

ÉCHINOCOCCOSE/HYDATIDOSE

RÉSUMÉ

Le diagnostic de l'échinococcose chez le chien et chez les autres carnivores sensibles repose sur la mise en évidence des cestodes d'adultes du genre Echinococcus ou de leurs œufs dans les fèces ou dans l'intestin grêle de ces animaux. Récemment, des épreuves avec les copro-antigènes et la copro-ADN se sont révélés utiles pour un diagnostic rapide, précis et fiable. Chez les animaux hôtes intermédiaires, le diagnostic dépend de la détection de vésicules hydatiques qui peuvent être rencontrées dans différents organes et tissus, et tout particulièrement le foie et les poumons.

Identification de l'agent pathogène : du point de vue taxonomique 5 espèces du genre Echinococcus sont actuellement reconnues. Ce sont E. granulosus, E. multilocularis, E. oligarthrus, E. vogeli et E. shiquicus. Echinococcus oligarthrus et E. vogeli sont moins fréquemment rencontrés que les deux premières espèces. Jusqu'à présent E. shiquicus n'a été trouvé que dans une région spécifique de la République populaire de Chine. Morphologiquement, les 5 espèces sont distinctes aussi bien au stade adulte qu'au stade larvaire. Pour E. granulosus, de nombreuses variantes intraspécifiques, montrant des caractéristiques morphologiques et biologiques, ont été décrites et elles peuvent être différenciées de façon fiable par l'analyse de l'ADN. Il a été envisagé d'élever au rang d'espèce certains génotypes de E. granulosus.

Habituellement, les formes larvaires d'Echinococcus peuvent être détectées à l'œil nu dans les organes parasités. Cependant, chez le mouton la recherche et l'identification des vésicules hydatiques d'E. granulosus doivent être faites avec le plus grand soin pour les différencier de Cysticercus tenuicollis, larve de Ténia hydatigena, car les deux types de larve sont souvent rencontrés chez le même animal. L'examen histologique d'organes ou de tissus fixés dans du formol permet la confirmation du diagnostic. La présence d'une couche adventicielle lamellaire, sans formation cellulaire, positive à la coloration de Schiff par l'acide périodique, avec ou sans la présence d'une membrane germinative interne à structure cellulaire, est considérée comme une caractéristique spécifique des métacestodes d'Echinococcus. L'identification des formes larvaires d'E. multilocularis chez les rongeurs et d'autres hôtes intermédiaires est possible par l'examen macroscopique ou microscopique et par détection de l'ADN en utilisant la réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR).

La recherche d'Echinococcus spp. adulte chez l'hôte définitif nécessite un examen minutieux de l'intestin grêle des carnivores domestiques ou sauvages. La technique utilisant le traitement avec l'arécoline (test à l'arécoline) est généralement utilisée dans les enquêtes épidémiologiques pour déterminer la prévalence de l'infestation par E. granulosus chez les chiens. La manipulation du matériel (fèces, contenu et muqueuse de l'intestin) infecté présente un risque pour l'opérateur car il pourra contracter une maladie potentiellement mortelle. Un progrès significatif a été accompli suite à la mise au point d'épreuves immunologiques pour le diagnostic des infestations intestinales par Echinococcus grâce à la détection des antigènes parasitaires dans les fèces (copro-antigènes). Le test des copro-antigènes a été utilisé avec succès dans des enquêtes chez les chiens pour E. granulosus et il est actuellement employé pour les recherches de E. multilocularis chez les chiens, les renards et les chats. La détection des copro-antigènes est possible sur des échantillons de fèces collectés sur des animaux vivants ou morts et dans l'environnement.

Utilisés depuis plusieurs années déjà pour la détection de l'infestation par E. multilocularis et plus récemment par E. granulosus chez les hôtes définitifs, les méthodes faisant appel aux techniques de la biologie moléculaire (PCR/ADN) sont actuellement utilisées comme moyens de diagnostic de l'infestation dans les laboratoires spécialisés.

Épreuves sérologiques : des anticorps dirigés contre les oncosphères, le liquide hydatique et des antigènes provenant du protoscolex peuvent être détectés dans le sérum des chiens et des moutons infestés. Cependant, cette approche a encore actuellement une portée pratique limitée car elle ne permet pas la distinction entre les infestations précédentes et celles qui sont toujours en cours. D'autre part, des réactions croisées existent entre les infestations par *Echinococcus* et celles dues aux différentes espèces de *taenia*.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : un progrès a été accompli suite à la mise au point d'un vaccin efficace contre le stade larvaire d'*E. granulosus* chez le mouton et le bovin.

A. INTRODUCTION

Les espèces du genre *Echinococcus* sont de petits taenias des carnivores ayant des stades larvaires (métacestodes) ou kystes hydatiques qui ont un cycle de prolifération asexué chez divers mammifères y compris l'homme. Quatre espèces distinctes au plan morphologique étaient décrites pour le genre *Echinococcus* jusqu'à ce qu'une nouvelle espèce, *Echinococcus shiquicus*, soit ajoutée récemment aux espèces préalablement existantes : *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthrus* et *E. vogeli*. *E. shiquicus* a été découverte dans le comté de Shiqu, sur le plateau Qinghai du Tibet, dans la région du Sichuan occidental, République Populaire de Chine (57, 58) ; elle est distincte des autres espèces au plan morphologique tant de l'adulte que des stades larvaires.

Des variantes inter et intraspécifiques ont été décrites pour *E. granulosus*. Quelques génotypes de cette espèce montrent des caractéristiques qui justifieraient, selon certains auteurs, leur identification en tant qu'espèces individualisées. D'autres espèces et génotypes d'*Echinococcus* ont été récemment proposés (51). Cependant, d'autres études sont encore nécessaires pour définir la gamme complète de la diversité génétique de ces parasites (32, 37, 43, 50). *E. granulosus* a une large répartition géographique, *E. multilocularis* est rencontrée dans de vastes régions de l'hémisphère Nord, *E. shiquicus* est retrouvée en République Populaire de Chine et, *E. oligarthrus* et *E. vogeli* sont confinées dans l'Amérique Centrale et l'Amérique du Sud. Les 5 espèces infestent l'homme chez lequel elles provoquent diverses formes d'hydatidose. L'hydatidose kystique, provoquée par les vésicules hydatiques d'*E. granulosus* et l'hydatidose alvéolaire, dues aux vésicules hydatiques d'*E. multilocularis* constituent un problème de santé publique considérable dans beaucoup de régions du monde (56).

Tableau 1. Caractéristiques utiles pour l'identification des espèces d'*Echinococcus*

	<i>E. granulosus</i>	<i>E. multilocularis</i>	<i>E. oligarthrus</i>	<i>E. vogeli</i>	<i>E. shiquicus</i>
Répartition	Cosmopolite	Région holoarctique	Région néotropicale	Région néotropicale	Plateau du Tibet
Hôte définitif	Chiens	Renards	Félins sauvages	Chien sauvage des buissons	Renard du Tibet
Hôte intermédiaire	Ongulés	Campagnols	Rongeurs néotropicaux	Rongeurs néotropicaux	Pika du plateau
Adulte					
Longueur du corps (mm)	2,0–11,0	1, 2–4,5	2, 2–2,9	3,9–5,5	1,3–1,7
Nombre de segments	2 à 7	2 à 6	3	3	2 à 3
Longueur des grands crochets (µm)	25,0–49,0	24,9–34,0	43,0–60,0	49,0–57,0	20,0–23,0
Longueur des petits crochets (µm)	17,0–31,0	20,4 –31,0	28,0–45,0	30,0–47,0	16,0–17,0
Nombre de testicules	25 à 80	16 à 35	15 à 46	50 à 67	12 à 20

Position du pore génital :

a. Segment mûr	Près du milieu	En avant du milieu	En avant du milieu	En arrière du milieu	Près du bord supérieur
b. Segment grvide	En arrière du milieu	En avant du milieu	Près du milieu	En arrière du milieu	En avant du milieu
Utérus grvide	Branchements latéraux	Sacciforme	Sacciforme	Tubulaires	Sacciforme
Métacestode	Uniloculaire dans les viscères	Multivésiculaire dans les viscères	Polykystiques dans les muscles	Polykystique dans les viscères	Uniloculaire dans les viscères

Source : Xiao et al. (58)

- ***Echinococcus granulosus***

C'est un parasite qui se transmet entre le chien et un certain nombre d'espèces d'ongulés domestiques ; le cycle chien/mouton étant le plus important. Des hôtes définitifs et intermédiaires sylvatiques peuvent également exister. C'est le cas, par exemple, du cycle renard/cervidés. Le ver adulte mesure 2 à 11 mm de long et possède, habituellement, 2 à 7 segments, avec une moyenne de 3 à 4. L'avant dernier segment est mûr et porte un pore génital ouvert, comme chez le segment grvide, dans sa moitié postérieure. Le segment grvide mesure habituellement plus que la moitié de la longueur totale du ver entier. La partie antérieure ou scolex est munie d'un rostre armé de 30 à 42 crochets de taille variable et disposés en 2 couronnes dont ceux de la première mesurent 25 à 49 µm et ceux de la deuxième 17 à 31 µm. Les caractères morphologiques des crochets et leur disposition sont utilisés dans l'identification morphologique de l'espèce. L'utérus grvide présente des formations sacciformes bien développées.

