

Test de déploiement d'un protocole non invasif pour la surveillance du parasite *Echinococcus multilocularis* chez les renards

Gérald Umhang¹, Vanessa Bastid¹, Stéphanie Favier², Franck Boué¹, Benoît Combes², Matthieu Bastien²

Auteur correspondant : gerald.umhang@anses.fr

¹ Anses, laboratoire de la rage et de la faune sauvage de Nancy, unité INTERFAS, Malzéville, France

² Entente de Lutte Interdépartementale contre les Zoonoses (ELIZ), Malzéville, France

Résumé

Le parasite *Echinococcus multilocularis* est responsable d'une zoonose grave représentant environ 40 nouveaux cas par an en France. Son cycle de vie est basé sur la relation proie-prédateur entre le renard roux et les micromammifères de type campagnol. Actuellement, la zone d'enzootie connue du parasite recouvre 48 départements de la moitié nord-est de la France. Un groupe projet au sein de la plateforme d'épidémiosurveillance en santé animale (ESA) rassemblant des experts autour du Laboratoire National de Référence (LNR) *Echinococcus spp.* a élaboré et validé un protocole de surveillance chez le renard à partir de fèces qui a pu être testé sur le département de l'Essonne. Au total, deux collectes d'échantillons de fèces ont permis d'obtenir 268 fèces mais seulement 159 confirmées (par biologie moléculaire) comme provenant de renards sur les 199 requises pour pouvoir détecter une prévalence de 2 % (IC95%). Toutefois, le génome du parasite a été détecté par PCR en temps réel dans trois fèces de renards pour une prévalence de 1,9% (IC95% : 0,4-5,4) similaire au niveau détecté précédemment. La recherche de fèces dans un nombre de parcelles 30 % supérieur au nombre de fèces à collecter, et en y consacrant au maximum 20 min par parcelle, devrait permettre d'optimiser l'efficacité de la collecte. Le coût de la surveillance par département a pu être estimé entre 15 000 et 17 000 €. L'ensemble de ces enseignements obtenus lors de ce test de déploiement du protocole non invasif de la surveillance d'*E. multilocularis* devait permettre sa mise en place future en ciblant les départements en bordure de la zone d'enzootie connue au sein de la moitié nord-ouest encore non investiguée.

Mots-clés

Echinococcus multilocularis, zoonose, faune sauvage, fèces, PCR temps-réel

Abstract

Title: Test deployment of a non-invasive protocol for surveillance of *Echinococcus multilocularis* parasite in foxes

The *Echinococcus multilocularis* parasite is responsible for a serious zoonosis that accounts for approximately 40 new cases per year in France. Its lifecycle is based on the prey-predator relationship between the red fox and small mammals. At present, the known enzootic area covers 48 departments in the north-eastern half of France. A project group within the ESA platform, comprising experts and the *Echinococcus spp.* National Reference Laboratory, has developed and validated a surveillance protocol for foxes based on faeces, which has been tested in the Essonne department. The total number of faeces collected was 268, of which 159 were confirmed by molecular biology as fox faeces, when 199 were required to detect a prevalence of 2%. However, the parasite genome was detected by real-time PCR in three fox faeces at a prevalence of 1.9% (95% CI: 0.4-5.4), which is similar to the level previously detected. It is recommended that a maximum of 20 minutes per plot is allocated for the search for faeces in a number of plots 30% higher than the number of faeces to be collected, with the aim of optimising the efficiency of the collect. The estimated cost of surveillance per department was between €15,000 and €17,000. The lessons learned from this test deployment of the non-invasive *E. multilocularis* surveillance protocol should enable its implementation in the future, targeting departments bordering the known enzootic zone in the north-western half of France that has not yet been investigated.

Keywords

Echinococcus multilocularis, zoonosis, wildlife, faeces, real-time PCR

Introduction

Contexte épidémiologique

Le cestode *Echinococcus multilocularis* est l'agent étiologique d'une zoonose grave, l'échinococose alvéolaire (EA) présente dans presque tout l'hémisphère nord. Le cycle de vie du parasite est essentiellement sylvatique, surtout en Europe. Dans les régions non arctiques d'Europe, le renard roux (*Vulpes vulpes*) est le principal hôte définitif, même si le parasite est également présent dans une moindre mesure chez d'autres carnivores sauvages et domestiques. L'infestation intestinale des hôtes définitifs est généralement comprise entre plusieurs dizaines et plusieurs milliers de vers de 2 à 4 mm. Environ trente jours après infestation, plusieurs centaines de milliers d'œufs microscopiques seront libérés dans l'environnement via les fèces au cours des deux à trois mois que dure l'infestation. Les principaux hôtes intermédiaires sont les campagnols (*Microtus arvalis* et *Arvicola spp.*), qui s'infestent en ingérant accidentellement les œufs du parasite notamment sur les végétaux. Ces œufs se développent ensuite sous la forme de microkystes dans le foie. Le cycle de vie s'achève lorsqu'un hôte définitif compétent consomme une proie infectée.

Les humains sont des hôtes accidentels et constituent une impasse du cycle parasitaire. Ils s'infestent par l'ingestion d'œufs d'*E. multilocularis* présents dans l'environnement sur des végétaux souillés, mais aussi par ingestion d'œufs manuportés après contact avec notamment un sol contaminé ou le pelage souillé de carnivores porteurs du parasite. La maladie est généralement asymptomatique pendant 5 à 15 ans mais se développe plus rapidement chez les personnes immunodéprimées. Le développement du stade larvaire est similaire à une tumeur avec croissance invasive et destructive des tissus de l'hôte, induisant potentiellement une maladie grave avec un taux de létalité élevé. Les lésions peuvent mesurer de quelques millimètres à 15-20 cm de diamètre. Initialement, le développement larvaire est quasi-exclusivement localisé au niveau hépatique, mais il existe, dans de rares cas (2-4%), des formes exclusivement extra-hépatiques (Bresson Hadni et al. 2014). A partir du foie, le métacestode a tendance à se disséminer vers les organes adjacents mais aussi vers des organes plus distants par infiltration ou par formation de métastases causées par la diffusion de cellules germinatives dans le système lymphatique et sanguin. L'unique traitement médicamenteux disponible est seulement parasitostatique par l'ingestion

