGLUTINATION PASSIVE ET PAR ELISA, À PARTIR DU SÉRUM ET DU LACTOSÉRUM, SUR LA NUMÉRATION DES VARONS. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 1985, 16 (4), pp.335-343. hal-00901592

HAL Id: hal-00901592

<https://hal.science/hal-00901592>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVANTAGES DE L'IMMUNODIAGNOSTIC DE L'HYPODERMOSE BOVINE ÉTABLI PAR HÉMAGGLUTINATION PASSIVE ET PAR ELISA, À PARTIR DU SÉRUM ET DU LACTOSÉRUM, SUR LA NUMÉRATION DES VARONS

Chantal BOULARD

INRA, Centre de Tours-Nouzilly, Station de Pathologie Aviaire et de Parasitologie, 37380 Monnaie, France.

Summary

ADVANTAGES OF THE IMMUNODIAGNOSIS OF BOVINE HYPODERMOSIS ESTABLISHED BY PASSIVE HEMAGGLUTINATION AND ELISA FROM SERUM AND LACTOSERUM COMPARED WITH THE WARBLE COUNT. — For an immunodiagnosis of hypodermosis, the most favourable period, December to April, was determined by means of annual kinetics of the anti-*Hypoderma* antibodies. From 69 blood samples, immunodiagnosis by means of a passive hemagglutination and ELISA are strictly correlated ($r = 0.429$, $P < 0.01$). The results obtained by the ELISA technique on the serum and lactoserum of 23 cows are also correlated ($r = 0.444$, $P < 0.02$). The immunodiagnosis of hypodermosis carried out on the serum or the lactoserum requires a single sample, contrary to the warble count which demands numerous interventions in order to be viable.

Le diagnostic de l'hypodermose peut paraître de réalisation simple puisque cette maladie présente une phase externe au cours de son cycle parasitaire. Ainsi la numération des varons sur les animaux arrivant aux abattoirs et sur les marchés ou parfois sur les cuirs dans les tanneries, reste encore la seule technique pratiquée pour l'évaluation de l'atteinte par l'hypodermose des troupeaux de l'hémisphère Nord. Si ce diagnostic ne présente aucune difficulté, les conditions les plus favorables à sa réalisation sont exceptionnellement réunies. La collecte des données concernant cette maladie est restée plus dépendante d'impératifs pratiques associés aux problèmes du rassemblement des animaux, qu'aux facteurs géoclimatiques influençant très largement les cycles du parasite ou aux règles les plus élémentaires de l'échantillonnage. Aussi une estimation précise de

la prévalence de l'hypodermose n'a jamais pu être obtenue à grande échelle à partir de ce diagnostic. Les informations recueillies ont donc gardé un caractère surtout qualitatif, sans jamais atteindre un niveau de précision suffisant pour permettre une approche dynamique et quantitative des faibles populations d'hypodermes observées notamment après la mise en place de plans de prophylaxie, comme ce fut le cas en Grande Bretagne (Tarry, 1984) et en Irlande (Lee, 1984; Thorneberry, 1984). Cette méthode d'estimation de l'hypodermose, dont les conditions ne sont pas standardisées, rend difficile également la comparaison des évaluations des niveaux d'infestation d'un pays à l'autre (Boulard *et al.*, 1984) et la même année au sein d'un même troupeau d'un mois à l'autre (Boulard *et al.*, 1983).

L'amélioration des méthodes d'estimation de

l'hypodermose passe donc par une standardisation des conditions de diagnostic et la mise au point d'une méthode d'échantillonnage prenant en compte les caractéristiques épidémiologiques de cette maladie.

Après avoir déterminé la période optimale pour diagnostiquer l'hypodermose par les techniques sérologiques, nous avons comparé les résultats obtenus à partir du sérum par les techniques d'hémagglutination passive et d'ELISA. Les résultats obtenus à partir du sérum par hémagglutination passive et l'ELISA sont étroitement corrélés. Les résultats obtenus à partir du lactosérum par ELISA permettent de poser un diagnostic de troupeau.

Matériel et Méthodes

1. Animaux et Protocoles Expérimentaux

1.1. Cinétique des anticorps anti-hypoderme

Un prélèvement sanguin mensuel a été effectué sur l'ensemble des génisses du troupeau expérimental de la Station de Recherches sur la vache laitière (INRA de Rennes) de novembre 1980 à décembre 1981. L'infestation d'hypodermose était définie par une réaction sérologique positive ($> 1/4$) par hémagglutination passive. Seuls les résultats observés sur quatre génisses ayant subi une seule infestation d'hypodermose au printemps 1980 sans réinfestation au printemps 1981 ont été retenus.

1.2. Comparaison hémagglutination passive et technique ELISA sur prélèvements sanguins et sur lactosérums

Parmi cent exploitations reflétant le taux moyen d'infestation d'hypodermose du département des Vosges, trois exploitations de type laitier ont été retenues par tirage au sort. (Le mode de sélection de ces cent exploitations a fait l'objet d'une thèse: G. Burillon, étude statistique d'un nouvel outil de contrôle d'une infestation bovine (*Hypoderma bovis*, *H. lineatum*): le sérodiagnostic immunitaire, thèse de 3^e cycle, Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, 1984). Sur l'ensemble des bovins (68) de ces trois exploitations, du sang et du lait ont été prélevés en février 1982 avant l'apparition des varons.

