Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

DOCTEUR EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

L'échinococcose kystique au Moyen Atlas au Maroc

évaluation du traitement anthelminthique des chiens et de la vaccination des moutons

AMARIR, Fatima

Award date:
2020

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

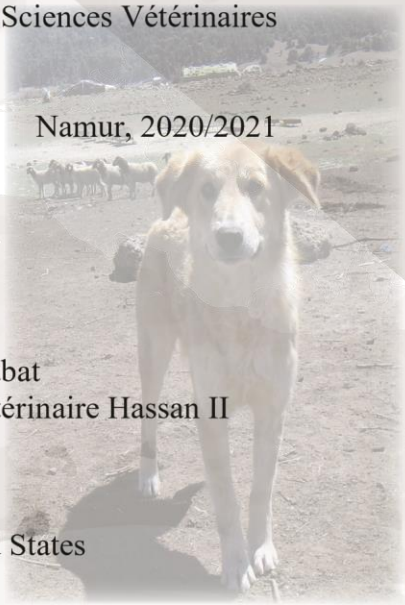
Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 19. Apr. 2024

L'échinococcose kystique au Moyen Atlas au Maroc : évaluation du traitement anthelminthique des chiens et de la vaccination des moutons

Dissertation présentée par
Fatima Ezzahra AMARIR
En vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Vétérinaires

Namur, 2020/2021



Composition du jury :

Prof. Nathalie KIRSCHVINK (Promoteur), Université de Namur
Prof. Abderrahim SADAK (Promoteur), Université Mohammed V de Rabat
Prof. Abdelkbir RHALEM (Co-Promoteur), Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II

Prof. Claire DIEDERICH (Présidente), Université de Namur
Dr. Marcotty TANGUY, Université de Namur
Prof. Malika KACHANI, Western University of Health Sciences, United States
Prof. Pierre DORNY, Institut de médecine tropicale, Antwerpen (IMT)
Prof. Eric MURAILLE, Université Libre de Bruxelles (ULB)
Prof. Sarah GABRIEL, Université de Gant

Cette étude, a bénéficiée d'un financement de l'Académie de Recherche et d'Enseignement Supérieur (ARES, Belgique) en coopération avec l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II (Rabat) et Narilis, Université de Namur (Namur, Belgique), dans le cadre du Projet de Recherche pour le développement (PRD) période 2015-2020.

Remerciements

Il n'est jamais mission impossible pour arriver au bout du tunnel, voir la lumière et pouvoir soutenir sa thèse, mais cela ne peut avoir lieu que si on est entouré de personnes intelligentes, enthousiastes et surtout qui sont pleins d'ondes positives.

Un grand merci à mes deux directeurs de thèse, **professeur Nathalie Kirschvink**, de l'Université de Namur, pour ses expertises, sa compréhension, sa patience et surtout ses qualités humaines, et **professeur Abderrahim Sadak** de la faculté des sciences de Rabat, pour sa confiance en moi, et ses précieux conseils.

Je tiens à rendre un hommage particulier à mon co-encadrant de thèse **Professeur Abdelkbir Rhalem**, co-encadrant de thèse et promoteur du projet PRD-Sud. Merci professeur pour votre engagement dans les activités de terrain et vos qualités humaines qui m'ont particulièrement émue.

J'exprime mes très vifs remerciements au **Docteur Marcotty Tanguy**, pour son co-encadrement à l'Université de Namur, pour ses aides précieuses et ses qualités d'un vrai scientifique et statisticien d'excellence.

J'exprime ma profonde gratitude au **Professeur Pierre Dorny** de l'Institut de Médecine Tropicale à Anvers, membre de comité de ma thèse, merci infiniment pour votre aide et précieux conseils.

Mes sincères remerciements vont également à ma très chère **Mme. Marianne Raes** ses pour ses qualités humaines exemplaires et sa pleine implication aussi bien dans les activités du Projet PRD que dans le bon déroulement de mes travaux de thèse.

Je remercie également les membres du jury : Professeur **Claire Diederich,** Professeur **Sarah Gabriel,** Professeur **Eric Muraille, et** Professeur **Malika Kachani** qui m'ont honorée en acceptant d'évaluer cette thèse.