quotidienne d'albendazole. Il est d'autant plus efficace que le diagnostic est précoce mais il est généralement à vie avec des effets secondaires potentiellement gênants. Le nombre de cas humains diagnostiqués en France a progressivement augmenté au cours des dernières décennies. Le nombre annuel de nouveaux cas était de 12 entre 1993 et 2002 pour atteindre 39 cas entre 2013 et 2022. En France, le coût de prise en charge d'un patient du diagnostic à la fin de sa vie est estimé à 100 000 € en moyenne. En raison de la longue période asymptomatique, il est difficile d'identifier les voies de transmission et les facteurs de risque associés. Des patients atteints par l'EA ont actuellement été identifiés dans plus de 70 départements en France. Même si le département de résidence ne coïncide pas toujours avec celui où a eu lieu la contamination, ce chiffre, ainsi que l'augmentation progressive de la proportion des cas hors de la zone d'endémie historique, corrobore l'hypothèse d'une distribution du parasite en France chez le renard roux plus large que celle connue actuellement.

Le foyer historique du parasite en Europe était initialement limité au Jura allemand et suisse, ainsi qu'aux régions alpines allemandes, autrichiennes et françaises. Les études récentes menées en France ont permis d'étendre la zone d'enzootie connue du parasite à 48 départements, alors qu'au début des années 2000 seule une dizaine d'entre eux était identifiée comme enzootique. Cela correspond à une large expansion de la répartition du parasite au nord d'une ligne allant de l'Ille-et-Vilaine jusqu'aux Alpes-Maritimes en passant par le Cantal. Cette expansion du parasite en France est à l'image de celle observée en Europe à partir du foyer historique alpin. Toutefois, si elle n'a été observée que récemment, la présence du parasite dans les régions de l'Ouest et du Nord remonte à au moins plusieurs décennies d'après les études génétiques menées par le Laboratoire National de Référence (LNR) (Umhang et al. 2014). Actuellement les prévalences vulpines du foyer historique sont globalement comprises entre 30 et 50% alors qu'elles sont bien inférieures à 20% dans les autres départements. A l'image de l'Europe, les prévalences vulpines en France n'ont pas significativement évolué au cours des deux dernières décennies.

Situation actuelle de la surveillance d'*Echinococcus multilocularis* en France

E. multilocularis a été classé comme le parasite transmis par les aliments de plus grande importance en Europe en raison de sa large distribution, et surtout de la gravité très importante de la maladie

associée (Bouwknegt *et al.* 2018). Cela explique l'obligation de surveillance du parasite demandée par l'European Food Safety Authority (EFSA) pour les pays de la Commission européenne. La nouvelle législation européenne sur la santé animale (« LSA ») a également placé l'infection à *E. multilocularis* en catégorie C, D, E au niveau européen depuis son entrée en vigueur en avril 2021¹. Ainsi, si son éradication n'est pas obligatoire (Malte, la Finlande,

l'Irlande et l'Irlande du Nord sont indemnes²), des restrictions aux mouvements entre Etats membres s'appliquent et la maladie est soumise à surveillance et notification européenne obligatoires, mais cela ne concerne en France que le chien. Au niveau de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale, l'infection à *E. multilocularis* est déclarée comme « présente » en France.