Parmi les animaux du troupeau expérimental de la Station de la Physiologie de la Reproduction (INRA, Centre de Recherches de Tours-Nouzilly), six vaches ont été sélectionnées sur l'absence de réaction sérologique vis-à-vis de l'hypodermose. Ces animaux ont fourni les prélèvements, sérum et lait, considérés comme références négatives pour les tests.

1.3. Influence du traitement

Parmi les animaux du troupeau du Domaine expérimental du Haras du Pin (INRA), présentant une sérologie en hémagglutination passive positive ($> 1/4$), douze génisses de toutes races âgées de 12 mois ont été tirées au sort. Ces animaux ont été répartis en trois lots: le lot 1 ne recevant aucun traitement anti-parasitaire; le lot 2 recevant par épandage 17 mg/kg de poids vif de trichlorfon (Varlute, Mérieux, Lyon); le lot 3, 200 µg/kg de poids vif d'ivermectines (Ivomec, MSD, Rahway) par voie sous-cutanée. Les traitements ont été administrés le 6 novembre 1982.

2. Immunodiagnostic

2.1. Prélèvements

Le sang a été prélevé à la jugulaire des animaux et était recueilli dans des tubes secs puis centrifugés dans les 24 heures.

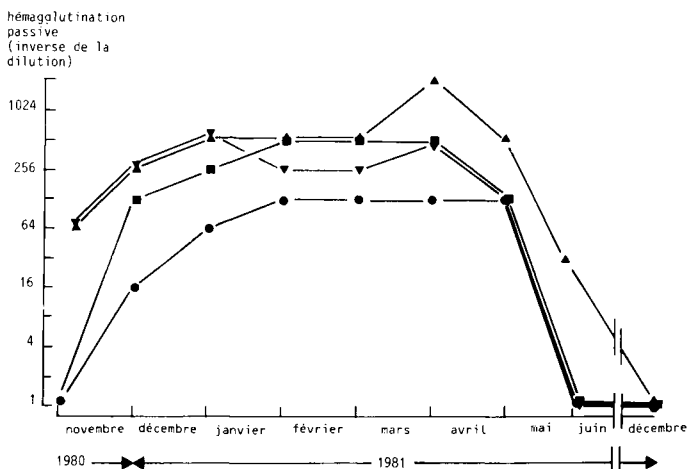


Fig. 1. — Cinétique des anticorps sériques anti-hypoderme mis en évidence par hémagglutination passive chez quatre génisses ayant subi uniquement une primo-infestation.

Le lait était prélevé au milieu de la traite. Le lactosérum était obtenu après addition de présure.

Sérums et lactosérums étaient conservés à -20°C .

2.2. Antigène

Le même antigène, collagénase brute (Boulard, 1970; Lecroisey *et al.*, 1979), a été utilisé dans les deux techniques d'immunodiagnostic. Cet antigène était obtenu à

partir de larves d'*Hypoderma lineatum* prélevées dans la sous-muqueuse œsophagienne et de larves d'*H. bovis* prélevées dans le tissu épidermal de carcasses de bovins immédiatement après abattage. La collagénase brute contient principalement les hypodermines A, B et C. La concentration en protéines était déterminée par la méthode de Lowry *et al.* (1951) avec l'albumine pour standard.

2.3. Hémagglutination passive

La technique a déjà été décrite (Boulard, 1970; Boulard *et al.*, 1970).

2.4. ELISA

L'antigène dilué dans le tampon carbonate-bicarbonate de sodium (0,1 M, pH 9,6) était déposé dans les puits de plaques de microtitration à raison de 100 μl par puits et incubé une nuit à 4°C . Après trois lavages au tampon PBS-Tween 20 à 0,1 %, chaque puits recevait 100 μl d'albumine (solution de 1 % dans du tampon carbonate-bicarbonate). Après trois autres lavages au tampon PBS-Tween 20 à 0,1 %, chaque puits recevait 100 μl de sérum dilué au 1/200 dans le tampon PBS ou du lactosérum pur. Les plaques sont incubées une heure à 37°C puis lavées trois fois avec la solution PBS-Tween 20. Le sérum conjugué anti-immunoglobuline de bovin dilué au 1/500 dans la solution de PBS (100 μl par cupule) était déposé puis incubé une heure à 37°C . Après trois lavages avec le tampon PBS-Tween 20, la révélation était obtenue par addition de 100 μl d'une solution d'acide 5 amino-salicylique à 0,08 % en présence d'eau oxygénée. Après 30 minutes à 4°C la réaction était arrêtée par addition de 50 μl de

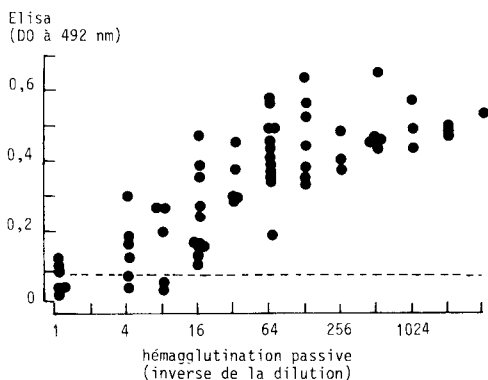


Fig. 2. — Comparaison du sérodiagnostic de l'hypoderme bovine par la technique ELISA et d'hémagglutination passive sur 69 prélèvements effectués en février dans les Vosges.