Le stade larvaire est un kyste opaque, tendu et élastique, rempli d'un liquide sous pression. Il est aussi connu sous le nom de vésicule hydatique d'*Echinococcus*. Ce kyste est dit uniloculaire, bien que ces compartiments puissent communiquer entre eux. Les vésicules hydatiques sont envahissantes et leur développement s'accompagne de la formation de vésicules-filles endogènes qui prennent naissance à partir des protoscolex de la membrane prolifère de la vésicule primitive. De diamètre variable et pouvant atteindre 30 cm, ces kystes sont fréquemment rencontrés dans le foie et les poumons, mais peuvent également se développer dans d'autres tissus et organes internes. Cette infestation larvaire est aussi connue sous le nom d'échinococcose kystique.

Les spécificités des souches d'*E. granulosus* pour les cycles domestiques classiques sont représentées par le type chien/mouton dans les régions Méditerranéennes, en Amérique du Sud (Argentine, Brésil, Chili, Pérou et Uruguay), en Afrique (Éthiopie, Kenya et Soudan), au Moyen Orient et les régions du Levant, la Russie, l'Asie Centrale (Kazakhstan, Kirghizistan et Ouzbékistan), la Mongolie, la République Populaire de Chine, l'Océanie et le Royaume-Uni ; le type chien/cheval en Belgique, en Irlande et au Royaume-Uni ; le type chien/bovin en Belgique, en Allemagne, en Afrique du Sud et en Suisse ; le type chien/porc en Pologne et le type chien ou loup/renne dans les régions sub-Arctiques de Norvège, de Finlande et de l'Alaska. Le statut de la souche chien/dromadaire nécessite encore des clarifications. Cette souche a récemment été identifiée comme responsable de cas humains en Argentine, au Népal, en République Populaire de Chine et en Iran (3, 19, 44, 59). À ce jour, à l'exception du génotype chien/cheval (G4) et des souches des cervidés finlandais (G10), tous les autres génotypes ont été reconnus infestant pour l'homme.

- ***Echinococcus multilocularis***

C'est un parasite qui se transmet essentiellement entre hôtes sauvages définitifs (ex. *Vulpes vulpes*, *V. ferrilata*, *V. corsac*, *Alopex lagopus*, *Canis latrans*) et les petits rongeurs arvicoles (campagnols et lemmings). Le ver adulte mesure 1,2 à 4,5 mm de long et possède habituellement 2 à 6 segments avec une moyenne de 4 à 5. L'avant dernier segment est mûr et le pore génital y est ouvert, comme pour le segment grvide, antérieurement à son milieu. L'utérus grvide présente des formations sacciformes. Le rostellum porte une première rangée de grands crochets mesurant 24,9 à 34,0 µm et une rangée intérieure de crochets plus petits mesurant 20,4 à 31,0 µm.

Le métacestode est un kyste polyvésiculaire se présentant comme un conglomérat de nombreuses petites vésicules de quelques millimètres de diamètre. Contrairement au kyste uniloculaire d'*E. granulosus*, celui d'*E. multilocularis* contient une matière gélatineuse, colloïde plutôt que liquide. La prolifération s'effectue par le bourgeonnement de vésicules-filles exogènes qui réalise une véritable infiltration des tissus avoisinants.

L'infestation par les larves d'*E. multilocularis* est communément appelée échinococcose alvéolaire. Enfin, aucune souche ou génotype distinct n'a encore été établi pour cette espèce, bien que des variations régionales au niveau continental aient été décrites (56).

Ce parasite zoonotique est retrouvé dans l'hémisphère nord où son cycle se réalise essentiellement dans la faune sauvage (25). Le cycle selvatique inclut le renard et de nombreuses espèces de rongeurs sauvages. Cependant, les coyotes, les chiens viverrins, les loups, les chats sauvages, les chiens et les chats domestiques (20, 27) peuvent servir d'hôtes définitifs tandis que les porcs, les chevaux, les primates et les humains peuvent être infectés en tant qu'hôtes intermédiaires (25).

- ***Echinococcus oligarthrus***

Les félidés sauvages néo-tropicaux (ex. *Felis concolor*, *F. jaguarundi*) sont les hôtes définitifs typiques d'*E. oligarthrus*, alors que les grands rongeurs (ex. *Dasyprocta* sp., *Cuniculus paca*) en sont les hôtes intermédiaires habituels. Le parasite adulte mesure 2,2 à 2,9 mm de long et comporte normalement 3 segments dont l'avant dernier est mûr et porte un pore génital en position antérieure à son milieu. Le segment gravidé présente un utérus montrant des formations sacciformes et un pore génital ouvert approximativement à son milieu. Cette espèce ne semble pas pouvoir atteindre le stade adulte chez le chien.

La vésicule hydatique d'*E. oligarthrus* est de type polyvésiculaire et remplie de liquide avec une tendance à la formation de nombreux compartiments qui paraissent cloisonnés. Le protoscolex porte un rostellum muni de crochets mesurant 25,9 à 37,9 µm. Ils sont décrits en détail et comparés avec ceux d'*E. vogeli* dans la section suivante. Le kyste mesure habituellement 5 cm de diamètre et est rencontré de préférence au niveau des organes internes et des muscles. À l'heure actuelle, peu de cas ont été rapportés chez l'homme. Il semble que le parasite ne devienne pas mature chez le chien.

- ***Echinococcus vogeli***

L'hôte définitif usuel d'*E. vogeli* est le chien sauvage des buissons (*Speothus venaticus*) d'Amérique du sud, mais le chien domestique est réceptif. Les hôtes intermédiaires sont représentés par de grands rongeurs tels que le paca (*Cuniculus paca*). Le parasite adulte mesure 3,9 à 5,5 mm de long et possède 3 segments dont l'avant dernier est mûr. Ce segment et le segment gravidé portent un pore génital situé au niveau de leur milieu. Le segment gravidé ne comporte pas de saccules latéraux et est caractérisé par sa forme relativement longue et tubulaire par rapport aux autres segments qui sont sacciformes.

La vésicule hydatique d'*E. vogeli* est similaire à celui d'*E. oligarthrus*. Il a été rapporté que les deux espèces peuvent être différenciées en comparant les tailles et les proportions des crochets que portent les protoscolex. Les grands et les petits crochets d'*E. oligarthrus* mesurent respectivement 25,9 à 37,9 µm (moyenne 33,4 µm) et 22,6 à 29,5 µm (moyenne 25,45 µm), alors que ceux d'*E. vogeli* mesurent 19,1 à 43,9 µm (moyenne 41,64 µm) et 30,4 et 36,5 µm (moyenne 33,6 µm) respectivement. D'autre part, par rapport à la longueur des crochets, la garde représente la moitié chez *E. oligarthrus* (50:50) et un peu moins du tiers (30:70) chez *E. vogeli*.

Echinococcus. vogeli est l'agent d'une zoonose dont une centaine de cas environ ont été rapportés chez l'homme en Amérique du sud. L'infestation due au stade larvaire est connue sous le nom d'échinococcose polykystique.

- ***Echinococcus shiquicus***

Le parasite a été trouvé chez un renard du Tibet (*Vulpes ferrilata*) qui est son hôte définitif et chez le pika des plateaux (*Ochotona curzoniae*) qui est son hôte intermédiaire. Dans la plupart des espèces d'*Echinococcus*, le segment gravidé est connecté au segment mûr ; mais cette espèce présente une particularité unique : un strobile consistant en seulement 2 segments (un segment gravidé directement attaché à un segment pré-mature) (56). Le stade adulte est semblable au plan morphologique à celui de *E. multilocularis*, à l'exception de crochets plus petits, de la présence de moins de segments, de la position supérieure du pore génital dans le segment pré-mature et de la présence de moins d'œufs dans le segment gravidé. On peut facilement le distinguer de *E. granulosus* car il est plus petit, son utérus ne comporte pas d'embranchement et par la position antérieure du pore génital dans le segment gravidé. L'adulte mesure de 1,3 à 1,7 mm.

Le métacestode est retrouvé dans le foie ; il s'agit d'un mini-kyste uniloculaire contenant des vésicules-filles pleinement développées ; cependant, des formes avec peu de vésicules ont aussi été décrites. Il se différencie d'*E. granulosus* qui n'a pas de vésicules filles dans le kyste fertile (56).