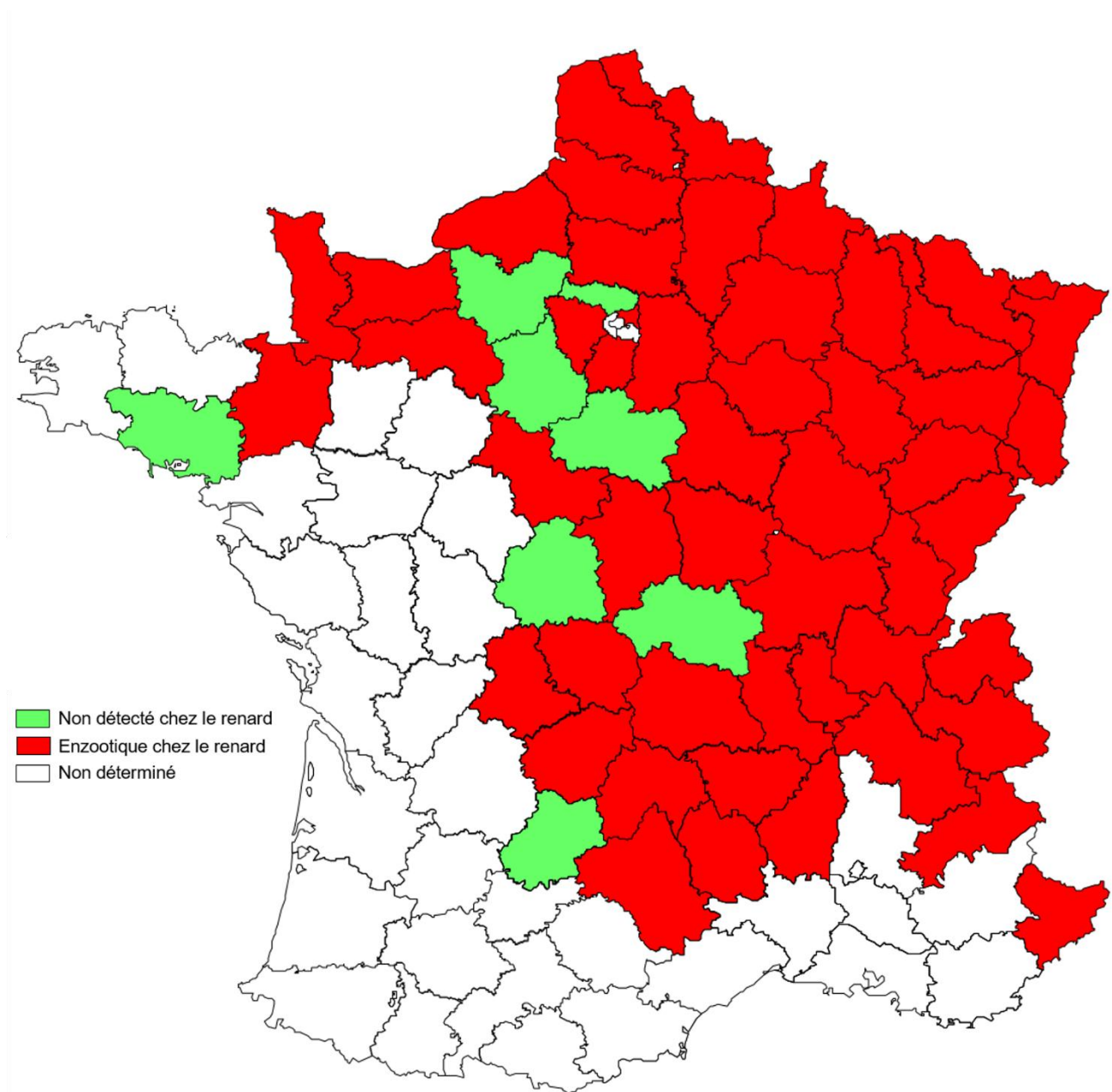


Figure 1. Zone d'enzootie actuellement connue pour *E. multilocularis* chez le renard à l'échelle départementale en France (source LNR *Echinococcus spp.*)

¹ Voir règlement d'exécution (UE) 2018/1882 : <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=CELEX%3A32018R1882&qid=1776934930021>

²https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=OJ:L_202600766

La France constitue actuellement la limite ouest de la zone d'enzootie en Europe sachant que le Royaume Uni a un statut indemne et que le parasite n'a jamais été détecté en Espagne et au Portugal. La France est également le seul des quatre pays du foyer historique européen (France, Suisse, Allemagne, Autriche) dont le statut enzootique n'est pas connu pour l'ensemble du territoire. Le statut encore inconnu de la moitié du pays du pays nécessite d'y explorer la présence du parasite. Son expansion repose sur la migration de proche en proche de renards infestés, ce qui suppose à l'échelle départementale une zone d'enzootie quasi-continue du foyer historique jusqu'en bordure. Dans ce contexte, la surveillance du parasite dans les départements au statut inconnu mais limitrophes de ceux observés comme enzootiques permettrait de délimiter progressivement la zone réelle de présence du parasite, en renouvelant cette opération dès l'identification d'un nouveau département enzootique, sans avoir *a priori* à explorer tous les départements au statut inconnu. La connaissance des zones d'enzootie est essentielle à la mise en place d'une prévention pertinente au sein des départements concernés ciblant notamment des catégories particulières telles que les professionnels de santé humaine et vétérinaire, les chasseurs, les consommateurs de plantes sauvages et les personnes immunodéprimées correspondant à l'approche intégrée et unificatrice « une seule santé ».

En raison des niveaux de prévalence et pour des raisons de logistique de collecte, le renard roux est la cible de choix pour la surveillance d'*E. multilocularis*. Celle-ci reposait historiquement sur l'analyse d'intestins pour l'identification morphologique des vers, considérée comme la technique de référence. Depuis une dizaine d'années, le développement des outils moléculaires a permis de disposer de méthodes de détection de l'ADN par PCR temps réel à partir de fèces (copro-qPCR) désormais très sensible et spécifique. Cette approche moléculaire permet potentiellement la mise en évidence du parasite du premier jusqu'au dernier jour de l'infestation car elle ne repose pas uniquement sur la détection de l'ADN des œufs mais aussi sur l'ADN des tissus des vers (desquamation, décrochage) permettant une détection relativement indépendante de l'excrétion intermittente des œufs. En outre, cette approche non invasive lorsque les fèces sont collectées dans l'environnement constitue un argument non négligeable pour des raisons d'éthique et de bien-être animal. De plus, la collecte de fèces de renards s'avère moins contraignante tant au niveau administratif et réglementaire (autorisation de tirs ou piégeage) qu'au niveau

opérationnel. L'analyse de fèces est également beaucoup plus rapide et même globalement moins coûteuse que celle très chronophage des intestins, ce qui constitue un argument supplémentaire en sa faveur. A partir du copro-ADN obtenu, un autre test de PCR temps réel permet de confirmer l'espèce animale (renard, chien, chat) à l'origine de l'échantillon (Knapp et al. 2016) et ainsi de rendre des conclusions épidémiologiques précises. Dans ce contexte, la détection moléculaire du parasite à partir de fèces de renard apparaît comme une alternative très pertinente à l'analyse d'intestins pour la surveillance. Ainsi, au cours de ces dernières années, de nombreux pays ont opté pour cette approche comme la Suède, la Finlande, les Pays-Bas, l'Italie ou la Croatie (Beck et al. 2018, Isaksson et al. 2014, Maas et al. 2016, Obber et al. 2013, Obber et al. 2022) alors que son efficacité avait également été démontrée en France permettant notamment d'identifier pour la première fois la présence d'*E. multilocularis* dans la Seine-Maritime et les Hautes-Alpes (Umhang et al. 2016).

Un groupe projet rassemblant des experts de l'Office Français de la Biodiversité (OFB), de la Fédération Nationale des Chasseurs (FNC), de l'Association française des Directeurs et Cadres de Laboratoires Vétérinaires Publics d'Analyses (ADILVA), du Centre National de Référence Echinococcoses, de la Direction Générale de la Santé (DGS), de Santé Publique France (SPF) et de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) autour du LNR *Echinococcus* spp. de l'Anses a été fondé en 2019 au sein de la plateforme d'Epidémiosurveillance en Santé Animale (ESA) afin d'élaborer et de valider un protocole de surveillance d'*E. multilocularis* chez le renard à partir de fèces. La volonté du conseil départemental de l'Essonne de disposer de données récentes quant à la présence du parasite sur son territoire à des fins de prévention est apparue comme l'occasion idéale de tester le déploiement du protocole de surveillance élaboré par le groupe projet. L'étude menée en collaboration entre l'ELIZ (Entente de Lutte et d'Intervention contre les Zoonoses) et le LNR *Echinococcus* spp. de l'Anses avait ainsi un double objectif : décrire le niveau de prévalence et la distribution géographique du parasite sur le département de l'Essonne, mais aussi disposer d'éléments précis sur la logistique et le coût de la collecte de fèces de renards dans le cadre du déploiement de ce protocole de surveillance non-invasif.