LACTOSERUM

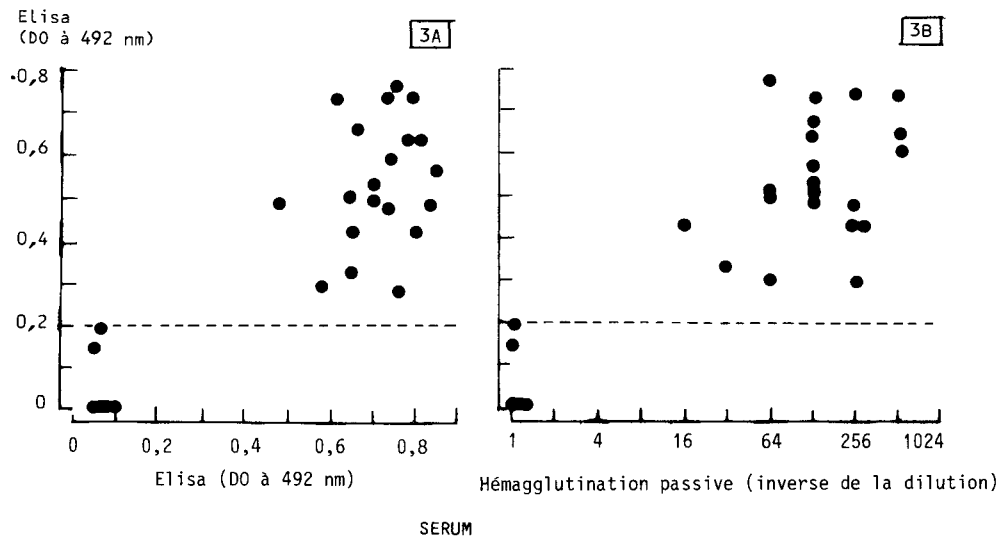


Fig. 3. — Mise en évidence des anticorps anti-hypoderme par la technique ELISA dans le lactosérum et le sérum et par la technique d'hémagglutination passive dans le sérum à partir de prélèvements effectués en février sur 23 vaches.

