



chinote

numéro 4

NOVEMBRE 2014

.....
Diagnostic intestinal
d'*Echinococcus* spp. 2

.....
Du diagnostic à l'épidémiologie
moléculaire : le microsatellite
EmsB 2

.....
Diagnostic coprologique
d'*Echinococcus* spp. 3

.....
Diagnostic chez les hôtes
intermédiaires 4

.....
Quand la recherche de
champignon mène à
l'échinococcose... 4

Numéro réalisé par

l'Anses - laboratoire de la rage
et de la faune sauvage de Nancy

Laboratoire national de référence
Echinococcus spp.

Technopôle agricole et vétérinaire
CS 40009
54220 Malzéville Cedex

Rédaction

franck.boue@anses.fr
gerald.umhang@anses.fr

Documentation

marie-jose.duchene@anses.fr

Retrouvez-nous sur
www.anses.fr

Étant désormais familiarisés avec le monde merveilleux des échinocoques, vous aborderez sans difficulté ce quatrième numéro dédié aux méthodes de diagnostic chez l'animal. Nous vous ferons également part d'un cas atypique de diagnostic médical et de l'intérêt d'outils pour l'épidémiologie moléculaire. Afin d'aborder cela au mieux, vous trouverez d'abord un bref rappel étiologique. Après ingestion d'un hôte intermédiaire parasité, les vers se fixent entre les microvillosités de l'intestin des hôtes définitifs.

Leur développement jusqu'à la formation d'un segment ovigère mature va durer environ 27 jours pour *E. multilocularis* et 40 jours pour *E. granulosus*. Ce délai correspond à la période pré-patente durant laquelle aucun œuf n'est émis dans les fèces. Ensuite, la période patente de production des œufs dure environ 3-4 mois pour *E. multilocularis*, elle est *a priori* deux fois plus longue pour *E. granulosus*. Il faut noter qu'au cours de cette période l'émission des œufs dans les fèces n'est pas continue.

Chez ces hôtes naturels, le développement larvaire principalement dans le foie est rapide pour *E. multilocularis*, avec la production de protoscolex en 2-4 mois, probablement une adaptation à la courte durée de vie des rongeurs. A l'opposé, pour *E. granulosus*, le développement chez les animaux de rente dans le foie et/ou les poumons est plus long et variable.

Le risque zoonotique nécessite la mise en place de bonnes pratiques lors de la collecte

des échantillons et une phase de décontamination systématique par congélation pour la phase larvaire (kystes) et surgélation (-80°C) pour les intestins et fèces.

Le diagnostic post-mortem fait référence, il est cependant difficilement envisageable pour les animaux domestiques. L'analyse du contenu intestinal d'un carnivore repose sur l'identification par des critères morphologiques.

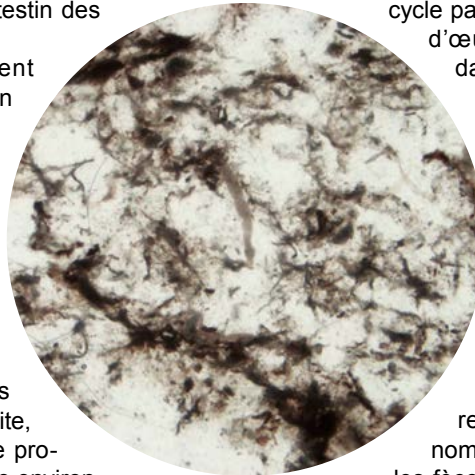
Les fèces contiennent les œufs du parasite qui constituent le seul stade libre du cycle parasitaire. La recherche

d'œufs d'échinocoques dans les fèces permet une identification de la contamination environnementale, source principale de la contamination humaine.

Une confirmation moléculaire du diagnostic est alors indispensable avec une complexification inhérente à la présence de nombreux inhibiteurs dans les fèces. La détection de copro-antigènes (principalement dus à

la desquamation des vers dans l'intestin) permet la détection dès la période pré-patente mais nécessite là aussi une confirmation moléculaire en raison d'une faible spécificité du test.