Matériels et méthodes

Zone d'étude et échantillonnage

La détection du parasite nécessite de disposer d'un échantillonnage suffisamment conséquent afin de

pouvoir être appliqué dans des zones de faibles ou très faibles niveaux d'enzootie supposés. Ainsi, le protocole de surveillance a été élaboré pour pouvoir détecter une prévalence de 2% (IC de 95%), ce qui nécessite la collecte de 199 fèces de renards sur la zone concernée. Une couverture homogène d'un département est nécessaire pour maximiser la probabilité de détection car la distribution du parasite y est généralement hétérogène. Le domaine vital d'un renard est approximativement estimé entre 0,5 et 3 km². Le département de l'Essonne a été quadrillé afin d'obtenir des placettes de 3x3 km² pour un total de 209. Pour chaque placette, en amont de la prospection sur le terrain, un repérage a été réalisé à l'aide de l'outil « My Maps » (Google) afin de cibler les zones les plus favorables à la présence potentielle de renards. Pour cela il a été tenu compte essentiellement du paysage visible sur les images satellites et les prises de vue Google Street View (présence de lisières de forêt, haies, parcs urbains, etc...). Ainsi, pour chaque placette, une adresse principale et une adresse de remplacement ont été recensées pour réaliser la prospection.

Les placettes ont été prospectées entre le 09 et le 13 octobre 2023 puis entre le 11 et le 13 mars 2024, à raison d'une personne par parcelle, par une équipe de 3 personnes de l'ELIZ possédant une longue expérience dans ce domaine. Chaque excrément trouvé a été identifié visuellement selon sa taille, sa forme et sa localisation (les fèces de renards sont généralement posées de manière visible : sur un monticule de terre ou une touffe d'herbe) pour déterminer s'il s'agissait bien d'un excrément de renard ou non. A la suite de la première détection d'un excrément considéré comme provenant de renard sur la parcelle, nous passions à la suivante. Cependant, lorsqu'un deuxième excrément supposé de renard était trouvé lors du chemin retour, il était également collecté afin de maximiser les chances de disposer d'au moins un excrément de renard par parcelle. Le temps de collecte de chaque échantillon a été relevé ainsi que les coordonnées GPS et s'il s'agissait d'une parcelle en zone de culture, forestière ou urbaine.

Analyses des échantillons

Les fèces ont été décontaminées par un passage d'une semaine à -80°C avant d'être conservées congelées. Après broyage mécanique puis lyse chimique de 300 mg de fèces, l'extraction d'ADN est réalisée sur un automate (kit Pure Food et Maxwell48, Promega) sur le principe de liaison de l'ADN total à des billes magnétiques. Une PCR multiplex temps réel permet d'abord d'identifier s'il s'agit de renard plutôt que de chat, chien ou d'une espèce non déterminée (Knapp et al. 2016).

Lorsqu'il s'agit bien de fèces de renard, la détection du génome d'*E. multilocularis* est réalisée par la méthode utilisée en routine au LNR et accréditée par le COFRAC (Isaksson et al. 2014).

Résultats

La première collecte en octobre 2023 a permis d'obtenir 197 fèces dont seulement 107 (54%) se sont révélées comme provenant de renards. Au cours de la seconde collecte de mars 2024, 71 fèces dont 52 de renards (73%) ont été ramassées en ciblant uniquement les placettes pour lesquelles aucune crotte de renard n'avait pu être obtenue précédemment (soit par erreur d'identification de l'excrément sur le terrain ou parce qu'aucun excrément n'avait pu être trouvé lors de la première session). Au total, 268 fèces ont été collectées sur 198 placettes dont 59% (n=159) provenaient de renards, 20% de chiens, 11% de chats et 9% au statut indéterminé (qualité non suffisante ou autres espèces) (Figure 2).

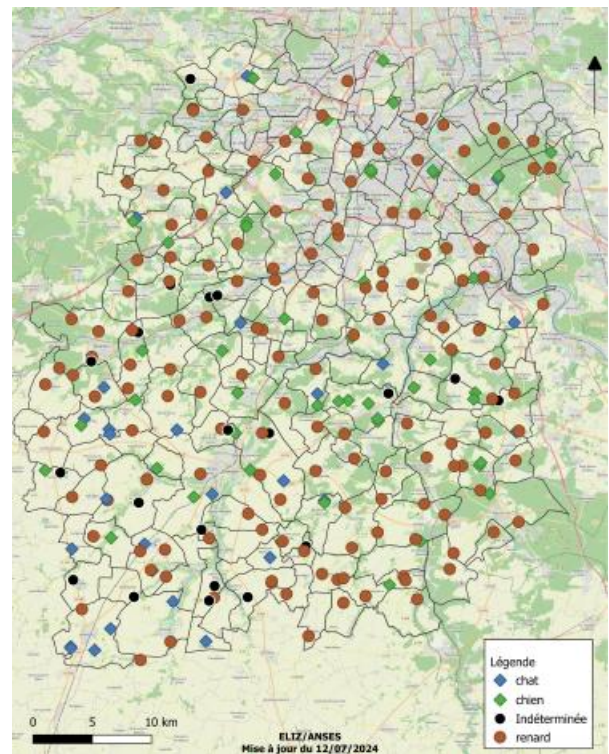


Figure 2. Distribution spatiale des fèces collectées en Essonne lors des deux sessions selon le statut de l'espèce de carnivore (chien, chat, renard ou indéterminé) obtenue par analyse moléculaire

Le temps moyen de collecte variait entre 10 et 20 min selon le collecteur pour un temps moyen de collecte d'un échantillon estimé à 16 min indépendamment du statut de l'espèce. Il n'est pas significativement différent (test de Mann-Whitney, p -value=0,1544) lorsque l'excrément de renard a bien été identifié sur le terrain (moyenne = 12 minutes; minimum = 1 minute; maximum = 70

minutes) ou lorsqu'il ne s'agissait en réalité pas d'un excrément de renard (moyenne = 17 minutes; minimum = 2 minutes; maximum = 55 minutes) (Figure 3a). Au global, 75 % des fèces de renards ou autres ont été trouvées en moins de 20 minutes. En revanche, le temps moyen de collecte était significativement plus court lors de la première session comparativement à la seconde, indépendamment de la bonne assignation de l'espèce (15 minutes vs 20 minutes, test de Mann-Whitney, p -value=0,0009). Aucun échantillon n'a pu être trouvé dans 11 parcelles, deux se situaient en milieu de culture alors que les neuf autres étaient en zones urbaines. Globalement, le temps de collecte ne différait pas significativement entre les zones de culture, de forêt ou le milieu urbain (test de Kruskal-Wallis, p -value=0,051) (Figure 3b).