Le manuel de l'OMS/OIE sur l'échinococcose (56) présente une description détaillée de l'hydatidose humaine et animale.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

Chez l'hôte intermédiaire, le diagnostic est basé sur la détection des vésicules hydatiques d'*Echinococcus* qui peuvent être rencontrées dans n'importe quel organe et tissu. Cependant, le foie et les poumons sont les organes les plus souvent affectés. Le diagnostic de l'échinococcose chez le chien et les autres carnivores est basé sur la découverte de cestodes adultes d'*Echinococcus* spp. dans leurs fèces ou dans leur intestin grêle suite à des autopsies, ou sur la mise en évidence d'antigènes spécifiques dans leurs fèces (copro-antigènes ou copro-ADN).

Le personnel qui recherche *Echinococcus* spp. dans les fèces ou dans l'intestin grêle est exposé au risque d'infestation par des agents responsables de maladies très graves pouvant être mortelles. Ce risque doit être réduit au minimum en suivant les procédures appropriées suivantes. Le matériel infestant peut être rendu inoffensif par une congélation de 48 h à une température atteignant -80°C au cœur du matériel congelé, ou de 4 jours à -70°C dans les mêmes conditions, ou enfin par chauffage à 70°C pendant 12 h (41, 45). L'opérateur doit porter en permanence des masques, des gants jetables et un tablier imperméable. Bien que l'hypochlorite de sodium puisse détruire une certaine proportion d'œufs (8), la désinfection chimique reste non fiable. Le matériel souillé doit être détruit par la chaleur ; l'eau chaude à une température supérieure ou égale à 80°C est très efficace. La décontamination des laboratoires peut être réalisée à un taux d'humidité plus réduit (40 %) combiné à une température ambiante plus élevée (30°C) pendant au moins 48 h.

a) Diagnostic des œufs d'*Echinococcus* dans l'environnement

- Échantillons de fèces (22, 49)

La séparation des fèces/œufs et la concentration des œufs d'*Echinococcus* est réalisée par une solution saturée : un prélèvement de fèces de 0,5 à 2 g est mélangé dans de l'eau ou une solution à 1 % de formol et 0,3 % de Tween 20 (42), dans un tube de 10 à 15 ml et centrifugé (1 000 g pendant 10 min.) une ou deux fois jusqu'à l'obtention d'un surnageant clair. Le sédiment est mélangé soit avec du sulfate de zinc à 33 % (1,18 sp. Gr) soit avec une solution de sucrose (1,27 sp. Gr.) et centrifugé à 1 000 g pendant 5 à 10 min. Le tube est complètement rempli et recouvert d'une lamelle. La lamelle est examinée au microscope entre 2 et 16 h plus tard.

- Échantillons de sol (35)

Un échantillon de sol (20 g) est placé dans un tube conique de 50 ml dans lequel sont ajoutés 40 ml d'une solution à 0,05 % de Tween 80. Le mélange est agité vigoureusement et passé sur un filtre de 100 μm . La suspension est centrifugée à 1 000 g pendant 5 min et le surnageant est éliminé. La suite de la procédure est la même que celle suivie pour l'examen des échantillons de fèces.

b) Diagnostic de l'échinococcose larvaire

- Autopsie

Alors que la surveillance des vésicules hydatiques d'*E. granulosus* peut avoir lieu dans les abattoirs, celle des vésicules hydatiques d'*Echinococcus* spp. chez les animaux sauvages doit être réalisée par des enquêtes sur le terrain. Les spécimens isolés des tissus doivent être fixés dans du formol à 4 % ou réfrigérés à 4°C pour un examen rapide, et congelés à -20°C pour un examen ultérieur. Lors d'une enquête de surveillance des hôtes intermédiaire de *E. granulosus*, il est extrêmement important que les données soient stratifiées et rapportées en fonction de l'âge des animaux autopsiés. Les taux de prévalence sont très dépendants de l'âge (53) et les rapports des abattoirs où ne sont abattus que de jeunes animaux peuvent sous-estimer la situation réelle. Cela est dû au fait que les vieux animaux peuvent être très sévèrement infestés même quand ils n'abritent que très peu de larve.

Chez les animaux tels que le mouton et le bovin, les vésicules hydatiques d'*Echinococcus* peuvent être rencontrées dans divers organes et tissus. La palpation et/ou l'incision doivent être effectuées pour les mettre en évidence. Le porc, le bovin, le mouton et la chèvre peuvent être infestés par les larves de *Taenia hydatigena* qui sont, dans certains cas, difficiles à distinguer des vésicules hydatiques d'*Echinococcus* spp. lorsque ceux-ci parasitent le foie. Chez les animaux sauvages, tels que les ruminants et les rongeurs, le diagnostic différentiel est à faire avec plusieurs autres larves de cestodes.

Le matériel fixé par du formol peut être coloré en utilisant les techniques histologiques conventionnelles. La présence d'une couche stratifiée sans formation cellulaire, positive à la coloration de Schiff par l'acide périodique (PAS), sous-tendant un tissu connectif, avec ou sans la présence d'une membrane interne germinative, cellulaire et nucléée, peut être considérée comme une caractéristique spécifique des larves d'*Echinococcus* spp. La présence de protoscolex dans les vésicules-filles ou dans le « sable » du liquide échinococcique constitue également un critère de diagnostic pour le genre. L'identification génétique

d'*E. granulosus* ou *E. multilocularis* est habituellement faite en analysant l'ADN extrait de protoscolex ou de tissus larvaires (membrane germinative), réfrigérés, congelés ou conservés dans l'éthanol à 90 %.

c) Diagnostic de l'infestation des carnivores (hôtes définitifs)

• Autopsie

Alors qu'elle n'est utilisée dans les travaux portant sur l'infestation des carnivores domestiques que si leur euthanasie est humainement acceptée, l'autopsie est invariablement utilisée dans les études de l'échinococcose hydatique chez les carnivores sauvages. Le fait que l'examen des fèces dans les conditions normales ne puisse permettre la distinction entre les œufs d'*E. granulosus* de ceux des taeniidés, rend nécessaire l'isolement et l'identification des *Echinococcus* spp. adultes. Les œufs d'*E. granulosus* et d'*E. multilocularis* peuvent maintenant être distingués des œufs de taeniidés par la réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR).

L'intestin grêle est prélevé aussitôt que possible après la mort puis ligaturé à ses 2 extrémités. Le matériel non congelé ou non fixé dans du formol (4 à 10 %) doit être examiné rapidement car les parasites subissent une lyse dans les 24 h. Le formol ne tue pas les œufs. L'organe est divisé en plusieurs parties qui sont en suite immergées dans du sérum physiologique (0,9 % de NaCl) porté à 37 °C puis ouvertes longitudinalement. Les parasites fixés sur la muqueuse doivent être recherchés et comptés sous la loupe (pour *E. granulosus* et *E. vogeli*). Pour dénombrer les *Echinococcus* spp., il est nécessaire de diviser l'intestin en 4 à 6 portions, les ouvrir longitudinalement puis les immerger dans du sérum physiologique (0,9 % de NaCl) pendant 30 min à 37 °C afin de détacher les parasites. Le contenu de chaque portion est lavé dans un récipient où l'on recueille aussi le produit de raclage de la muqueuse avec une spatule. Les produits de lavage et de raclage sont laissés sédimentés puis lavés à travers un tamis pour éliminer le maximum de débris et de particules et le rendre inoffensif. Le produit obtenu est placé dans un plateau à fond noir puis les parasites sont dénombrés sous une loupe. Chez le chien, *E. granulosus* est rencontré essentiellement dans le tiers antérieur de l'intestin grêle et *E. multilocularis* dans les parties moyennes ou postérieures.

L'autopsie est considérée comme la méthode de diagnostic la plus fiable pour le diagnostic d'*E. multilocularis* chez les hôtes définitifs. Il s'agit d'une technique économique pour déterminer la prévalence dans une population et du meilleur moyen pour calculer la charge parasitaire. En raison de la résistance des œufs d'*E. multilocularis* à une congélation de -50 °C, les carcasses ou les intestins des hôtes définitifs destinés à la recherche des parasites doivent subir une forte congélation atteignant -70 °C à -80 °C pendant 3 à 7 jours avant l'autopsie, afin de tuer tous les œufs.

Méthodes de détermination quantitative d'*E. multilocularis* dans l'intestin de l'hôte définitif.

• Sédimentation et technique de comptage (16, 21)

Cette technique peut être considérée comme la référence (*gold standard*) pour évaluer la sensibilité et la spécificité des autres techniques.

- i) L'intestin grêle est incisé longitudinalement et découpé en segments de 20 cm de long ou en 5 sections ayant approximativement la même longueur. Ces segments sont placés dans un flacon contenant 1 litre de sérum physiologique (0,9 % de NaCl).
- ii) Le flacon est agité vigoureusement pendant plusieurs secondes puis les sections d'intestin sont retirées. La couche superficielle de la muqueuse est retirée en exerçant une pression entre le pouce et l'index pour détacher les vers qui y sont attachés.
- iii) Le flacon est laissé sédimenter pendant 15 min. puis le surnageant est retiré. Le flacon est de nouveau rempli avec du sérum physiologique. La procédure est répétée 2 à 6 fois jusqu'à l'obtention d'un surnageant sans aucune particule colorée.
- iv) De petites fractions du sédiment (5 à 10 ml) placées dans des boîtes de plastique rectangulaires ou dans des boîtes de Petri sont examinées au stéréomicroscope (grossissement × 120), à l'aide d'une grille de comptage (9 × 9 cm).
- v) Si moins de 100 vers sont trouvés, la totalité du sédiment est vérifiée ; si un nombre supérieur est trouvé le fardeau parasitaire est calculé sur la base d'un sous-échantillon.