Le diagnostic des hôtes intermédiaires est réalisé principalement post-mortem par l'observation de kystes parasitaires généralement sur le foie et/ou les poumons. Il est généralement complété par une confirmation moléculaire de l'espèce. Les techniques d'imagerie médicales ou immunologiques permettent, quant à elles, un diagnostic *in vivo* utile pour les animaux domestiques.



Diagnostic intestinal d'*Echinococcus spp.*

Plusieurs méthodes existent pour le diagnostic intestinal d'*Echinococcus* chez les hôtes définitifs. Il s'agit principalement de variantes de la technique d'isolement des vers de la muqueuse intestinale, basées sur le principe d'observation directe dans le contenu intestinal des vers sous une loupe binoculaire (x120). Cette méthode de diagnostic permet l'observation de tous les stades de développement du ver, de la période pré-patente à patente. L'expérience du personnel technique et la bonne conservation des échantillons sont primordiales et permettent d'obtenir une spécificité proche de 100 %, la sensibilité étant, elle, dépendante de la technique utilisée.

« Le diagnostic intestinal permet l'observation de tous les stades du parasite »

La technique SCT de sédimentation et de comptage (Sedimentation and Counting Technique) est considérée comme le « gold standard » pour le diagnostic des échinocoques (Rausch *et al.* 1990, Hofer *et al.* 2000). Après ouverture longitudinale, l'intestin est coupé en segment (20 cm) et déposé dans un flacon d'eau. Après une forte agitation, pour chaque segment la muqueuse intestinale est raclée entre deux doigts au-dessus du flacon, sur toute sa longueur, dans un sens puis dans l'autre, afin de décrocher les parasites fixés. La solution du flacon est alors filtrée (maille 0,5 à 1 mm) et mise à sédimenter. Le culot est isolé, la lecture se faisant sur quelques millilitres du culot après dilution et homogénéisation. Après observation complète du sédiment, la charge parasitaire totale peut donc être obtenue. S'il est possible de détecter la présence d'un seul ver et donc d'avoir une sensibilité théorique de 100 %, cette technique demeure très longue et fastidieuse.

La technique de « scraping » intestinal (Intestinal Scraping Technique) dite IST, a permis de réduire les temps d'analyse et de lecture permettant de faciliter les études épidémiologiques à grande échelle (Deplazes et Eckert 1996). La muqueuse intestinale est raclée plusieurs fois avec une lame en verre puis transférée dans une boîte de Pétri pour observation. Bien plus rapide que la SCT, la sensibilité de l'IST est estimée à 75-80 % et diminue en cas de faibles charges parasitaires.

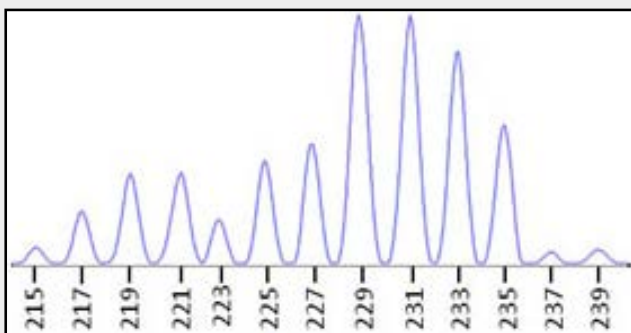
Récemment, la Segmental SCT (SSCT), une variante du SCT, a été validée par le Laboratoire national de référence avec l'aide de laboratoires vétérinaires départementaux pour la recherche d'*E. multilocularis* chez le renard (Umhang *et al.* 2011). Le principe du SSCT est de privilégier les zones de l'intestin où se localisent préférentiellement les vers. Ainsi, à partir d'un intestin découpé en 5 segments égaux, l'analyse du couple de segments 4 et 1 ou 4 et 2 permet d'obtenir une très forte sensibilité de 98,3 %.