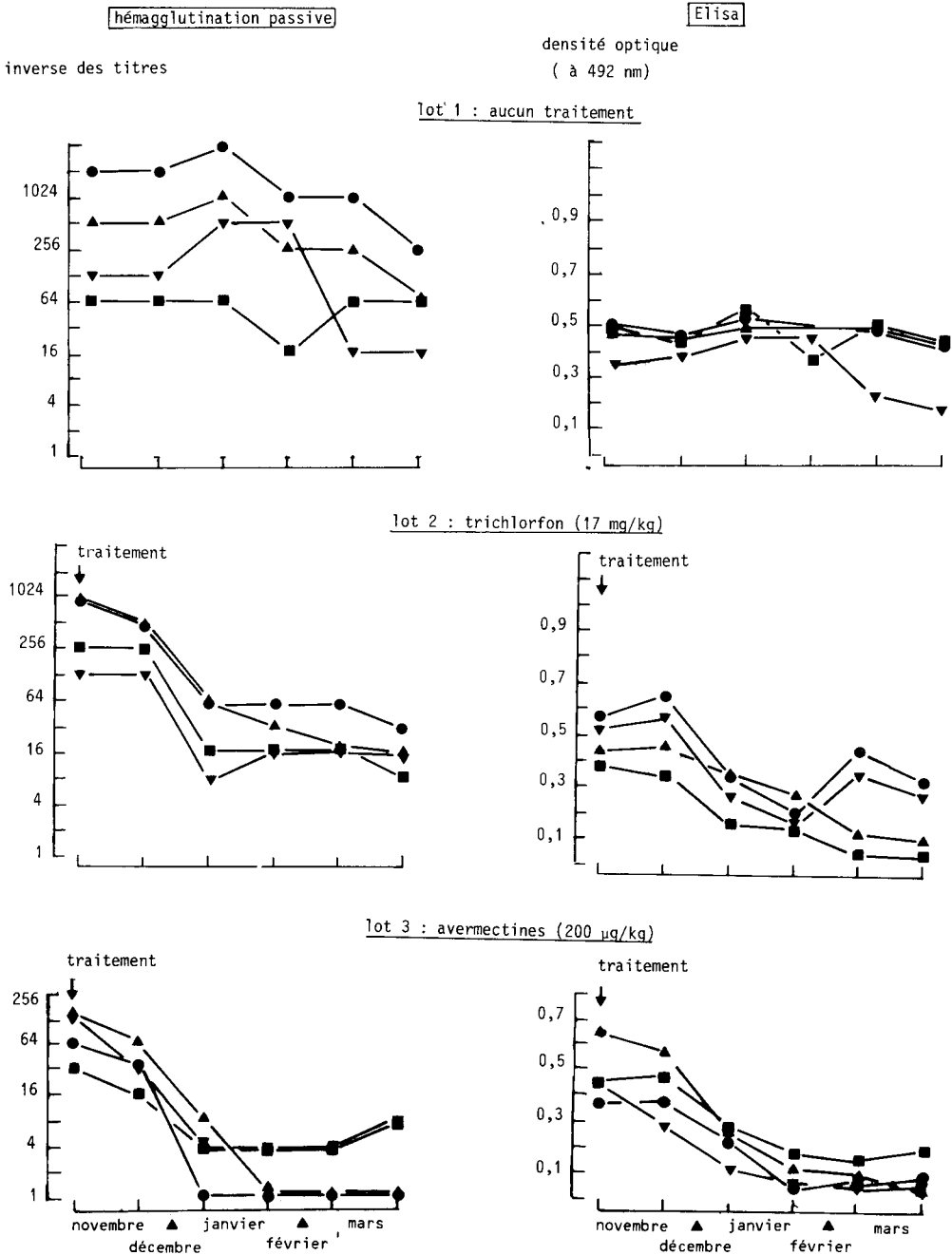


Fig. 4. — Évolution individuelle des titres en anticorps sériques anti-hypoderme évaluée par la technique ELISA et par hémagglutination passive. (A l'intérieur de chaque lot expérimental, les résultats observés chez le même animal sont représentés avec le même symbole).

NaOH 2N. L'intensité de la réaction était mesurée à 492 nm avec un spectrophotomètre (Titretek multiskan, Mac Lean).

3. Numération des varons

Les varons ont été comptés de janvier à août 1982 et 1983 sur deux lots de neuf génisses. Les animaux provenaient du troupeau expérimental de la Station de Physiologie de la Reproduction (INRA, Centre de Recherches de Tours-Nouzilly). Ils ont été sélectionnés afin d'obtenir des lots homogènes par rapport à la race (frisonne pie noire), à l'âge (12-14 mois) et aux conditions d'exposition à l'hypodermose durant le printemps précédant la numération. Tous les animaux présentaient une réaction sérologique positive par hémagglutination passive.

La numération a été pratiquée par palpation de la région dorsale des animaux à intervalle de deux semaines à partir du début janvier. Les dates d'apparition du nodule et de présence de varons au sein du nodule ont été notées. Aucun diagnostic différentiel d'espèce d'hypoderme n'a été fait.

Résultats

1. Immunodiagnostic

Au cours d'une primo-infestation, quatre génisses avaient présenté, en hémagglutination passive, un titre maximal compris entre 1/64 et 1/512. Ce titre se maintenait avec peu de variations de décembre à mai puis décroissait jusqu'à atteindre le seuil de négativité, 1/1, entre juin et décembre en l'absence de ré-infestation au printemps (fig. 1). Ces données ont orienté le choix des périodes de prélèvements, décembre à mars, pour les analyses immunologiques ultérieures.

Les résultats du sérodiagnostic de l'hypodermose réalisés sur ces prélèvements par la technique ELISA étaient corrélés à ceux obtenus par la technique d'hémagglutination passive ($r = 0,429$; $P < 0,01$) (fig. 2).

Le diagnostic de l'hypodermose par la technique ELISA effectué sur le lactosérum ou le sérum étaient significativement corrélés ($r = 0,406$; $P < 0,05$) (fig. 3a). De même, une corrélation était observée entre les résultats obtenus à partir du lactosérum et la technique ELISA et ceux obtenus sur le sérum et la technique d'hémagglutination passive ($r = 0,444$; $P < 0,02$) (fig. 3b).

Que les animaux aient été traités ou non, qu'ils aient reçu du trichlorfon ou des avermectines, les réponses détectées par la technique ELISA ou la technique d'hémagglutination passive évoluaient de façon identique à l'intérieur de chaque lot expérimental (fig. 4).

2. Numération des varons

La date d'apparition du premier varon peut varier dans chaque lot d'une année à l'autre,

février 1982 et avril 1983 et pour les animaux d'un même lot s'étaler sur deux mois, février-mars 1982, ou sur trois mois, avril-juin 1983. La disparition du dernier varon de chaque animal se situait principalement en juillet et août au cours de deux années étudiées (fig. 5).