• Technique de raclage de la muqueuse intestinale (12, 17)

- i) Des raclages profonds de la muqueuse sont effectués à égale distance les uns des autres sur l'intestin grêle à l'aide d'une lame de microscope (75 × 25 × 1 mm). Il est recommandé de réaliser cet examen 5

fois pour chaque tiers (proximal, milieu, distal) de l'intestin grêle (15 au total sont recommandées). Le produit de raclage est récupéré dans une boîte de Petri.

- ii) Les produits de raclage sont écrasés entre deux lames et examinés au stéréomicroscope (x 120). Trois lames sont placées dans une boîte de plastique et examinées. *Echinococcus multilocularis* est rencontré essentiellement dans la deuxième moitié de l'intestin grêle.

- **Technique « d'agitation dans un flacon » (15)**

- i) On utilise un flacon de plastique (1 litre) dont le bouchon à vis présente un orifice central de 6 à 7 cm de diamètre. L'orifice est recouvert d'un filtre en acier de bonne qualité (taille des mailles du filtre : 500 µm) soudé sur le plastique à l'aide d'un anneau en fer. Une pâte au silicone est appliquée pour sceller les bords du filtre en acier.
- ii) L'intestin grêle ouvert tout du long et la totalité de son contenu sont déposés dans le flacon ; le flacon est rebouché et rempli avec de l'eau.
- iii) Le flacon est renversé et secoué ; l'eau est décantée. Le flacon est à nouveau rempli d'eau et le processus est renouvelé jusqu'à ce que l'eau décantée soit devenue claire.
- iv) Le flacon rempli à moitié d'eau est ouvert et l'intestin grêle est retiré. L'intestin est pressé entre le pouce et l'index pour déloger les parasites accrochés à la muqueuse et les faire tomber dans le flacon.
- v) Le flacon est refermé, rempli et secoué une dernière fois pour éliminer le plus d'eau possible.
- vi) Le sédiment qui reste dans le flacon est transvasé dans une fiole de 1 litre qui est conservée à 4 °C. Dans le cas d'un délai d'attente prolongé, il convient d'ajouter du sérum physiologique (0,9 % de NaCl) afin d'éviter une déformation des parasites.
- vii) Lors de l'analyse, le matériel est placé dans une boîte de Petri et examiné au stéréomicroscope comme précédemment.

- **Conservation des spécimens**

Les parasites adultes du genre *Echinococcus* sont fragiles et nécessitent, pour étudier leur morphologie d'être maintenus dans du sérum physiologique et de les manipuler avec une pipette Pasteur. Après un lavage avec du sérum physiologique, les parasites sont laissés dans celui-ci pendant 30 min environ pour que cessent leurs mouvements. Ils sont ensuite placés dans une solution froide (5 °C) de formol à 5 ou 10 % ou dans la solution de fixation FAA [éthanol à 95 % (80 ml), formol à 37 ou 40 % (10 ml) et acide acétique glacial (5 ml)] où ils sont laissés pendant 12 h. Pour les colorer, les vers doivent être préalablement lavés dans de l'eau pendant 15 min puis placés dans de la paracarmin de Mayer [acide carminique (1,0 g), chlorure d'aluminium (0,5 g), chlorure de calcium (4,0 g) et éthanol à 70 % (100 ml)] pendant 12 à 24 h. L'excès de colorant est éliminé par immersion pendant quelques secondes dans une solution d'acide chlorhydrique 0,5 à 1,0 %. La déshydratation est obtenue grâce à une série de passages de 15 min au moins dans chacune des solutions d'alcool à concentration croissante (41, 50, 70, 85, 95 et 100 %), avec deux passages pour la concentration à 100 %. L'alcool est éliminé grâce par un séjour de 10 min dans du xylol qui est éliminé avec du salicylate de méthyle ou du créosote. Avant de les monter dans un milieu convenable tels que le balsame, la picolyte, etc., les spécimens doivent être remis dans du xylol pendant quelques minutes. Les personnes qui réalisent ces manipulations doivent être soumises à des examens sérologiques annuels recherchant des anticorps anti-*Echinococcus* (56).

Des méthodes ont, récemment, été mises au point dans le but de simplifier et d'améliorer aussi bien les investigations épidémiologiques sur les hôtes définitifs que le diagnostic de l'infestation du vivant de ceux-ci. Elles sont basées sur la détection des antigènes parasitaires dans les fèces (copro-antigènes), ou de l'ADN des vers par la PCR (voir ci-dessous).

d) **Enquête et surveillance utilisant le test à l'arécoline**

Alors que l'arécoline a été abandonnée dans le traitement des infestations des populations canines par les cestodes au profit du praziquantel, ce ténifuge est encore utilisé dans les enquêtes sur les infestations par ces parasites. C'est un agent parasymphatomimétique qui provoque une sudation, une stimulation des glandes salivaires, gastriques et intestinales, et une augmentation du tonus de l'intestin et de la motricité de ses muscles lisses ; effets qui sont responsables de la purgation. Cette substance, qui est détoxifiée au niveau du foie, exerce également sur les vers une action directe non létale mais paralysante ; ce qui provoque leur détachement de la muqueuse intestinale. Il est donc nécessaire de l'administrer par voie orale. Ainsi, la purgation s'accompagne de l'expulsion des vers avec les fèces. Cette technique convient particulièrement pour les enquêtes de base. Cependant, 15 à 25 % des chiens ne répondent pas à cette purgation. L'arécoline peut aussi être utilisée pour purger les chiens infestés par *E. multilocularis*. L'intérêt

de la technique réside dans le fait que les vers expulsés peuvent être identifiés morphologiquement. Les produits renfermant de l'arécoline ne sont plus disponibles en tant qu'anthelminthique, mais peuvent être obtenus chez les sociétés qui fournissent des produits chimiques. En raison de ses effets secondaires, la purgation à l'arécoline est à proscrire chez les animaux débilisés, trop âgés et les chiennes gestantes. À la dose de 4 mg/kg, la purgation se produit dans les 30 min. La marche, le massage abdominal chez les chiens ne répondant pas, ou le lavement chez ceux présentant une constipation, permettent d'éviter une deuxième purgation, qui peut être réalisée éventuellement à la dose de 2 mg/kg, mais à laquelle on ne fait appel que de façon exceptionnelle.

Les chiens purgés avec succès évacuent d'abord des fèces qui peuvent être ignorées (ou collectées pour être examinées ultérieurement au laboratoire comme décrit ci-dessous), puis du mucus qui peut renfermer les vers. Ce mucus est divisé en plusieurs échantillons qui sont examinés séparément. La mise en évidence des vers restant difficile dans ce mucus, les échantillons (4 ml environ) sont dilués dans 100 ml d'eau puis recouverts d'une mince couche (1 ml) de paraffine et, enfin, bouillis pendant 5 min. La paraffine prévient la formation d'écume et réduit le dégagement d'odeur.

Les opérateurs qui exécutent ces techniques sont exposés au risque d'infestation et d'être atteints d'une maladie grave. Ils doivent porter des combinaisons couvrant le corps entier, des bottes, des gants à usage unique et des masques. Après usage, les combinaisons doivent être lavées à l'eau bouillante, les bottes désinfectées avec une solution d'hypochlorite de sodium à 10 %. Les déjections doivent être bouillies le plus tôt possible après le prélèvement. D'autre part, les chiens pouvant continuer à évacuer des œufs, des proglottides et des vers, il est nécessaire de les garder attachés durant les 2 h qui suivent la purgation en leur fournissant de l'eau à volonté. Enfin, après le test, une petite quantité d'essence est déversée sur le sol où ont séjourné les chiens examinés puis est enflammée.

e) Les tests recherchant les antigènes dans les matières fécales (copro-antigènes)

La détection des antigènes parasitaires dans les fèces en utilisant une méthode immuno-enzymatique (ELISA) ou « copro-antigènes ELISA » constitue une alternative au test d'arécoline. C'est un test prometteur car les copro-antigènes peuvent être détectés relativement tôt (10 à 14 jours) après l'infestation et leur taux diminue rapidement après l'expulsion des parasites. La sensibilité et la spécificité de ce test ont été estimées à 70 % et 98 % respectivement (2, 5, 8, 12, 13).

Il est vrai que le test d'arécoline fournit des résultats qualitatifs et quantitatifs et reste utile pour les études épidémiologiques de base en permettant les comparaisons entre les taux d'infection par les taeniidés chez les chiens. Il est, cependant, possible que des études montrent que, du point de vue coût, la détection des copro-antigènes soit plus intéressante que le test d'arécoline pour la surveillance de routine d'*E. granulosus* dans les populations canines (6).