J'exprime aussi mes très vifs remerciements au **Professeur Marshall Lightowlers** de l'université de Melbourne, Australie, qui nous a fourni le vaccin EG 95, Merci infiniment.

J'adresse aussi mes sincères remerciements à tout le personnel et équipe du département de parasitologie à l'IAV, surtout Mr. **Intissar Boukhari, Said Suilahi, Khalid Kettam** pour

leur franche collaboration sur le terrain et au laboratoire. Un grand merci aussi au Professeur **Mohamed Oukessou** et au **Professeur Mohammed Bouslikhane,** Professeurs à l'IAV, pour leurs précieuses aides et services sur le terrain. Sans oublier toute l'équipe de l'URVI, département de médecine vétérinaire à l'UNamur, pour leur conseil et aides surtout **Dr. Damien coupeau** et **Dr. Gaston Amzati,** merci beaucoup.

Un grand merci au **Professeur Rahma Azrib** de l'IAV ; c'est grâce à elle que j'ai appris à maitriser l'outil de diagnostic par échographie, ainsi que d'autres techniques pratiques de traitement et diagnostic des maladies chez les animaux à la clinique vétérinaire et sur le terrain, professeur je vous suis très reconnaissante.

Mes remerciements chaleureux au **Professeur Ikhlass Elberbri** pour ses aides et conseils précieux, que ça soit au niveau du terrain ou au laboratoire. Merci beaucoup ma chère.

Je remercie tous les étudiants vétérinaires pour leurs aides sur le terrain et au niveau des abattoirs au moyen Atlas.

Mes remerciements profonds vont aussi aux vétérinaires et techniciens de l'ONSA de Khénifra et M'Rirt, surtout **Mr. Fellahi** et **Mr. Elachaoui**, et au technicien de l'ANOC **Mr. Ouzzine**, tous pour leur sincère collaboration et implication dans ce travail au niveau abattoirs et terrain.

Je remercie également les éleveurs du Moyen Atlas surtout les régions d'Elkebab (coordonné par Mr. Radi Ismail), Ait Ishak (Mr. Sadiki), Ain Leuh (par Mr. Aziz Reggadi) et Oulmès Ait Ichou (par Mr. Oukessou Abderrezak), qui ont fait preuve d'une bonne volonté et d'un dynamisme à toute épreuve pour mener toutes les expérimentations dans les meilleures conditions, et pour leur engagement à garder les animaux pendant 4 ans de travail, je vous suis vraiment très reconnaissante.

Toute ma reconnaissance à l'égard de ma famille pour le soutien moral et affectif. Je dédie cette thèse à **mes parents** qui représentent tout pour moi, à **mon frère**, à **mes beaux-parents** et à **toutes ma famille** Amarir, Regba **(et particulièrement mon oncle Regba Said qui m'a toujours soutenu et encouragé et qui est toujours fière de moi, merci cher oncle et aussi mon professeur de PC en Terminal),** et Boukhiri et Rakiz.

A tous **mes amis** (surtout ma chère **Bouchra Ait Bella** merci beaucoup pour tes encouragements et ton soutien et ma chère **Rachida Bazidaz** pour ses aides au laboratoire de biologie moléculaire, ses conseils et surtout ses encouragements, vraiment vous êtes toutes les deux un exemple d'une vraie amitié).

A celles et ceux qui m’ont conseillée et que je n'ai pas cités ici, mais le cœur y est !

Tous mes remerciements à **mon mari Souheil** bien aimé, sans lui cette thèse n'aurait jamais vu le jour, car il m’a beaucoup aidé malgré que sa formation académique soit loin du domaine de la biologie, il a tâché à apprendre beaucoup de pratiques techniques pour m’aider sur le terrain et même au laboratoire, et plus encore pour l'amour qu'il m'a démontré pendant toutes ces années, me permettant de me construire comme chercheuse. Mille merci mon cher mari pour ta patience, ton soutien inestimable.