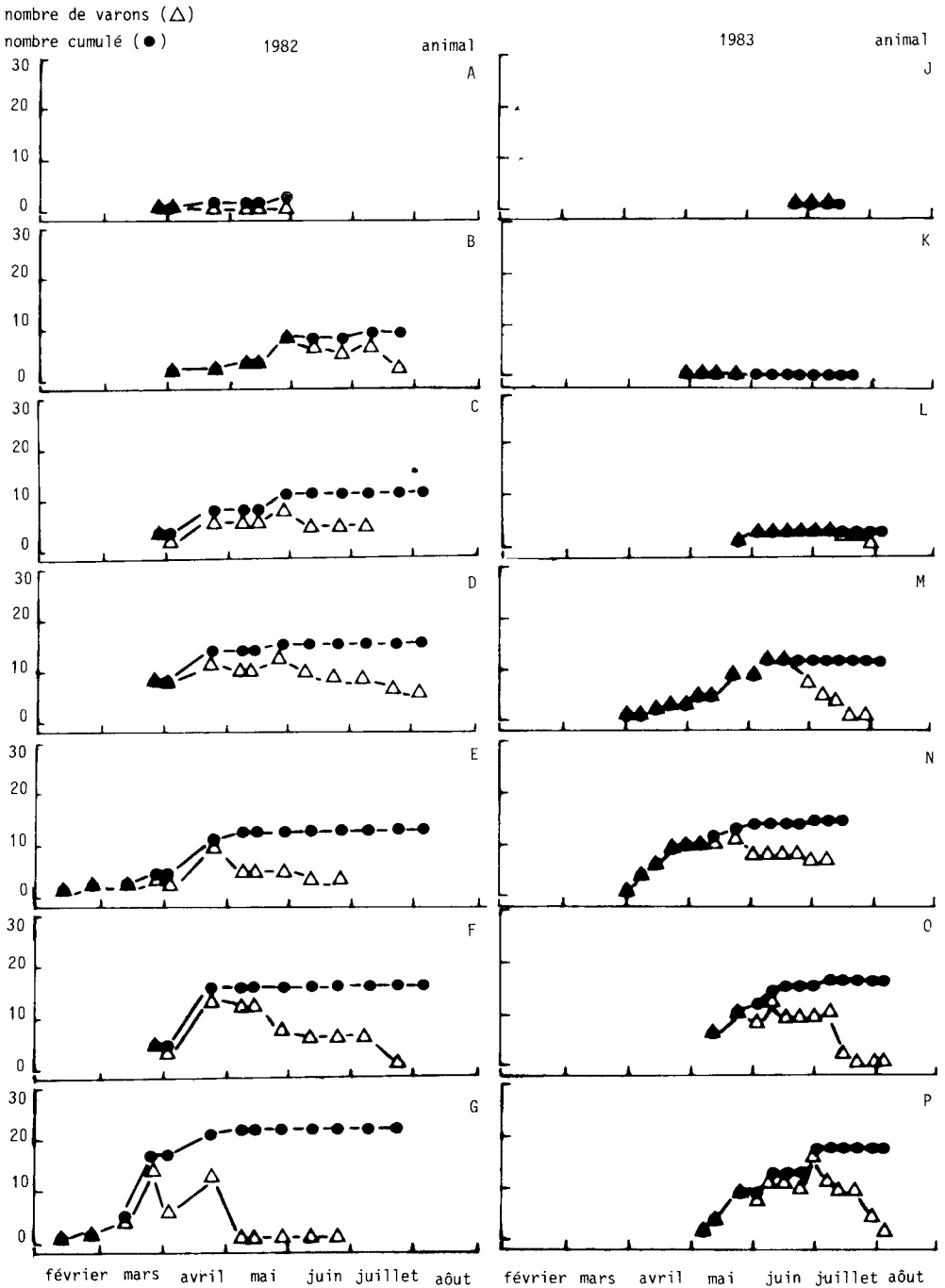
L'évolution du nombre cumulé de varons par animal au cours du printemps montrait qu'en 1982, toute la population larvaire était apparue en juin chez huit animaux sur neuf et en 1983, en juillet chez les neuf animaux (fig. 5).

Discussion

L'étude de l'évolution de la distribution des varons au cours de deux années successives, dans une même exploitation, et sur des lots d'animaux de même âge maintenus dans les mêmes conditions d'élevage, fait apparaître la grande variabilité de la période de développement du stade ectoparasitaire (fig. 5). Des différences importantes peuvent être relevées une même année au sein du troupeau et d'une année à l'autre dans la même exploitation. Par ailleurs, nous distinguons en 1982, par exemple la présence de deux vagues de sorties, l'une en mars-avril, l'autre en juin. Ces deux vagues sont à associer à l'arrivée successive des larves d'*H. lineatum* qui précèdent ici de 6 semaines le cycle biologique annuel d'*H. bovis*. Ce phénomène est plus marqué encore dans les régions arides comme l'Irak (Abul-Hab, 1973) ou en Amérique du Nord à l'Est des Rocheuses (Scharff, 1950).

A cette différence biologique préexistante entre les deux espèces agents de l'hypodermose bovine, se superposent deux facteurs majeurs qui influencent très largement les périodes d'apparition des varons au printemps, un facteur interne, la résistance de l'hôte au parasite, un facteur externe, le climat.

Breyev (1967) a montré que la résistance développée par le bovin dès la première infestation est dirigée essentiellement vers les larves du premier stade d'hypoderme en migration et que cette résistance peut présenter divers degrés d'efficacité vis-à-vis de la population de larves infestantes. Il met en évidence à partir d'une infestation unique, réalisée avec les œufs d'une même mouche d'*H. bovis*, une dispersion de la formation des varons apparaissant six à neuf mois après l'infestation expérimentale. Aussi la résultante d'une période d'infestation étalée sur quatre mois, de la rémanence immunitaire d'une année à l'autre et des niveaux de pressions parasitaires antérieures (Evstafjev, 1980) très différents d'un animal à l'autre, contribue très largement à amplifier la dispersion du phénomène au sein du troupeau et participe ainsi à l'étalement dans le temps