Des tests ELISA recherchant les copro-antigènes spécifiques et ayant une spécificité et une sensibilité suffisantes pour remplacer le test d'arécoline pour détecter *Echinococcus* chez le chien et d'autres hôtes définitifs ont été mis au point (8). En recherchant les copro-antigènes spécifiques du genre *Echinococcus*, la spécificité du test est aux environs de 98 % et sa sensibilité globale est approximativement de 70 % ; mais si la charge parasitaire est supérieure à 50-100, la sensibilité approche les 100 % (2, 8, 9, 13). Des chiens domestiques, des chiens sauvages (dingos), des renards et des loups ont été testés avec succès en utilisant le test ELISA pour détecter les copro-antigènes. Ce qui est également important est que ce test détecte aussi des infestations du renard commun et du chien domestique par *E. multilocularis* (13, 46). Lorsque le test copro-antigènes ELISA utilise des anticorps anti-sécrétoires/excrétoires ou anti-somatiques de proglottides d'*E. granulosus*, la sensibilité envers l'infestation par *E. multilocularis* serait réduite, mais la sensibilité envers le genre demeurerait intacte. Cette technique, mise au point à l'origine pour détecter des copro-antigènes d'*E. multilocularis*, montre également une importante sensibilité et une spécificité atteignant 80 % vis-à-vis d'*E. granulosus* en utilisant des anticorps poly- ou monoclonaux (11, 44). Cependant, pour les charges parasitaires faibles (<50), sa sensibilité vis-à-vis d'*E. multilocularis* devient inférieure à celle de la méthode utilisant l'examen des produits de raclage de la muqueuse intestinale lors des autopsies (11).

La nature exacte des antigènes d'*Echinococcus* détectés dans les fèces n'a pas été complètement identifiée. Cependant, leur stabilité dans une solution de formol à 5 % après ébullition et leur sensibilité au traitement au périodate suggèrent la participation d'antigène(s) d'hydrate de carbone de grande taille (>150 KDa) avec des résidus de α -D-mannose, α -D-glucose, β -galactose et N-acétyl- β -glucosamine (8, 18).

Les copro-antigènes d'*Echinococcus* peuvent être détectés avant la production d'œufs ; ce qui indique qu'ils ne sont pas liés aux antigènes venant de ces derniers (13, 44). Ceci présente l'avantage de détecter l'infestation durant la période prépatente. D'autre part, les copro-antigènes retrouvent leur niveau d'avant l'infestation dans les 5 jours qui suivent le traitement anthelminthique (13). Et encore plus important, cette technique réduit le risque d'exposition du personnel à des œufs potentiellement dangereux comme c'est le cas avec la purgation ou l'autopsie (26).

Le test copro-antigènes ELISA représente une alternative spécifique et pratique pour palier les inconvénients des autopsies de renards (qui restent laborieuses) pour rechercher l'infestation par *E. multilocularis*. Les échantillons de fèces de renards doivent être prélevés au niveau du rectum (mieux qu'au niveau de l'intestin grêle). Les copro-antigènes restent stables dans les fèces de renards ou de chiens conservées à 20 °C (et dans les fèces congelées de chien) pendant une semaine. Ce test a également été utilisé avec succès pour évaluer l'efficacité du traitement de renards sauvages infestés par *E. multilocularis* avec du praziquantel sous forme d'appâts, ce qui s'est révélé une méthode efficace d'élimination de la source d'infestation (24).

- **Protocole pour la recherche des copro-antigènes d'*E. granulosus* (2, 9)**

- i) L'échantillon de fèces (collecté au niveau du rectum ou sur le sol) est mis dans un tube jetable de 5 ml et pourvu d'un bouchon. On y ajoute un volume égal de solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS), pH 7,2 contenant 0,3 % de Tween 20 (PBST). Après avoir bien agité, le mélange est centrifugé à 2 000 *g* pendant 20 min à la température ambiante. Le surnageant peut-être utilisé immédiatement ou conservé à –20 °C au moins. Les surnageants qui apparaissent foncés ou visqueux sont aussi utilisables.
- ii) Les puits d'une plaque de microtitrage ELISA de 96 puits (Immulon # 4, Thermo Electron Corporation) sont recouverts par la fraction IgG A purifiée d'un sérum immun de lapin dirigé contre un extrait de proglottides d'*E. granulosus* à une concentration optimale (habituellement 5 µg/ml) (2) dans 0,05 M du tampon carbonate/bicarbonate à pH 9,6 (100 µl/puits). La plaque est recouverte puis incubée à 4 °C pendant une nuit.
- iii) Les puits sont rincés 3 fois avec du PBST à 1 min d'intervalle. Chaque puits reçoit ensuite 100 µl du même tampon puis la plaque est incubée à la température ambiante pendant 1 h.
- iv) Le PBST est ensuite éliminé et chaque puits reçoit 50 µl de sérum fœtal de veau. Ensuite, 50 µl. du surnageant de l'échantillon de fèces sont ajoutés (2 puits par échantillon). La plaque est recouverte d'un film adhésif puis incubée pendant 1 h à la température ambiante.
- v) Les puits sont rincés comme dans l'étape iii, mais les contenus sont ajoutés à une solution à 10 % d'hypochlorite (agent blanchissant).
- vi) Une dilution optimale (concentration d'environ 1 µg/ml) de l'IgG de lapin anti-extrait de proglottides d'*E. granulosus* conjugué à la peroxydase dans du PBST est d'abord déterminée (2) puis 100 µl de la dilution obtenue sont ajoutés à chaque puits. La plaque est ensuite incubée pendant 1 h à la température ambiante (entre 22 °C et 24 °C).
- vii) Les puits sont ensuite rincés comme indiqué dans l'étape iii.
- viii) Chaque puits reçoit 100 µl d'un substrat de tetraméthyl de benzène (Laboratoires TMB, KPL) et la plaque est laissée à l'obscurité pendant 20 min à la température ambiante (entre 22 °C et 24 °C).
- ix) Pour arrêter la réaction, 100 µl d'acide phosphorique 1 M (H₃PO₄) sont ajoutés à chaque puits. La réaction est positive si la coloration vire du bleu au jaune. La lecture de la densité optique (DO), ou absorbance, au niveau des puits est réalisée à 630 nm.
- x) Les laboratoires doivent établir leurs critères déterminant le seuil de positivité en utilisant des témoins négatifs et positifs de référence. Ces derniers peuvent également être demandés aux Laboratoires de référence de l'OIE (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre*). Habituellement, le seuil positif/négatif est déterminé en ajoutant 3 fois la déviation standard à la moyenne des DO des témoins négatifs de référence, ou contre un positif de référence en utilisant l'équivalence des unités d'absorbance.

- **Protocole pour la recherche des coproantigènes d'*Echinococcus multilocularis* (39, 42)**

Le test est un ELISA sandwich utilisant un anticorps monoclonal EmA9 dirigé contre l'antigène somatique de *E. multilocularis* (28).

- i) 0,5 g de l'échantillon de fèces sont placés dans un tube à centrifuger et une solution à 1 % de formol et à 0,3 % de Tween 20 est ajoutée pour un volume total de 15 ml.
- ii) Après mélange, la suspension fécale est centrifugée à 1 200 *g* pour 10 min à température ambiante. Une fraction du surnageant est utilisée dans le test de recherche du copro-antigène.
- iii) Des plaques pour micro-titrage à fond plat (Immulon 600, Greiner, Allemagne) sont sensibilisées avec 50 µl/puits d'IgG de lapin dirigée contre les produits d'excrétion/sécrétion d'*E. multilocularis* adulte

(1 µg/ml) dans un tampon 0,05 M de NaHCO₃/Na₂CO₃ (pH 9,6) ; les plaques sont laissées une nuit à 4 °C.

- iv) Les plaques sont lavées 3 fois avec 250 µl/puits de tampon phosphate (pH 7,4) contenant 0,05 % de Tween 20 (PBST), et bloquées avec 100 µl/puits de sérumalbumine bovine à 1 % pendant 1 h à température ambiante (22 – 24 °C).
- v) Les plaques sont lavées 3 fois (avec un désinfectant contenant 10 % d'eau de Javel) et 50 µl de surnageant fécal sont ajoutés à chaque puits et les plaques sont incubées pendant 2 h.
- vi) Les plaques sont de nouveau lavées 4 fois et 0,5 µg/ml d'AcM biotinylés (dans une solution de tampon phosphate à 0,5 % de sérumalbumine bovine/0,5 % de caséine) sont ajoutés à chaque puits et les plaques sont incubées pendant 1 h.
- vii) Les plaques sont lavées 4 fois et le complexe streptavidine-peroxydase de raifort biotinylé (Amersham Life Science), dilué à 1/1000 dans du tampon phosphate à 0,5 % de sérumalbumine bovine/0,5 % de caséine est ajouté à chaque puits et les plaques sont incubées pendant 1 h.
- viii) Les plaques sont lavées 5 fois et 100 µl de la solution de substrat (20 mg de phénylènediamine [Wako] dans 50 ml de tampon phosphate à 0,1 M d'acide citrique) et 10 µl de H₂O₂ sont ajoutés à chaque puits.
- ix) Les plaques sont agitées immédiatement et placées dans une étuve à 37 °C pendant 30 min. La réaction est arrêtée en ajoutant 50 µl de H₂SO₄ (4 N) dans chaque puits. Les densités optiques (DO) sont lues à 490 nm.
- x) La valeur seuil est calculée comme la moyenne des DO plus 3 écarts-types des échantillons provenant d'animaux non infestés.