Cette technique permet un gain de temps particulièrement important pour les échantillons négatifs qui sont les plus fréquents (prévalence vulpine généralement bien inférieure à 50 %) en réduisant de 60 % le temps d'analyse et de lecture. Cette technique est particulièrement adaptée pour les études à grandes échelles. La SSCT est actuellement utilisée par la Suède dans le cadre de la surveillance du parasite chez le renard et a permis le diagnostic des premiers cas positifs dans le pays.

Pour *E. granulosus*, cette technique n'est pas validée en raison du manque d'échantillons disponibles. Toutefois, même si la localisation préférentielle des vers est décrite dans la partie antérieure de l'intestin pour *E. granulosus*, une combinaison optimale d'un couple de segments devrait pouvoir être aisément définie avec une très forte sensibilité.

Du diagnostic à l'épidémiologie moléculaire : le microsatellite EmsB

À la suite du diagnostic, l'investigation de la diversité génétique peut permettre d'importantes avancées épidémiologiques à condition de disposer d'un outil moléculaire adapté. La faible variation génétique d'*E. multilocularis* nécessite un marqueur hautement polymorphique de type microsatellite. Le marqueur EmsB a été sélectionné car polymorphique, avec un profil non conventionnel composé de plusieurs pics, correspondant chacun à un locus différent dans le génome. Le profil EmsB généré est caractérisé par la taille de chaque pic (de 215 à 239 nucléotides) et par le nombre de copies amplifiées (hauteur des pics). Chaque profil est rationalisé pour être indépendant de la quantité d'ADN utilisée et donc comparable à d'autres échantillons. Très sensible, spécifique, reproductible, stable dans le temps et très discriminant, il possède toutes les qualités d'un marqueur moléculaire. Un seuil de distance génétique a été calculé en-dessous duquel on considère que deux échantillons ont le même profil. Le pouvoir discriminant a été testé sur un panel mondial d'ADN. Une discrimination génétique corrélée à l'origine géographique a ainsi pu être observée indépendamment du type d'hôte. Cette discrimination par la variation des profils permet un suivi de l'infection et l'élaboration de scénarios épidémiologiques à différentes échelles spatiales. Au niveau continental, la plus forte diversité génétique observée dans le foyer historique européen comparé à des zones périphériques plus récemment endémiques a notamment permis de définir une transmission du parasite basée sur un système île-continent (Knapp *et al.* 2009). Au niveau régional, l'identification de profils spécifiques conforte l'hypothèse d'un foyer autochtone au nord de l'Italie (Casulli *et al.* 2009). En France, un scénario spatio-temporel de l'expansion d'*E. multilocularis* de l'Est vers l'Ouest et le Nord a pu être élaboré (Umhang *et al.* 2014). A l'échelle micro-locale, l'observation d'un même profil chez tous les rongeurs d'un même champ en Alaska ou en Suisse a démontré l'absence d'hyper discrimination par ce marqueur.



Diagnostic coprologique d'*Echinococcus* spp.

Les œufs du parasite qui constituent le seul stade libre du cycle, sont régulièrement éliminés dans les fèces des hôtes définitifs. Ils constituent une cible de choix, non invasive, pour la mise en évidence de la contamination de l'environnement qui est la source principale des contaminations humaines. Les fèces ont l'avantage de pouvoir être collectées en plus grand nombre et plus facilement que les intestins ce qui autorise des études à plus grande échelle. Cette alternative non invasive permet de plus de disposer d'échantillons à partir d'animaux morts ou vivants mais aussi à partir de prospections et collectes dans l'environnement. Avec cette dernière option, il est alors indispensable d'identifier avec certitude l'espèce animale par observation macroscopique (caractéristique des fèces) ou par analyse moléculaire, afin d'aboutir à des conclusions épidémiologiques fiables. Contrairement à d'autres infections helminthiques, le diagnostic ne peut être réalisé par la simple observation des œufs par les méthodes coprologiques classiques, car les œufs de la famille des *Taenidae* dont fait partie le genre *Echinococcus* ne sont pas différenciables les uns des autres.