Parmi les 159 fèces de renards collectées, l'ADN du parasite a été détecté dans trois échantillons correspondant à une prévalence de 1,9 % (IC95 % :

0,4-5,4). Deux des fèces positives sont distantes d'environ 4 km et se situent dans le nord-ouest à la frontière du département des Yvelines (Figure 4). Le troisième échantillon positif est situé à l'est à la frontière de la Seine et Marne.

Discussion - Conclusion

La connaissance de la présence d'*E. multilocularis* dans les différents départements français apparaît comme essentielle à la mise en place de campagnes de prévention efficaces contre l'échinococcose alvéolaire. Dans ce contexte, le protocole de surveillance mis en place par le groupe projet consiste en une approche non invasive nécessitant la collecte de fèces pour détecter une prévalence de 2 % chez le renard qui apparaît comme un compromis pertinent entre les prévalences observées en zone de faible enzootie et le nombre d'échantillons à collecter.

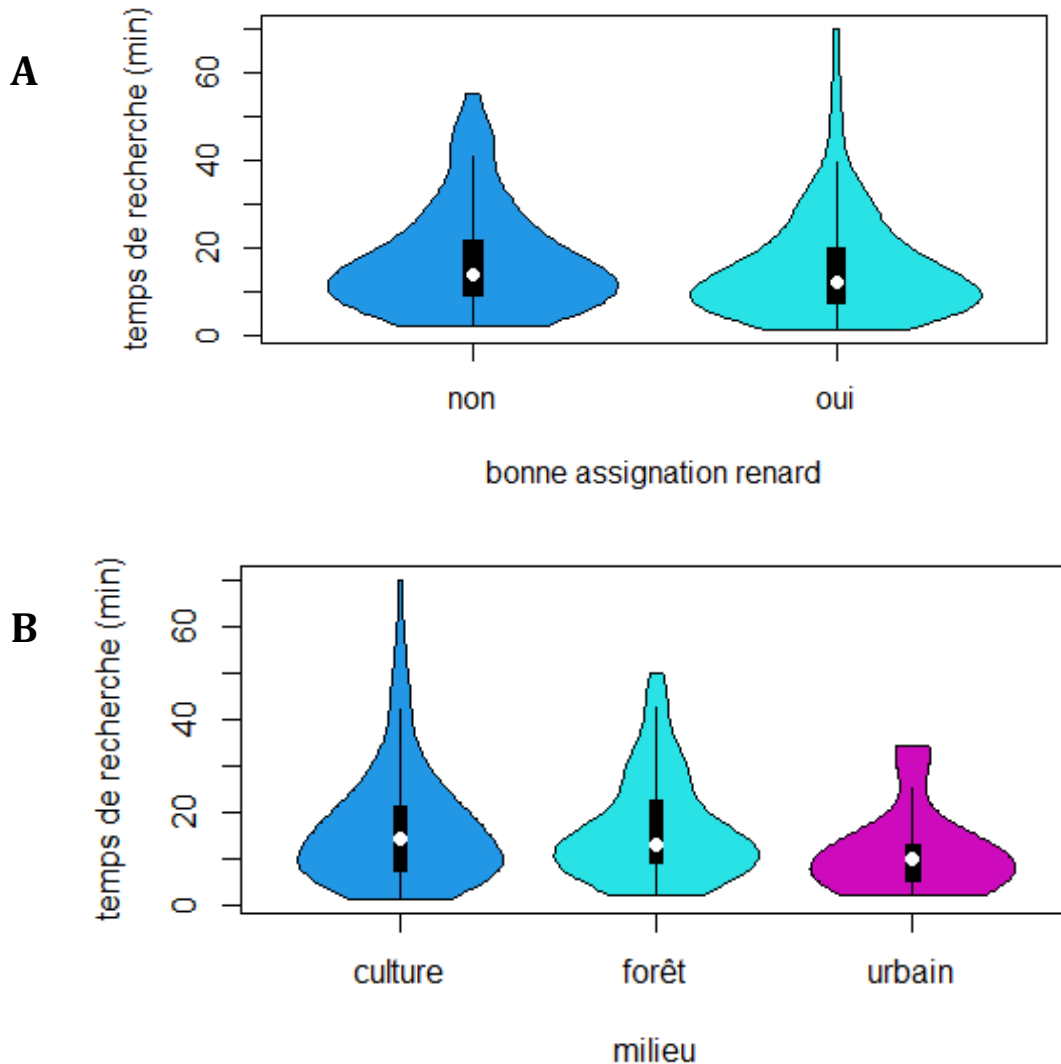


Figure 3. Temps de recherche d'un excrément (en minutes) en fonction de la bonne assignation sur le terrain de l'espèce renard (A) et du milieu (B). Le point blanc indique la médiane, la plage interquartile est représentée par la large barre noire au milieu et le reste de la distribution (à l'exception des points aberrants est matérialisée par la fine ligne noire. La forme de la distribution des données (estimation de la densité du noyau) est représentée par les couleurs.