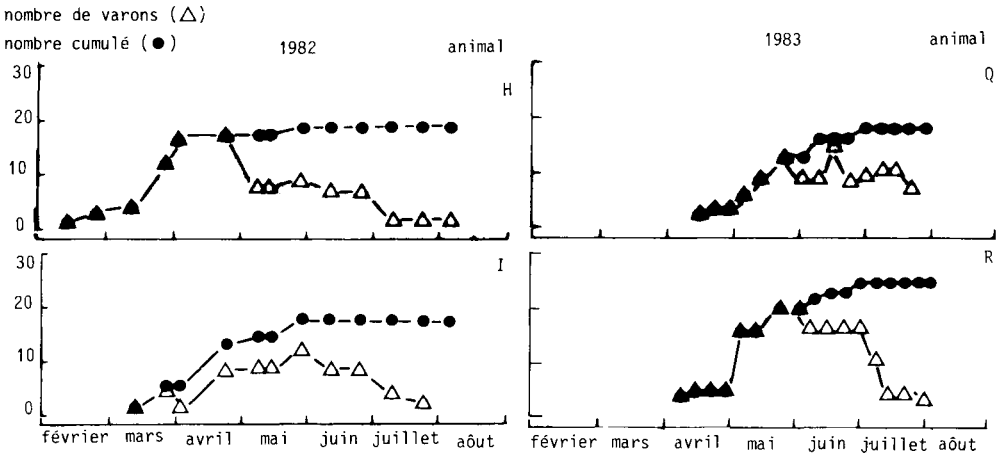


Fig. 5. — Évolution au cours de deux années consécutives du nombre de varons par animal.

de l'apparition de la phase ectoparasitaire au cours d'une même année.

Les facteurs climatique et géographique se superposent à l'interaction de ces phénomènes biologiques et influencent largement la durée du cycle évolutif du parasite. Dès 1914, Carpentier et ses collaborateurs décrivaient en Irlande l'incidence du climat d'une année à l'autre sur la sortie des varons. Ces observations étaient confirmées par celles de Bishopp *et al.* (1929), Scharff (1950), et Weintraub *et al.* (1961) aux USA, de Galloway et Harlos (1982) au Canada, de Minar (1984) en Tchécoslovaquie, et de Abul Hab (1973) en Irak. Cependant, bien que cette variabilité soit mondialement reconnue, nous ne sommes pas encore en mesure de prévoir deux à trois mois à l'avance la période la plus favorable au comptage des varons étroitement dépendante des prévisions météorologiques. Aussi, si cette méthode devait être conservée, il conviendrait dans l'avenir, pour être plus précis, de pratiquer sept à huit examens sur les mêmes animaux de janvier à août (la phase ectoparasitaire étant au minimum de 30 jours).

Les données recueillies en 1982 et 1983 illustrent très bien les limites de cette méthode d'estimation de l'hypodermose lorsque le diagnostic est pratiqué une ou deux fois sur un troupeau. Aussi, si cette mesure avait été réalisée une seule fois comme c'est le cas dans les conditions de terrain au cours du mois de mars par exemple, on constate qu'au cours de 1983 l'appréciation de l'infestation eut été extrêmement sous-estimée. De même un seul comptage pratiqué en juin modifie dans le même sens l'évaluation du taux d'infestation pour 1982. Si cette précision, pour être

améliorée, nécessite une multiplication des interventions sur les mêmes animaux tout au long du printemps, la méthode devient alors trop consommatrice en main-d'œuvre.

Il devenait donc nécessaire de rechercher un moyen nouveau de diagnostic, plus souple, plus précoce, réduisant le nombre des interventions et s'adaptant si possible à d'autres mesures de surveillance mises en place pour diverses prophylaxies. Un dépistage immunologique de l'hypodermose pouvait répondre à ces caractéristiques. Les antigènes permettant un diagnostic spécifique de l'hypodermose ont été décrits de longue date (Boulard, 1970; Robertson, 1980). Des caractéristiques physicochimiques des principaux constituants antigéniques les hypodermines A, B et C ont été précisément définies (Boulard et Garonne, 1978; Lecroisey *et al.*, 1979; Tong *et al.*, 1981).

La réponse immunitaire humorale, après des infestations expérimentales chez le lapin (Boulard et Weintraub, 1973) ou chez le bovin (Robertson, 1980) ou des infestations naturelles chez l'homme (Boulard et Petithory, 1977) et les bovins (Boulard, 1975; Gingrich, 1982) ont été analysées par immunoelectrophorèse et hémagglutination passive. Cependant, si ces deux méthodes de diagnostic restent des outils de laboratoire fiables et reproductibles ne demandant pas d'équipement particulier, ils ne permettent pas non plus de diagnostics de masse car ils sont trop consommateurs en réactifs et en temps de manipulation. Avec la diffusion de la méthode ELISA, tant dans les laboratoires de diagnostic que de recherche fondamentale, son adaptation à l'immunodiagnostic de l'hypodermose fournissait une solution aux exigences du dépistage de masse.

Des essais préliminaires ont déjà été réalisés par Pruett (communication personnelle) et Sinclair et Wassall (1983). Nous constatons dans cette étude une bonne corrélation du sérodiagnostic pratiqué par l'hémagglutination passive et l'ELISA (fig. 2) en utilisant le même antigène et une cinétique très parallèle de la réponse immunitaire humorale suivie par les deux méthodes (fig. 4).