« Les œufs de la famille des *Taenidae* ne sont pas différenciables les uns des autres »

Dans les années 1990, plusieurs tests ELISA de détection de corpo-antigènes ont été développés voire commercialisés (Deplazes *et al.* 1999). Ils se basent sur la possibilité de détection dans les fèces d'antigènes d'échinocoques issus des produits d'excrétion-sécrétion ou de desquamation des vers. Décrits comme spécifiques, ces tests permettent la détection du parasite dès la période pré-patente et sont corrélés avec la charge parasitaire. La sensibilité est supérieure à 95 % pour des animaux infectés par plus de 100 vers, mais elle diminue aux environs de 85 % dès lors que la charge est inférieure. La sensibilité est comparable aux méthodes de « scraping » (IST) sans les inconvénients de l'autopsie, elle est généralement utilisée pour un diagnostic au niveau d'une population et non au niveau individuel.

Actuellement, seules quelques équipes étrangères disposent encore des méthodes de copro-antigène ELISA, car leurs utilisations nécessitent un savoir-faire et une maîtrise technique spécifique en particulier pour la préparation des antigènes. Les kits commerciaux ne sont plus disponibles, en raison de la difficulté des producteurs à maintenir cette qualité de production.

La seconde alternative est la PCR qui permet la détection dans les fèces de l'ADN parasitaire des œufs, des proglotides ou des cellules parasitaires. L'utilisation de la PCR était surtout orientée vers la confirmation, car elle était parfaitement adaptée à un diagnostic individuel, mais avec le développement et la démocratisation des outils moléculaires, la PCR peut désormais être utilisée dans des études coprologiques à grande échelle.

L'extraction de l'ADN réalisée directement sur plusieurs grammes de fèces nécessitait auparavant l'emploi de produits chimiques hautement toxiques et ne permettait pas une suppression des inhibiteurs de PCR. Une étape de concentra-

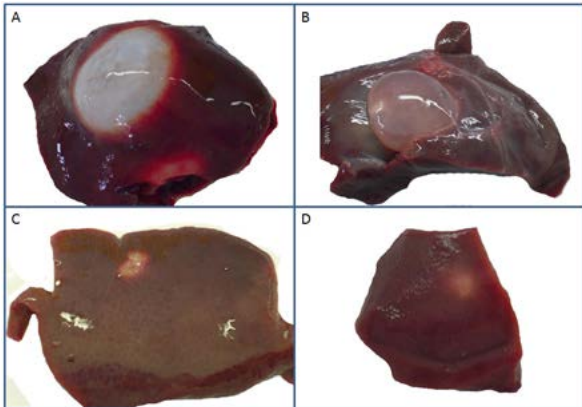
tion des œufs par flottaison réalisée en amont de l'extraction d'ADN permet un premier screening, peu coûteux même si fastidieux, des échantillons présentant des œufs de *Taenidae*. Le faible volume obtenu contenant les œufs est de ce fait beaucoup mieux adapté aux kits d'extraction commerciaux. Dédiés aux fèces, ces kits permettent une forte réduction de la présence des inhibiteurs. Toutefois, la présence de l'ADN de nombreux micro-organismes présents au départ dans les fèces oblige les utilisateurs à avoir une grande spécificité d'amplification et généralement une confirmation par séquençage est nécessaire. Plusieurs réactions PCR ont été décrites pour l'amplification spécifique d'*E. granulosus* (généralement génotype G1) ou d'*E. multilocularis*. Plus récemment, une PCR multiplex adaptée à l'identification d'œufs de la famille des *Taenidae* a été décrite, elle permet l'identification simultanée d'*E. multilocularis*, d'*E. granulosus sensu lato* et de *Taenia* spp. (Trachsel *et al.* 2007).