Cette procédure a aussi été utilisée sous forme d'un ELISA sandwich pour la détection des copro-antigènes de *E. granulosus* (45). Depuis 2008, un test d'agglutination avec billes de latex et un kit d'immunochromatographie (produit en laboratoire) utilisant l'AcM EmA9 sont disponibles pour la détection des copro-antigènes (23, 41).

f) Méthodes de détection de l'ADN

Hôtes définitifs : L'ADN dans les fèces s'est révélé utile pour le diagnostic de l'échinococcose chez les hôtes animaux définitifs. Cependant, l'extraction de l'ADN à partir des fèces est une opération fastidieuse.

La PCR est une technique coûteuse et délicate à réaliser. Elle est couramment utilisée essentiellement pour confirmer d'autres tests sur des échantillons positifs pour la recherche des copro-antigènes ou pour l'identification d'œufs de taenidés récupérés de fèces. Le Tableau 2 présente les différentes amorces pour la PCR utilisées pour la détection de l'ADN fécal chez les hôtes définitifs du genre *Echinococcus*.

Le diagnostic différentiel de l'infestation des hôtes définitifs par *E. granulosus* ou *E. multilocularis* peut être réalisé grâce à la détection spécifique de l'ADN d'œufs d'*E. multilocularis* présent dans les fèces par une PCR (4, 32). Il est recommandé en pratique de trier les hôtes définitifs (par ex. les renards) à l'aide du test des copro-antigènes et de confirmer avec la PCR. En Europe, l'infestation par *E. multilocularis* se rencontre en général dans les régions où *E. granulosus* n'est pas enzootique ou n'est pas souvent rencontrée. Dans d'autres parties du monde, comme certaines régions du Proche-Orient (Turquie et Iran), l'Asie centrale, la Russie et la République Populaire de Chine, ces deux espèces peuvent être trouvées simultanément (10). Des recherches portant sur l'intermittence et la durée de l'élimination de l'ADN parasite sont encore nécessaires dans les cas d'infestation par *E. multilocularis*. Récemment, une technique PCR a été mise au point pour détecter l'ADN d'*E. granulosus* dans les fèces (Copro-ADN) et pour la différenciation génotypique (36, 55).

En règle générale, la PCR est utilisée comme un test de confirmation et il est recommandé de concentrer les œufs par tamisage. L'extraction de l'ADN à partir de ces œufs peut être réalisée en suivant un protocole simplifié de la technique de lyse alcaline combinée à l'usage d'un kit disponible dans le commerce qui ne nécessite pas d'extraction avec des solvants organiques (30).

Tableau 2. Amorces pour PCR utilisées pour la détection de l'ADN fécal (copro-ADN)
(tableau réalisé sur la base de Mathis et Deplazes [34])

Désignation des amorces : séquences des amorces (5'–3')	Réf.	Cible - Commentaires
<i>E. multilocularis</i> GTG-AGG-CGA-TGT-GTG-GTG-ATG-GAG-AGA-AGG CAA-GTG-GTC-AGG-GGC-AGT-AG	4	Gène ARNs U1 : peut donner des produits non spécifiques quand utilisé sur un prélèvement de métacestode contenant de l'ADN de l'hôte (observation non publiée) Gène mitochondrial ARN 12S ; utilisé dans une PCR nichée à 2 tubes
Amorces externes : (P60 sens) TTA-AGA-TAT-ATG-TGG-TAC-AGG-ATT-AGA-TAC-CC (P375 anti-sens) AAC-CGA-GGG-TGA-CGG-GCG-GTG-TGT-ACC Amorces internes : (Pnest sens) ACA-ATA-CCA-TAT-TAC-AAC-AAT-ATT-CCT-ATC (Pnest anti-sens) ATA-TTT-TGT-AAG-GTT-GTT-CTA	14	Gène mitochondrial ARN 12S ; modifié par rapport à la référence 14 pour être utilisé dans une PCR nichée à 1 tube.
Amorces externes : (Em-1) TAA-GAT-ATA-TGT-GGT-ACA-GGA-TTA-GAT-ACC-C (Em-2) GGT-GAC-GGG-CGG-TGT-TGT-A Amorces internes : (Em-3) ATA-TTA-CAA-CAA-TAT-TCC-TAT-C (Em-4) ATA-TTT-TGT-AAG-GTT-GTT-CTA (EM-H15) CCA-TAT-TAC-AAC-AAT-ATT-CCT-ATC (EM-H17) GTG-AGT-GAT-TCT-TGT-TAG-GGG-AAG	54	Gène mitochondrial ARN 12S ; modifié par rapport à la référence 14 pour être utilisé dans une PCR simple
<i>E. multilocularis</i> et <i>E. granulosus</i> ND1 (NDfor2-) AGT-TTC-GTA-AGG-GTC-CTA-ATA (NDrev2-) CCC-ACT-AAC-TAA-CTC-CCT-TTC	38	Séquences répétées de la « souche ovine » de <i>E. granulosus</i> ; elle donne un profil de bandes en électrophorèse Gène mitochondrial ARN 12S ; spécifique de la « souche ovine » de <i>E. granulosus</i> Elle amplifie un fragment du gène <i>cox1</i> spécifique de <i>E. granulosus</i>
<i>E. granulosus</i> (Eg1121a) GAA-TGC-AAG-CAG-CAG-ATG (Eg1122a) GAG-ATG-AGT-GAG-AAG-GAG-TG	1	
(Eg1f) CATTAATGTATTTTGTAAGTTG (Eg1r) CAC-ATC-ATC-TTA-CAA-TAA-CAC-C	47	

Tableau 2 (suite). Amorces pour PCR utilisées pour la détection de l'ADN fécal (copro-ADN) (tableau réalisé sur la base de Mathis et Deplazes [34])

Désignation des amorces : séquences des amorces (5'–3')	Réf.	Cible – Commentaires
(EgO/DNA-IM1) sens TCA-TAT-TTG-TTT-GAG-KAT-YAG-TKC Anti-sens GTA-AAT-AAM-ACT-ATA-AAA-GAA-AYM-AC	40	
<i>E. multilocularis</i> , <i>E. granulosus</i> et <i>Taenia</i> spp. (JB11) AGA-TTC-GTA-AGG-GGC-CTA-ATA (JB12) AC-CAC-TAA-CTA-ATT-CAC-TTT-C (60.for.-mod) ATG-TGG-TAC-AGG-ATT-AGA-TAC-CC (375.rev.-mod) GGT-GAC-GGG-CGG-TGT-GTA-CC	52	Cestodes
(Eg1f) CAT-TAA-TGT-ATT-TTG-TAA-AGT-TG (Eg1r) CAC-ATC-ATC-TTA-CAA-TAA-CAC-C	52	<i>Echinococcus granulosus</i> (souche ovine)
(EM-H15) CCA-TAT-TAC-AAC-AAT-ATT-CCT-ATC (EM-H17) GTG-AGT-GAT-TCT-TGT-TAG-GGG-AAG	52	<i>E. multilocularis</i>
(Cest1) TGC-TGA-TTT-GTT-AAA-GTT-AGT-GAT-C (Cest2) CAT-AAA-TCA-ATG-GAA-ACA-ACA-ACA-AG	52	<i>E. multilocularis</i>
(Cest4) GTT-TTT-GTG-TGT-TAC-ATT-AAT-AAG-GGT-G	52	<i>E. granulosus</i>
(Cest5) GCG-GTG-TGT-ACM-TGA-GCT-AAA-C	52	<i>Taenia</i> spp.
(Cest3) YGA-YTC-TTT-TTA-GGG-GAA-GGT-GTG (Cest5) GCG-GTG-TGT-ACM-TGA-GCT-AAA-C (Cest5seq) GAT-TCT-TTT-TAG-GGG-AAG-G	52	<i>Taenia</i> spp. (amorce pour l'amplicon de 267 pb de la PCR multiplex)

Hôtes intermédiaires : les méthodes d'hybridation de l'ADN ne sont pas actuellement utilisées pour la détection des vésicules hydatiques d'*E. granulosus* chez les animaux d'élevage hôtes intermédiaires du parasite. Les méthodes moléculaires sont, par contre, d'une grande utilité pour les études épidémiologiques car elles permettent d'identifier les isolats ou les souches d'*E. granulosus* (37).