La recherche d'anticorps antiparasitaires dans le lait que nous présentons ici, n'a pas encore été développée à notre connaissance pour le diagnostic d'autres parasitoses. Nous voyons à partir de cet exemple que le lait, d'accès facile, peut aussi apporter un élément d'appréciation qualitatif sur la présence ou non du parasite et que cette réponse est corrélée à la réponse sérologique (fig. 3). Cependant, l'intensité de la réponse immunitaire diagnostiquée dans le lait ne reflète pas toujours celle du sérum puisque les différences de densité optique enregistrées dans le lait pour une même valeur observée dans le sérum peuvent varier de 100 % d'une laitière à l'autre et semble dépendre de l'état inflammatoire de la mamelle.

Ainsi, l'immunodiagnostic de l'hypodermose bovine pratiqué sur le sang ou le lait de bovins en stabulation au cours de l'hiver et réalisé par la méthode ELISA pourrait améliorer les conditions de collecte des données nécessaires à l'estimation de la prévalence de cette maladie, notamment s'il est possible de réaliser le diagnostic au niveau des tanks de lait permettant ainsi un diagnostic d'étable. Bien que les premiers résultats présentés ici soient très prometteurs ils nécessitent des études complémentaires sur les limites de cette technique sur deux points principalement :

— d'une part il semble nécessaire d'améliorer la fiabilité du diagnostic ELISA dans le cas des faibles infestations (fig. 2) que l'on rencontre notamment en fin de campagne de prophylaxie.

— d'autre part la rémanence des anticorps après différents types de traitements ou lorsqu'il n'y a pas de réinfestations d'une année à l'autre chez des animaux ayant été infestés une ou plusieurs fois, nécessitent d'être plus largement explorée avec la technique ELISA. Les données acquises dans cette étude grâce à l'hémagglutination passive (fig. 1) sur la rémanence des anticorps qui n'excède pas sept mois après la chute des varons lorsqu'il n'y a pas eu de réinfestation, concernent

ici des animaux en primo-infestation. La rémanence des anticorps chez des animaux non réinfestés après des infestations répétées sont maintenant à étudier tant dans le sérum que dans le lait par la technique ELISA également.

Bien qu'encore incomplètement explorée, la technique ELISA, par les nombreux avantages apportés à l'immunodiagnostic de l'hypodermose, standardisation, rapidité d'exécution, a été retenue par les laboratoires européens et nord-américains qui participent actuellement à l'exploration de ses limites de fiabilité. Des infestations expérimentales sur des animaux précédemment infestés ou soumis à de faibles infestations sont actuellement en cours de réalisation en Amérique du Nord.

L'immunodiagnostic de l'hypodermose utilisant une même technique et une même source antigénique est maintenant en cours de diffusion dans les laboratoires européens et nord-américains. C'est un outil commun qui permettra dans l'avenir d'avoir une approche épidémiologique transposable d'un pays à l'autre et au sein d'un même pays d'une année à l'autre.

L'immunodiagnostic par ELISA associé à une technique d'échantillonnage tenant compte de la biologie et de l'épidémiologie du parasite (G. Burillon, thèse 3^e cycle, Université de Paris-Sud, centre d'Orsay, 1984) assurent pour l'avenir de nouveaux moyens d'évaluation de l'efficacité des programmes de prophylaxie de l'hypodermose, de surveillance de la maladie, moyens beaucoup plus précis et moins consommateurs de main-d'œuvre que le traditionnel comptage des varons.

Reçu le 17 octobre 1984.

Accepté le 30 mars 1985.

Remerciements

Nos remerciements s'adressent tout d'abord à Monsieur Plommet pour nous avoir conseillé de rechercher les anticorps anti-hypoderme dans le lait. Nous tenons à remercier également Monsieur Touze et son équipe pour nous avoir permis de réaliser les comptages de varons pendant deux années consécutives ainsi que Mademoiselle Patricia Duchambon et Madame Martine Plat pour leur assistance technique.

Résumé

Pour un immunodiagnostic de l'hypodermose, la période la plus favorable, décembre-avril, a été déterminée à partir d'une cinétique annuelle des anticorps anti-hypoderme. A partir de 69 prélèvements sanguins, les immunodiagnostic par hémagglutination passive et ELISA sont étroitement corrélés ($r = 0,429$, $P < 0,01$). Les résultats obtenus par la technique ELISA sur le lactosérum et le sérum de 23

vaches sont aussi corrélés ($r = 0,444$, $P < 0,02$). L'immunodiagnostic de l'hypodermose effectué à partir du sérum ou du lactosérum demande un prélèvement unique contrairement à la numération des varons qui exige de nombreuses interventions pour être fiable.