L'avènement de la PCR temps réel (ou qPCR pour PCR quantitative) a permis un gain important de sensibilité tout en facilitant l'incorporation d'un témoin d'inhibition à chaque réaction. Un diagnostic qPCR pour détecter la présence d'*E. multilocularis* directement à partir de seulement 500 mg de fèces peut maintenant être réalisé en routine, cela permet de traiter un grand nombre d'échantillons (Knapp *et al.* 2014). Contrairement à la PCR classique, les écarts de prévalence constatés entre les résultats d'analyses d'intestins et ceux de fèces par qPCR d'une même zone sont plus réduits, autorisant ainsi l'emploi de la qPCR pour des études épidémiologiques à grande échelle.



Diagnostic chez les hôtes intermédiaires

Le diagnostic des hôtes intermédiaires est réalisé généralement à l'autopsie sur la faune sauvage capturée ou tuée à la chasse pour *E. multilocularis*, ou à l'abattoir sur les animaux de rente pour *E. granulosus*. En dehors des formes caractéristiques, le diagnostic différentiel peut s'avérer difficile notamment lorsque le développement larvaire est peu avancé ou en présence de kystes calcifiés (Photos 1). Ainsi le diagnostic en abattoir d'*E. granulosus* s'avère particulièrement ardu de par les différences d'expérience des inspecteurs et la cadence sur les chaînes d'abattage. Cette compétence de diagnose différentielle n'est sollicitée qu'exceptionnelle-



Photos 1. Kystes hépatiques caractéristiques ou non d'*E. granulosus* (A et C) et de *T. hydatigena* (B et D).

ment lors d'enquête spécifique ou de plan de surveillance, car au quotidien aucun diagnostic parasitaire précis n'est requis, seule la saisie d'organes est faite, ce qui conduit à une absence de données précises sur l'espèce parasitaire en cause. Pour un diagnostic d'espèce parasitaire macroscopique, l'observation de kystes doit être complétée par d'autres approches, notamment histologique. Par exemple la recherche et l'identification de protoscolex dans le liquide kystique, permet sans ambiguïté un diagnostic spécifique du genre *Echinococcus*. Cette présence ou absence de protoscolex témoigne de la fertilité des kystes, et est primordiale car couplée à l'identification génétique de l'espèce, elle permet

de définir le rôle possible de cet hôte intermédiaire dans le cycle parasitaire. L'amplification par PCR de l'ADN extrait à partir des kystes est une méthode de choix pour confirmer les suspicions macroscopiques et elle est désormais devenue courante. Aux couples d'amorces PCR spécifiques à l'une ou l'autre espèce d'échinocoques peuvent s'ajouter des amorces au spectre parasitaire plus large. Elles permettent notamment d'identifier, après analyse et séquençage de l'ADN du gène amplifié, de nombreux cestodes dont certains *Taeniidae* qui peuvent au niveau macroscopique être confondus avec *Echinococcus*. Le diagnostic *in vivo* peut aussi être réalisé à partir de prélèvements sanguins par des techniques sérologiques d'ELISA, associées à une confirmation par Western Blot, à partir de tests disponibles pour l'humain qui doivent être adaptés à l'animal. L'échographie est également possible mais le diagnostic n'est réalisable que pour le foie et pas pour les poumons, son usage s'avère donc limité dans le cadre du diagnostic d'*E. granulosus* chez les animaux de rente. Bien que très utiles pour les animaux domestiques, l'usage de ces techniques de détection *in vivo* restent limitées à des finalités de recherche et sont peu utilisées en dépistage de masse.

Debourgogne A, et al. (2014) Primary cerebral alveolar echinococcosis: mycology to the rescue. *J.Clin. Microbiol.* 52(2):692-694.

Casulli A, et al. (2009). Multi-locus microsatellite analysis supports the hypothesis of an autochthonous focus of *Echinococcus multilocularis* in northern Italy. *Int. J. Parasitol.* 39(7):837-842.