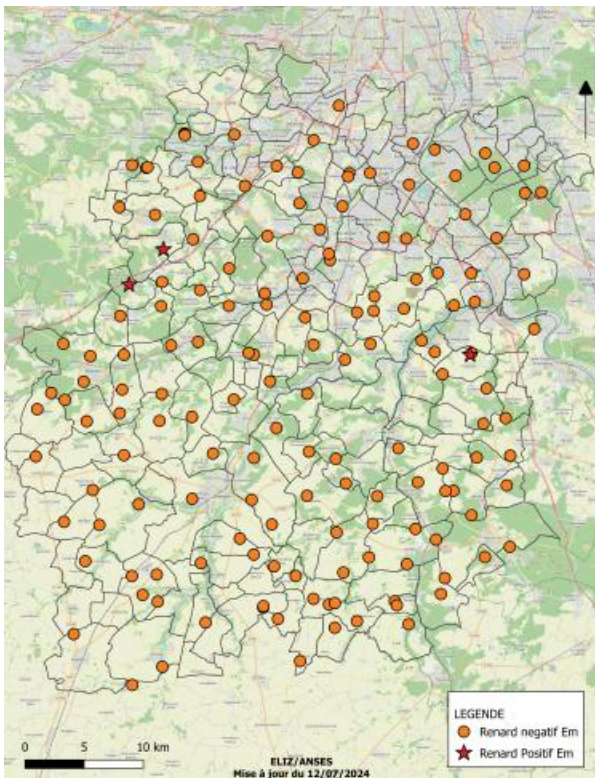


Figure 4. Distribution spatiale des fèces de renards collectées en Essonne lors des deux sessions selon la détection ou non du génome d'*E. multilocularis*

La prévalence de 1,9% observée lors de cette étude n'est pas significativement différentes des valeurs obtenues lors des deux études précédentes réalisées dans le département en 2006-2010 (7,3 % ; IC95% : 1,5-19,9 %) puis 2016-2020 (8,1 % ; IC95% : 1,7-24,7 %) à partir d'un faible nombre d'intestins de renards (n=41 puis n=37 ; test de Fisher, *p-value* = 0,052). Cette stabilité de la prévalence vulpine a été observée au cours des dix dernières années à une échelle plus large en France mais aussi à travers l'Europe. Les trois cas détectés se situent globalement dans des zones où le parasite avait précédemment été identifié, ne laissant pas supposer une plus large distribution géographique même s'il n'est pas possible de l'attester avec certitude avec les données disponibles. On ne peut pas exclure totalement que les deux fèces positives détectées à l'ouest proviennent du même individu mais cela semble peu probable au regard de la distance et de la densité attendue de la population de renards. Les trois fèces positives ont été collectées en bordure de deux départements où le parasite avait précédemment été identifié. Une prévalence de 1,9 % (n=53) avait été obtenue dans les Yvelines en 2018-2019 et de 29 % en Seine-et-Marne (n=55) en 2004-2008. Toutefois concernant les Yvelines, le seul renard positif a été détecté au nord-ouest du département et non en bordure de l'Essonne au contraire de trois des 16 renards positifs en Seine-et-Marne. L'absence actuelle de

données génétiques sur le parasite dans ces départements ne permet pas d'établir actuellement une présence ou absence de liens épidémiologiques. Cependant, ces résultats confortent le choix d'utiliser l'approche non invasive par biologie moléculaire, celle-ci permet en effet une détection avec une sensibilité et spécificité similaires à celle par identification morphologique des vers dans le contenu intestinal tout en étant bien moins fastidieuse et chronophage.

Dans le contexte de cette étude pilote réalisée dans le département de l'Essonne, la cible des 199 fèces de renards n'a pu être atteinte. Malgré une bonne couverture globale du département et la collecte de 268 fèces au total, 40 fèces de renards sont manquantes après les deux collectes. Deux raisons majeures peuvent expliquer cela. Premièrement, un taux important de fèces ne provenant pas de renard (41 %) ont été collectées, car malgré un doute sur l'espèce émettrice, aucun autre excrément de renard n'avait été trouvé. Deuxièmement, le fait de découper le département en 209 placettes pour collecter 199 échantillons ne laissait qu'une faible marge (10 placettes), et nécessitait de trouver un excrément de renard dans quasiment chaque placette. Un maillage plus fin aboutissant à un nombre de mailles supérieur à environ 30% du total de fèces de renard à atteindre (env. 250) semble plus approprié car cela permettrait d'optimiser les temps sur chaque maille et de ne pas forcer la collecte de fèces dont l'origine est relativement incertaine.

D'autres paramètres influent également sur l'efficacité de la collecte. En effet, la densité de renards varie notamment selon le paysage qui dicte la disponibilité de la ressource alimentaire. Ainsi, il a été plus facile de trouver des fèces de renards en zone urbaine qu'en zone forestière et de culture car les densités de populations de renards y sont probablement plus importantes. La météo influe également sur la disponibilité des fèces et surtout leur qualité. Lors de la collecte du mois d'octobre, les températures élevées pour la saison ont conduit à la collecte de fèces majoritairement sèches ce qui complique l'identification moléculaire mais surtout morphologique sur le terrain, pouvant faire dans le doute renoncer au ramassage. Les importants épisodes de pluie lors de la collecte de mars ont eu tendance à lessiver les fèces pouvant limiter leur présence ou tout du moins leur visibilité au moment du passage et compliquer aussi l'identification morphologique. Le protocole de surveillance prévoit une collecte entre octobre et mars car la prévalence d'*E. multilocularis* chez le renard est plus forte en hiver. Toutefois, il semble intéressant de disposer d'une certaine souplesse pour les collectes

afin de cibler idéalement des périodes aux températures de saison et non pluvieuses permettant de gagner en efficacité.

Ainsi, en comptant les déplacements d'une placette à une autre, on peut estimer que le temps nécessaire à la collecte de 199 fèces de renards par une équipe de trois personnes est d'environ 8-9 jours répartis en deux périodes. En effet, la première collecte doit cibler toutes les placettes en fixant une durée maximum de temps de recherche sur la placette d'environ 20 min pour chacune. La seconde collecte pourra être réalisée seulement une fois que les fèces auront été analysées afin de pouvoir cibler uniquement les placettes pour lesquelles il n'y a pas de crotte de renard disponible.