Références

- ABUL-HAB J., 1973. Seasonal occurrence of *Hypoderma* spp. (Diptera, Oestridae) warble flies on cattle in Baghdad area, Iraq *Bul. End. Dis.*, **14**, 73-81.
- BISHOPP F.C., LAAKE E.W., WELLS R.W., 1929. Cattle grubs or heel flies with suggestions for their control. *Farmer's Bulletin (U.S. Department of Agriculture)*, **1596**, 1-22.
- BOULARD C., 1970. Étude préliminaire d'une collagénase brute extraite de la larve de premier stade d'*Hypoderma lineatum*. *C.R. Acad. Sc. Paris*, **270**, 1349-1351.
- BOULARD C., 1975. Évolution des anticorps circulants chez les bovins traités contre l'hypodermose. *Ann. Rech. Vét.*, **6**, 143-154.
- BOULARD C., SORIA J., SORIA C., 1970. Possibilité d'emploi de la réaction d'hémagglutination passive pour le diagnostic de l'hypodermose, en utilisant comme antigène une collagénase brute extraite des larves de 1^{er} stade d'*Hypoderma lineatum*. *C.R. Acad. Sc. Paris*, **270**, 1965-1968.
- BOULARD C., BILLARDON G., BIRON G., HILLION E., VIGOUROUX B., 1983. Essais de contrôle ponctuel de l'hypodermose bovine au niveau d'exploitations dispersées ou groupées. *Ann. Rech. Vét.*, **14**, 183-188.
- BOULARD C., HAVAGE J.P., ALBESSARD A., 1984. Bovine hypodermosis control in France. *Symposium on Warble Fly control in Europe, Brussels, 16-17 Sept. 1982*, 49-57.
- BOULARD C., GARRONE R., 1978. Characterization of a collagenolytic enzyme from larvae of *Hypoderma lineatum* (Insecta: Diptera, Oestriform). *Comp. Biochem. Physiol.*, **59B**, 251-255.
- BOULARD C., PETITHORY J., 1977. Serological diagnosis of human hypodermosis: a preliminary report. *Vet. Parasitol.*, **3**, 259-263.
- BOULARD C., WEINTRAUB J., 1973. Immunological responses of rabbits artificially infested with the cattle grubs *Hypoderma bovis* (L.) and *H. lineatum* (De Vill.) (Diptera: Oestridae). *Int. J. Parasitol.*, **3**, 379-386.
- BREYEV K.A., 1967. On the variability of developmental periods of 1st instar larvae of *Hypoderma bovis* de geer and the causes of their migration in host organism. *Wiadomosc. Parazytol.*, **13**, 579-584.
- CARPENTER G.H., HEWITT T.R., REDDIN T.K., 1914. The warble-flies. Fourth report on experiments and observations as to life-history and treatment. *Journal (Department of Agriculture and Technical Instruction for Ireland)*, **15**, 105-132.
- EVSTAFJEV M.N., 1980. The role of immunity during Hypodermatosis of cattle. *Parazitologiya*, **14**, 197-205.
- GALLOWAY T.D., HARLOS J.A., 1980. A survey for cattle grubs (Diptera: *hypoderma* spp.). In slaughtered cattle in manitoba packing plants. *Can. J. Anim. Sci.*, **62**, 935-941.
- GINGRICH R.E., 1982. Acquired resistance to *Hypoderma lineatum*: comparative immune response of resistant and susceptible cattle. *Vet. Parasitol.*, **9**, 233-242.
- LECROISEY A., BOULARD C., KEIL B., 1979. Chemical and enzymatic characterization of the collagenase from the insect *Hypoderma lineatum*. *Eur. J. Biochem.*, **101**, 385-393.
- LEE R.P., 1984. The control of *Hypoderma bovis* and *H. lineatum* in the Republic of Ireland: The present position. *Symposium on Warble Fly Control in Europe, Brussels, 16-17 Sept. 1982*, 89-98.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR L., RANDALL R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- MINAR J., 1984. Population ecology of *Hypoderma bovis* (de Geer) and its importance for hypodermosis control. *Symposium on Warble Fly Control in Europe, Brussels, 16-17 Sept. 1982*, 141-152.
- ROBERTSON R.H., 1980. Antibody production in cattle infected with *Hypoderma* spp. *Can. J. Zool.*, **58**, 245-251.
- SCHARFF D.K., 1950. Cattle grubs. Their biologies, their distribution and experiments in their control. *Technical bulletin of Montana State College Agricultural experiment station Bozeman Montana*.
- SINCLAIR I.J., WASSALL D.A., 1983. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Hypoderma bovis* in cattle. *Res. Vet. Sci.*, **34**, 251-252.
- TARRY D.W., 1984. The monitoring and diagnosis of hypodermosis. *Symposium on Warble Fly Control in Europe, Brussels, 16-17 Sept. 1982*, 125-130.
- THORNBERRY H., 1984. Experiences in the control of *Hypoderma bovis* and *Hypoderma lineatum* in the Republic of Ireland. *Symposium on Warble Fly Control in Europe, Brussels, 16-17 Sept. 1982*, 79-88.
- TONG N.T., IMHOFF J.M., LECROISEY A., KEIL B., 1981. Hypodermin A, a trypsin-like neutral proteinase from the insect *Hypoderma lineatum*. *Biochim. Biophys. Acta*, **658**, 209-219.
- WEINTRAUB J., MCGREGOR W.S., BRUNDRETT H.M., 1961. Artificial infestations of the Northern cattle grub. *Hypoderma bovis*, in Texas. *J. Econ. Entomol.*, **54**, 84-87.