Elles le sont aussi pour identifier des kystes d'*E. multilocularis* de petite taille, dégénérés ou calcifiés chez des hôtes intermédiaires normaux ou chez des hôtes anormaux (33).

2. Épreuves sérologiques

a) Hôtes intermédiaires

Les épreuves sérologiques, qui sont d'une grande utilité chez l'homme, sont moins sensibles et moins spécifiques chez les animaux d'élevage et ne peuvent remplacer l'autopsie pour le moment (8, 30).

b) Hôtes définitifs

Un important programme de recherche a été engagé en vue de mettre au point des tests de diagnostic immunologique pour lutter contre l'échinococcose canine. L'intestin d'un chien qui ingère un kyste hydatique est exposé à des antigènes variés durant l'établissement du parasite et le développement de l'ovogenèse. Des anticorps dirigés spécifiquement contre les oncosphères et les protoscolex peuvent être détectés dans le sérum des chiens infectés. La recherche de ces anticorps n'est actuellement pas utilisée dans la pratique car elle ne permet pas encore de différencier une infestation en cours d'une infestation déjà terminée mais dont les anticorps témoins sont encore présents ; elle donne aussi des résultats faux-positifs lors d'infestations par des espèces de *Taenia*.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

1. Hôtes intermédiaires

L'usage d'un vaccin efficace pour réduire l'infestation hydatique du bétail aurait probablement un impact non négligeable sur la fréquence de transmission de l'infestation à l'homme (29). Comme *E. granulosus* appartient à la famille des taenias, beaucoup d'aspects de ses relations immunologiques avec son hôte intermédiaire sont semblables à celles qui existent dans les autres espèces de *Taenia*. En outre, on considère que l'approche consistant en la mise au point d'un vaccin utilisé contre les espèces de *Taenia* tel que les antigènes natifs protecteur de l'hôte de *T. ovis*, pourrait donner des résultats avec *E. granulosus*. En utilisant la technologie de l'ADN recombiné, le vaccin EG95 basé sur un antigène de l'oncosphère s'est révélé capable d'induire une protection de haut niveau contre une infestation expérimentale de moutons par *E. granulosus* (31).

L'université de Melbourne et AgResearch de Nouvelle-Zélande a octroyé une licence à une société commerciale de la République Populaire de Chine pour la commercialisation du vaccin EG95 (29).

2. Hôtes définitifs

En dépit d'une activité de recherche considérable entreprise dans le but de protéger les chiens contre l'échinococcose en utilisant des antigènes totaux, seulement des résultats limités ont été obtenus jusqu'à aujourd'hui. Cependant, des études récentes avec des antigènes recombinés de protoscole semblent donner des résultats encourageants (7). Les progrès dans ce domaine nécessitent des recherches fondamentales portant sur l'immunologie de la muqueuse intestinale lors de l'infestation par *Echinococcus*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ABBASI I., BRANZBURG A., CAMPOS-PONCE M., ABDEL HAFEZ S.K., RAOUL F., CRAIG P.S. & HAMBURGER J. (2003). Copro-diagnosis of *Echinococcus granulosus* infection in dogs by amplification of a newly identified repeated DNA sequence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **69**, 324–330.
2. ALLAN J.C., CRAIG P.S., GARCIA NOVAL J., MENCOS F., LIU D., WANG Y., WEN H., ZHOU P., STRINGER R., ROGAN M.T. & ZEYHLE E. (1992). Coproantigen detection for the immunodiagnosis of echinococcosis and taeniasis in dogs and humans. *Parasitology*, **104**, 347–355.
3. BART J.M., ABDUKADER M., ZHANG Y.L., LIN R.Y., WANG Y.H., NAKAO M., ITO A., CRAIG P.S., PIARROUX R., VUITTON D.A. & WEN H. (2006). Genotyping of human cystic echinococcosis in Xinjiang, PR China. *Parasitology*, **133**, 571–579.
4. BRETAGNE S., GUILLON J.P., MORAND M. & HOUIN R. (1993). Detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in fox faeces using DNA hybridization. *Parasitology*, **106**, 193–199.

5. BUIISHI I., NJOROG E. M., BOUAMRA O. & CRAIG P. (2005). Canine echinococcosis in northwest Libya: assessment of coproantigen ELISA, and a survey of infection with analysis of risk factors. *Vet. Parasitol.*, **130**, 223–232.
6. BUIISHI I., WALTERS T., GUILDEA Z., CRAIG P. & PALMER S. (2005). Re-emergence of canine *Echinococcus granulosus* infection, Wales. *Emerg. Infect. Dis.*, **11** (4), 568–571.
7. CHABALGOITY J.A., MORENO M., CAROL H., DOUGAN G. & HORMAECHI E. (2001). *Salmonella typhimurium* as a basis for a live oral *Echinococcus granulosus* vaccine. *Vaccine*, **19**, 460–469.
8. CRAIG P.S. (1997). Immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* and a comparison of techniques for diagnosis of canine echinococcosis. In: Compendium on Cystic Echinococcosis in Africa and in Middle Eastern Countries with Special Reference to Morocco, Andersen F.L., Ouhelli H. & Kachani M., eds. Brigham Young University Print Services, Provo, Utah, USA.
9. CRAIG P.S., GASSER R.B., PARADA L., CABRERA P., PARIETTI S., BORGUES C., ACUTTIS A., AGULLA J., SNOWDEN R. & PAOLILLO E. (1995). Diagnosis of canine echinococcosis: comparison of coproantigen and serum antibody tests with arecoline purgation in Uruguay. *Vet. Parasitol.*, **56**, 293–301.
10. CRAIG P.S., ROGAN M.T. & ALLAN J.C. (1996). Detection, screening and community epidemiology of taeniid cestode zoonoses: cystic echinococcosis, alveolar echinococcosis and neurocysticercosis. *Adv. Parasitol.*, **38**, 169–250.
11. DEPLAZES P., ALTHERR P., TANNER I., THOMPSON R.C.A & ECKERT J. (1999). *Echinococcus multilocularis* coproantigen detection by enzyme-linked immunosorbent assay in fox, dog and cat populations. *J. Parasitol.*, **85**, 115–121.
12. DEPLAZES P. & ECKERT J. (1996). Diagnosis of *Echinococcus multilocularis* infection in final hosts. *Appl. Parasitol.*, **37**, 245–252.
13. DEPLAZES P., GOTTSTEIN B., ECKERT J., JENKINS D.J., WALD D. & JIMENEZ-PALACIOS S. (1992). Detection of *Echinococcus* coproantigens by enzyme-linked immunosorbent assay in dogs, dingoes and foxes. *Parasitol. Res.*, **78**, 303–308.
14. DINKEL A., VON NICKISCH-ROSENECK M., BILGER B., MERLI M., LUCIUS R. & ROMIG T. (1998). Detection of *Echinococcus multilocularis* in the definitive host: coprodiagnosis by PCR as an alternative to necropsy. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 1871–1876.
15. DUSCHER G., PROSL H. & JOACHIM A. (2005). Scraping or shaking – a comparison of methods for the quantitative determination of *Echinococcus multilocularis* in fox intestines. *Parasitol. Res.*, **95**, 40–42.
16. ECKERT J. (2003). Predictive values and quality control of techniques for the diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in definitive hosts. *Acta Trop.*, **85**, 157–163.
17. ECKERT J., GEMMEL M.A., MESLIN F.X. & PAWLOWSKI Z.S. (EDS) (2001). WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern. World Organization for Animal Health (OIE), Paris, France, pp 265.
18. ELAYOUBI F.A. & CRAIG P.S. (2004). *Echinococcus granulosus* coproantigens: chromatographic fractionation and characterization. *Parasitology*, **128**, 455–465.
19. FASIHI HARANDI M., HOBBS R.P., ADAMS P.J., MOBEDI I., MORGAN-RYAN U.M. & THOMPSON R.C.A. (2002). Molecular and morphological characterization of *Echinococcus granulosus* of human and animal origin in Iran. *Parasitology*, **125**, 367–373.
20. HILDRETH M.B., SRIRAM S., GOTTSTEIN B., WILSON M. & SCHANTZ P.M. (2000). Failure to identify alveolar echinococcosis in trappers from South Dakota in spite of high prevalence of *Echinococcus multilocularis* in wild canids. *J. Parasitol.*, **86**, 75–77.
21. HOFER S., GLOOR S., MULLER U., MATHIS A., HEGGLIN D. & DEPLAZES P. (2000). High prevalence of *Echinococcus multilocularis* in urban red foxes (*Vulpes vulpes*) and voles (*Arvicola terrestris*) in the city of Zurich, Switzerland. *Parasitology*, **120** (Pt 2), 135–142.
22. ITO S. (1980). Modified Wisconsin sugar centrifugal-floatation technique for nematode eggs in bovine faeces. *J. Jpn Vet. Med. Assoc.*, **33**, 424–429.
23. KAMIYA M. (2007). Collaborative control initiatives targeting zoonotic agents of alveolar echinococcosis in the Northern Hemisphere. *J. Vet. Sci.*, **8** (4), 313–321.