Ce premier test de déploiement de la surveillance non invasive réalisée dans le département de l'Essonne s'est révélé concluant et très instructif. La présence du parasite a pu être détectée avec une occurrence et une localisation similaire à celles précédemment décrites. Bien que le nombre de fèces de renards ciblé n'ait pas été atteint, la détection de fèces positives remplit l'objectif initial du protocole de surveillance qui est de mettre en évidence la présence du parasite ou d'exclure sa présence à une prévalence supérieure à 2%. D'un point de vue logistique, il était intéressant de pouvoir évaluer la faisabilité de la collecte de 199 fèces de renards à l'échelle d'un département. La nécessité d'identifier en amont un nombre de placettes supérieur à la valeur cible devrait permettre de minimiser au maximum la collecte de fèces d'espèces non cibles tout en limitant le temps de collecte par placette qui ne doit généralement pas dépasser 20 minutes. La superficie de la zone de collecte et les proportions de zones de culture, de forêt et urbanisée est à prendre en compte à chaque fois afin de guider l'échantillonnage en ciblant les zones plus favorables à la présence de fèces de renards tout en essayant de garder une couverture homogène de la zone. Si la densité de fèces de renards semble plus importante en zone urbaine, la possibilité de confusion avec des fèces d'autres espèces notamment domestiques (chien/chat) est plus importante. De plus, il est attendu que le régime alimentaire des renards en zone urbaine soit moins constitué de rongeurs du fait de la disponibilité de sources de nourriture d'origine anthropique et donc que la prévalence d'*E. multilocularis* y soit plus faible.

Ainsi, si les parties de logistique de collecte et de technique pour les analyses de laboratoires sont validées, il est indispensable de disposer également d'une estimation du coût de la surveillance par département afin de pouvoir envisager sa mise en place dans les départements d'intérêts. Concernant la collecte, l'identification des

placettes et surtout le repérage précis des chemins à parcourir pour chaque placette représente une semaine de travail (35h) qui peut être estimée à 1190 € à raison d'un taux horaire de 34 €. A ce montant s'ajoute également les coûts liés aux missions de collecte pour 8-9 jours que l'on peut estimer à 10 800€ pour trois personnes. Les analyses de laboratoires sont estimées à 3 300 € en tenant compte du fait qu'il est nécessaire d'analyser plus que les 199 fèces requises car toutes les fèces collectées ne proviendront pas de renard. Toutefois, seuls les coûts liés aux consommables sont pris en compte ici et non le temps des agents pour les analyses car cela correspond à une mission du LNR. On peut donc estimer que le coût de la surveillance d'*E. multilocularis* chez le renard par une approche non invasive dans un département est compris entre 15 000 et 17 000 €.

La validation scientifique et opérationnelle de ce protocole de surveillance d'*E. multilocularis* chez le renard par une approche non invasive, ainsi que l'évaluation du coût financier associé, permettent d'envisager de le mener dans d'autres départements. La situation d'enzootie actuellement connue du parasite en France représente une zone quasi-continue sur une grande moitié nord-est de la France. La stratégie de surveillance retenue par le groupe de travail de surveillance d'*E. multilocularis* dans la faune sauvage mené par le LNR *Echinococcus spp.* consiste ainsi à investiguer dans les départements en bordure de la zone d'enzootie connue. Ainsi, les trois grandes régions ciblées sont les Pays de la Loire, la Nouvelle-Aquitaine et l'Occitanie. Sur les 30 départements concernés, cinq (Aveyron, Corrèze, Creuse, Haute-Vienne et Lot) ont déjà été investigués par le LNR en collaboration avec les FDC concernées dont 4 (absence de détection dans le Lot, n=99) pour lesquels la présence du parasite a pu être mise en évidence. En raison de l'expansion progressive du parasite via le déplacement de proche en proche de renards infestés et de l'absence du parasite en Espagne, il ne semble donc pas nécessaire d'investiguer l'ensemble des 24 départements restants pour identifier les limites de la zone d'enzootie en France. L'identification de la présence du parasite dans un département constitue un argument majeur pour améliorer l'efficacité de la prévention du risque de contamination humaine. Si la surveillance cible le renard, ses contacts directs avec l'humain sont extrêmement limités et la prévention doit donc mettre l'accent sur la contamination possible via les chiens mais aussi indirectement par l'alimentation. En effet, l'ADN des œufs du parasite a été détecté dans environ 1% des salades et environ 5% des fraises et myrtilles en Europe sans toutefois pouvoir statuer de leur infectiosité (Guggisberg et

al. 2020, Umhang et al. 2025) ce qui étend tout de même considérablement les populations potentiellement exposées au parasite. La poursuite de la surveillance du parasite en France constitue donc un prérequis indispensable à une prévention efficace de la maladie.

Remerciements

Les auteurs remercient le Conseil Départemental de l'Essonne pour le financement de l'enquête menée sur le département, ainsi que Christophe Caillot et Jean-Marc Boucher de l'Anses LRFSN pour leur aide lors des analyses de laboratoire et le groupe projet de surveillance de *E. multilocularis* de la plateforme ESA pour la conception du protocole de surveillance.