Deplazes P, et al. (1999). *Echinococcus multilocularis* coproantigen detection by enzyme-linked immunosorbent assay in fox, dog, and cat populations. *J. Parasitol.* 85(1):115-121.

Deplazes P, Eckert J (1996). Diagnosis of the *Echinococcus multilocularis* infection in final hosts. *Appl. Parasitol.* 37(4):245-252.

Hofer S, et al. (2000). High prevalence of *Echinococcus multilocularis* in urban red foxes (*Vulpes vulpes*) and voles (*Arvicola terrestris*) in the city of Zurich, Switzerland. *Parasitology*, 120(2):135-142.

Knapp J, et al. (2009). Genetic diversity of the cestode *Echinococcus multilocularis* in red foxes at a continental scale in Europe. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3(6):e452.

Knapp J, et al. (2014). Real time PCR to detect the environmental faecal contamination by *Echinococcus multilocularis* from red fox stools. *Vet. Parasitol.* 201(1-2):40-47.

Rausch RL, et al. (1990). The ecology of *Echinococcus multilocularis* (Cestoda: Taeniidae) on St. Lawrence island, Alaska. II. Helminth populations in the definitive host. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 65(3):131-140.

Trachsel D, et al. (2007). Identification of taeniid eggs in the faeces from carnivores based on multiplex PCR using targets in mitochondrial DNA. *Parasitology*, 134(6):911-920.

Umhang G, et al. (2014). Using the genetics of *Echinococcus multilocularis* to trace the history of expansion from an endemic area. *Infect. Genet. Evol.* 22:142-149.

Umhang G, et al. (2011). Segmental sedimentation and counting technique (SSCT): an adaptable method for qualitative diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in fox intestines. *Exp. Parasitol.* 128(1):57-60.

Quand la recherche de champignon mène à l'échinococcose...

(Debourgogne et al. 2014)

Nous n'allons pas vous raconter l'histoire d'un cueilleur de champignon, mais plutôt vous présenter un cas clinique qui montre la difficulté d'identifier les infections par *E. multilocularis*, dès lors qu'elles ne sont pas classiques. Il s'agit du cas d'un patient de 62 ans vivant dans les Vosges, qui a été hospitalisé au CHU de Nancy suite à des ataxies et une hémiparésie du côté droit. Les premières investigations par IRM sur le cerveau ont révélé une masse calcifiée de 3 cm de diamètre entourée d'un œdème dans le lobe occipital droit orientant le diagnostic vers une tumeur gliale. En parallèle, les analyses biologiques sur les prélèvements sanguins se sont toutes révélées négatives pour une large batterie de pathogènes incluant *E. granulosus* et *E. multilocularis*. En raison d'épisodes fiévreux récurrents, un traitement antibiotique test a été mis en place. Après quatre semaines de traitement une nouvelle IRM montrant une image plus contrastée de la masse cérébrale a permis la réalisation d'une biopsie. L'histopathologie a mis en évidence une structure multi-laminaire. Les recherches bactériologiques directes par culture et par PCR sont restées négatives. Seule une PCR avec des amorces universelles permettant de mettre en évidence des mycoses a permis une amplification. Le séquençage a identifié une séquence d'échinocoque. L'infection par *E. multilocularis* a ensuite été confirmée par des PCR spécifiques et caractérisée par analyse microsatellite EmsB. Les investigations plus poussées par tomographie ont confirmé une localisation cérébrale unique du kyste. Un traitement par albendazole a été immédiatement administré. Bien toléré, il a permis une amélioration des symptômes et, après neuf mois, seule une légère hémiparésie persiste. Le diagnostic de l'échinococcose alvéolaire « atypique » est compliqué comme le montre ce cas clinique, et il n'est pas facilité par le temps de latence qui précède l'apparition des symptômes. Dans cette recherche de vérité, la diversité des outils moléculaires qui peuvent être spécifiques ou ubiquitaires, est un atout dans l'établissement d'un diagnostic.