24. KAMIYA M., LAGAPA J.T., NONAKA N., GANZORIG S., OKU Y. & KAMIYA H. (2006). Current strategies against *Echinococcus* zoonosis in Japan. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **25**, 1055–1066.
25. KAMIYA M., LAGAPA J.T. & OKU Y. (2007) Research on targeting sources of alveolar echinococcosis in Japan. *Comparat. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **30** (5–6), 427–48.
26. KAMIYA M., NONAKA N., GANZORIG S. & OKU Y. (2004). Effective countermeasures against alveolar echinococcosis in red fox population of Hokkaido, Japan. *In: Echinococcosis in Central Asia: Problems and Solutions*, Torgerson P. & Shaikenov B., eds. INTAS Network Project, Zurich, Switzerland and Almaty, Kazakhstan, 273–282.
27. KAPEL C.M., TORGERSON P.R., THOMPSON R.C. & DEPLAZES P. (2006). Reproductive potential of *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected foxes, dogs, raccoon dogs and cats. *Int. J. Parasitol.*, **36** (1), 79–86.
28. KOHNO H., SAKAI H., OKAMOTO M., ITO M., OKU Y. & KAMIYA M. (1995). Development and characterization of murine monoclonal antibodies to *Echinococcus multilocularis* adult worms and its use for the coproantigen detection. *Jpn J. Parasitol.*, **44**, 404–412.
29. LIGHTOWLERS M.W. (2006). Cestode vaccines: origins, current status and future prospects. *Parasitology*, **133**, S27–42.
30. LIGHTOWLERS M.W. & GOTTSTEIN B. (1995). Echinococcosis/hydatidosis: Antigens, immunological and molecular diagnosis. *In: Echinococcus and Hydatid Disease*, Thompson R.C.A. & Lymbery A.J., eds. CAB International, Wallingford, UK, 355–410.
31. LIGHTOWLERS M.W., LAWRENCE S.B., GAUCI C.G., YOUNG J., RALSTON M.J., MAAS D. & HEATH D.D. (1996). Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. *Int. J. Parasitol.*, **18**, 457–462.
32. LYMBERY A.J. (1995). Genetic diversity, genetic differentiation and speciation, in the genus *Echinococcus* Rudolphi 1801. *In: Echinococcus and Hydatid Disease*, Thompson R.C.A. & Lymbery A.J., eds. CAB International, Wallingford, UK, 51–87.
33. MATHIS A., DEPLAZES P. & ECKERT J. (1996). An improved test system for PCR-based specific detection of *Echinococcus multilocularis* eggs. *J. Helminthol.*, **70**, 219–222.
34. MATHIS A. & DEPLAZES P. (2006). Copro-DNA tests for diagnosis of animal taeniid cestodes. *Parasitol. Int.*, **55**, S87–90.
35. MATSUO K. & KAMIYA H. (2005). Modified sugar centrifugal flotation technique for recovering *Echinococcus multilocularis* eggs from soil. *J. Parasitol.*, **91**, 208–209.
36. McMANUS D.P. (2006). Molecular discrimination of taeniid cestodes. *Parasitol. Int.*, **55**, S31–S37.
37. McMANUS D.P. & BRYANT C. (1995). Biochemistry, Physiology and Molecular Biology of *Echinococcus*. *In: Echinococcus and Hydatid Disease*, Thompson R.C.A. & Lymbery A.J., eds. CAB International, Wallingford, UK, 135–182.
38. MOKS E., SAARMA U. & VALDMANN H. (2005). *Echinococcus multilocularis* in Estonia. *Emerg. Infect. Dis.*, **11**, 1973–1974.
39. MORISHIMA Y., TSUKADA H., NONAKA N., OKU Y. & KAMIYA M. (1999). Evaluation of coproantigen diagnosis for natural *Echinococcus multilocularis* infection in red foxes. *Jpn. J. Vet. Res.*, **46**, 185–189.
40. NAIDICH A., McMANUS D.P., CANOVA S.G., GUTIERREZ A.M., ZHANG W., GUARNERA E.A. & ROSENZVIT M.C. (2006). Patent and pre-patent detection of *Echinococcus granulosus* genotypes in the definitive host. *Mol. Cell. Probes*, **20**, 5–10.
41. NONAKA N., OKA M., KAMIYA M. & OKU Y. (2008). A latex agglutination test for the detection of *Echinococcus multilocularis* coproantigen in the definitive hosts. *Vet. Parasitol.*, (in press).
42. NONAKA N., TSUKADA H., ABE N., OKU Y. & KAMIYA M. (1998). Monitoring of *Echinococcus multilocularis* infection in red foxes in Shiretoko, Japan, by coproantigen detection. *Parasitology*, **117** (Pt 2), 193–200.
43. RAUSCH R.L. (1995). Life cycle patterns and geographical distribution of *Echinococcus* species. *In: Echinococcus and Hydatid Disease*, Thompson R.C.A. & Lymbery A.J., eds. CAB International, Wallingford, UK, 89–134.

44. ROSENZVIT M.C., ZHANG L.H., KAMENETZKY L., CANOVA S.G., GUARNERA E.A. & McMANUS D.P. (1999). Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Parasitology*, **118**, 523–530.
45. SAKAI H., NONAKA N., YAGI K., OKU Y. & KAMIYA M. (1998). Coproantigen detection in a survey of *Echinococcus multilocularis* infection among red foxes, *Vulpes vulpes schrencki*, in Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, **60**, 639–641.
46. SAKASHITA M., SAKAI H., KOHNO H., OOI H., OKU Y., YAGI K., ITO M. & KAMIYA M. (1995). Detection of *Echinococcus multilocularis* coproantigens in experimentally infected dogs using murine monoclonal antibody against adult worms. *Jpn J. Parasitol.*, **44**, 413–420.
47. STEFANIC S., SHAIKENOV B.S., DEPLAZES P., DINKEL A., TORGERSON P.R. & MATHIS A. (2004). Polymerase chain reaction for detection of patent infections of *Echinococcus granulosus* ('sheep strain') in naturally infected dogs. *Parasitol. Res.*, **92**, 347–351.
48. STIEGER C., HEGGLIN D., SCHWARZENBACH G., MATHIS A. & DEPLAZES P. (2002). Spatial and temporal aspects of urban transmission of *Echinococcus multilocularis*. *Parasitology*, **124** (Pt 6), 631–640.
49. THIENPONT D., ROCHETTE F. & VANPARIJS O.F.J. (1979). Diagnosing helminthiasis by coprological examination. Janssen Research Foundation, Beerse, Belgium.
50. THOMPSON R.C.A. (1995). Biology and systematics of *Echinococcus*. In: *Echinococcus* and Hydatid Disease, Thompson R.C.A. & Lymbery A.J., eds. CAB International, Wallingford, UK, 1–50.
51. THOMPSON R.C.A. & McMANUS D.P. (2002). Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol.*, **18**, 452–457.
52. TRACHSEL D., DEPLAZES P. & MATHIS A. (2007). Identification of taeniid eggs in the faeces from carnivores based on multiplex PCR using targets in mitochondrial DNA. *Parasitology*, **134**, 911–920.
53. TORGERSON P.R. & HEATH D.D. (2003). Transmission dynamics and control options for *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, **127**, S143–S158.
54. VAN DER GIESSEN J.W., ROMBOUT Y.B., FRANCHIMONT J.H., LIMPER L.P. & HOMAN W.L. (1999). Detection of *Echinococcus multilocularis* in foxes in The Netherlands. *Vet. Parasitol.*, **82**, 49–57.
55. VARCASIA A., CANU S., KOGKOS A., PIPIA A.P., SCALA A., GARIPPA G. & SEIMENIS A. (2007). Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in sheep and goats of Peloponnesus, Greece. *Parasitol. Res.*, **101**, 1135–1139.
56. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)/OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE) (2001). WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern, Eckert J., Gemmell, M.A., Meslin F.-X., Pawlowski Z.S., eds. OIE (World Organisation for Animal Health), Paris, France, 1–265.
57. XIAO N., QIU J., NAKAO M., LI T., YANG W., CHEN X., SCHANTZ P.M., CRAIG P.S. & ITO A. (2005). *Echinococcus shiquicus* n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. *Int. J. Parasitol.*, **35**, 693–701.
58. XIAO N., QIU J., NAKAO M., LI T., YANG W., CHEN X., SCHANTZ P.M., CRAIG P.S. & ITO A. (2006). *Echinococcus shiquicus*, a new species from the Qinghai-Tibet plateau region of China: Discovery and epidemiological implications. *Parasitol. Int.*, **55**, S233–S236.
59. ZHANG L.H., JOSHI D.D. & McMANUS D.P. (2000). Three genotypes of *Echinococcus granulosus* identified in Nepal using mitochondrial DNA markers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **94**, 258–260.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour l'Echinococcose/Hydatidose (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).