Références bibliographiques

- Beck, R., Z. Mihaljevic, R. Brezak, S. Bosnic, I. L. Jankovic, et P. Deplazes. 2018. "First detection of *Echinococcus multilocularis* in Croatia." 117 (2):617-621. doi: <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5732-3>.
- Bouwknegt, Martijn, Brecht Devleeschauwer, Heather Graham, Lucy J Robertson, Joke WB van der Giessen, et the Euro-FBP workshop participants. 2018. "Prioritisation of food-borne parasites in Europe, 2016." *Eurosurveillance* 23 (9):17-00161. doi: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.9.17-00161>.
- Bresson Hadni, S., F. Grenouillet, A. Chauchet, C. Richou, J. Knapp, E. Delabrousse, S. Adrian-Félix, O. Blagosklonov, D.A. Vuitton, et L. Millon. 2014. "Diagnostic de l'échinococcose alvéolaire." *Rev. Franc. Lab.* (464):77-87.
- Combes, Benoît, Sébastien Comte, Vincent Raton, Francis Raoul, Franck Boué, Gérald Umhang, Stéphanie Favier, Charlotte Dunoyer, Natacha Woronoff, et Patrick Giraudoux. 2012. "Westward spread of *Echinococcus multilocularis* in foxes, France, 2005–2010." *Emerg. Infect. Dis.* 18 (12):2059-2062. doi: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1812.120219>.
- Guggisberg, A. R., C. A. Alvarez Rojas, P. A. Kronenberg, N. Miranda, et P. Deplazes. 2020. "A Sensitive, One-Way Sequential Sieving Method to Isolate Helminths' Eggs and Protozoal Oocysts from Lettuce for Genetic Identification." *Pathogens* 9 (8). doi: 10.3390/pathogens9080624.
- Isaksson, M., A. Hagstrom, M. Armua-Fernandez, H. Wahlstrom, E. Agren, A. Miller, A. Holmberg, M. Lukacs, A. Casulli, P. Deplazes, et M. Juremalm. 2014. "A semi-automated magnetic capture probe based DNA extraction and real-time PCR method applied in the Swedish surveillance of *Echinococcus multilocularis* in red fox (*Vulpes vulpes*) faecal samples." *Parasites and Vectors* 7 (1):583. doi: 10.1186/s13071-014-0583-6.
- Knapp, J., G. Umhang, M. L. Poulle, et L. Millon. 2016. "Development of a real-time PCR for a sensitive one-step copro-diagnosis allowing both the identification of carnivore feces and the detection of *Toxocara* spp. and *Echinococcus multilocularis*." *Appl. Environ. Microbiol.* 82 (10):2950-2958. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.03467-15>.
- Maas, Miriam, Annika van Roon, Cecile Dam-Deisz, Marieke Opsteegh, Alessandro Massolo, Gunita Deksné, Peter Teunis, et Joke van der Giessen. 2016. "Evaluation by latent class analysis of a magnetic capture based DNA extraction followed by real-time qPCR as a new diagnostic method for detection of *Echinococcus multilocularis* in definitive hosts." *Veterinary Parasitology* 230:20-24. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.10.016>.
- Obber, F., K. Capello, L. Gagliazzo, P. Mulatti, F. Mutinelli, M. de Nardi, G.M. Sommarivilla, M. Berto, M.S. Calabrese, E. Ferraro, G. Carmignola, A. Cadamuro, G. Capelli, et C.V. Citterio. 2013. "Field monitoring on the fox population data in relation to sanitary surveillance in North-Eastern Italy." *APHAEA - EMIDA ERANet, Brescia, Italie, 27-28 June 2013*.
- Obber, F., R. Celva, G. Da Rold, K. Trevisiol, S. Ravagnan, P. Danesi, L. Cenni, C. Rossi, P. Bonato, K. Capello, H. C. Hauffe, A. Massolo, R. Cassini, V. Benvenuti, A. Agreiter, D. Righetti, M. Ianniello, D. Dellamaria, G. Capelli, et V. Citterio. 2022. "A highly endemic area of *Echinococcus multilocularis* identified through a comparative re-assessment of prevalence in the red fox (*Vulpes vulpes*), Alto Adige (Italy: 2019-2020)." *PLoS ONE* 17 (5):e0268045. doi: 10.1371/journal.pone.0268045.
- Umhang, G., F. Bastien, A. Cartet, H. Ahmad, K. van der Ark, R. Berg, P. Bonelli, R. K. Davidson, P. Deplazes, G. Deksné, M. J. Gargate, J. Van der Giessen, N. Jamil, P. Jokelainen, J. Karamon, S. M'Rad, P. Maksimov, M. Oudni-M'Rad, G. Muchaamba, A. Oksanen, P. Pepe, M. L. Poulle, L. Rinaldi, M. Samorek-Pieróg, F. Santolamazza, A. Santoro, C. Santucci, U. Saarma, M. Schnyder, I. Villena, M. Wassermann, A. Casulli, et F. Boué. 2025. "Detection of *Echinococcus* spp. and other taeniid species in lettuces and berries: Two international multicenter studies from the MEmE project." *Int J Food Microbiol* 430:111059. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2025.111059.
- Umhang, G., S. Comte, V. Hormaz, J. M. Boucher, V. Raton, S. Favier, F. Raoul, P. Giraudoux, B. Combes, et F. Boué. 2016. "Retrospective analyses of fox feces by real-time PCR to identify new endemic

areas of *Echinococcus multilocularis* in France." *Parasitology Research* 115 (11):4437-4441. doi: 10.1007/s00436-016-5220-1.

Umhang, G., J. Knapp, V. Hormaz, F. Raoul, et F. Boue. 2014. "Using the genetics of *Echinococcus*

multilocularis to trace the history of expansion from an endemic area " *Infection, Genetics and Evolution* 22:142-149. doi:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.01.018>

Pour citer cet article :

Umhang G., Bastid V., Favier S., Boué F., Combes B., Bastien M. 2026 « Test de déploiement d'un protocole non invasif pour la surveillance du parasite *Echinococcus multilocularis* chez les renards » *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* 107 (01) : 1-10.

Le Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation est une publication conjointe de la Direction générale de l'alimentation et de l'Anses.

Directeur de publication : Benoît Vallet

Directeur associé : Maud Faipoux

Directrice de rédaction : Emilie Gay

Rédacteur en chef : Julien Cauchard

Rédacteurs adjoints : Jean-Philippe Amat, Diane Cuzzucoli, Céline Dupuy, Viviane Hénaux

Comité de rédaction : Martine Denis, Benoit

Durand, Françoise Gauchard, Guillaume

Gerbier, Pauline Kooh, Marion Laurent, Sophie

Le Bouquin Leneveu, Céline Richomme, Jackie

Tapprest, Sylvain Traynard

Secrétaire de rédaction : Virginie Eymard

Responsable d'édition :

Fabrice Coutureau Vicaire

Anses - www.anses.fr

14 rue Pierre et Marie Curie

94701 Maisons-Alfort Cedex

Courriel : bulletin.epidemiologie@anses.fr

Sous dépôt légal : CC BY-NC-ND

ISSN : 1769-7166