Je voudrais que cette thèse de doctorat soit un hommage à la mémoire d’une femme qui a tant marqué ma vie depuis ma naissance jusqu’à la fin de ses jours, cette femme qui a représenté une deuxième maman pour moi, d’ailleurs je l’ai toujours appelé **Mma**, et qui m’a offert beaucoup d’amour et de tendresse ; dommage qu’elle ne soit pas là avec nous, mais je suis sûr qu’elle sera fière de moi, paix à son âme, son souvenir restera à vie gravé dans mon cœur et ma mémoire !

Cette thèse a été réalisée grâce à l’appui financier de **l’Académie de Recherche et d’Enseignement Supérieur (ARES) et Namur Research Institute for Life Sciences (NARILIS)**. Un grand merci aux différents gestionnaires.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS ..... **III**

TABLE DES MATIERES ..... **VI**

RESUME ..... **VIII**

ABSTRACT ..... **XI**

LISTE DES ABRÉVIATIONS ..... **XIII**

INTRODUCTION GÉNÉRALE **1**

PREMIÈRE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE SUR L'HYDATIDOSE/ECHINOCOCCOSE **3**

CHAPITRE I : GENERALITES SUR L'HYDATIDOSE **4**

1.1 La problématique de l'hydatidose **4**

1.2 Historique de l'hydatidose **6**

1.3 L'agent causal de l'hydatidose **8**

1.4 Répartition géographique et prévalence de l'hydatidose **13**

1.5 Impact et importance de l'hydatidose **19**

CHAPITRE II : EPIDEMIOLOGIE DE L'HYDATIDOSE **21**

2.1 Aspects épidémiologiques de l'hydatidose **21**

2.2 Aspects zoonotiques de l'Hydatidose chez le chien et le mouton **23**

CHAPITRE III : RELATION HOTE-PARASITE **24**

3.1 Chronologie de l'infection parasitaire **24**

3.2 Réceptivité des hôtes **24**

3.3 Aspects immunitaires chez les moutons et chiens infectés **29**

3.4 Nouveaux marqueurs antigéniques **35**

3.5 Modulation et contrôle du système immunitaire de l'hôte par *Echinococcus granulosus* **35**

3.6 Réponse du parasite face à la réaction immunitaire de l'hôte **38**

CHAPITRE IV : ETUDE DE LA MALADIE : MANIFESTATION CLINIQUE, DEPISTAGE, DIAGNOSTIC ET MOYEN DE CONTROLE DE L'HYDATIDOSE/ECHINOCOCCOSE **40**

4.1 Signes cliniques **40**

4.2 Méthodes de diagnostic **43**

4.3 Moyens de contrôle de l'hydatidose/échinococcose **52**

CHAPITRE V : PROGRAMMES DE LUTTE CONTRE L'HYDATIDOSE AU MAROC ET DANS LE MONDE **60**

5.1 Situation dans le monde : différents moyens suivis dans des programmes de lutte contre l'hydatidose **60**

5.2 Impact de la lutte contre l'hydatidose/échinococcose **71**

5.3 Situation au Maroc avant l'apparition du programme de lutte **71**

5.4 Autres actions de lutte **77**

DEUXIÈME PARTIE : OBJECTIFS, MATÉRIEL ET MÉTHODES **79**

CHAPITRE I : OBJECTIFS DE LA RECHERCHE 80

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES 82

2.1 Critères et choix des régions de l'étude 82

2.2 Schémas expérimentaux des trois études 83

2.3 Analyses et traitement des données statistiques 91

TROISIÈME PARTIE : PRESENTATION DES ETUDES 92

ETUDE 1 : Estimation de l'incidence d'infection par *E. granulosus* chez les chiens errants et à propriétaires au Moyen Atlas au Maroc 93

ETUDE 2 : Détection des kystes hydatiques par échographie hépatique chez les moutons : impact de l'abondance, de la viabilité et de la localisation des kystes 104

ETUDE 3 : L'évaluation de l'efficacité du vaccin EG95NC⁻ sur le développement de kystes hydatiques chez le mouton 120

QUATRIÈME PARTIE : DISCUSION GÉNÉRALE 150

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 161

REFERENCES 164

Résumé

L'échinococcose kystique (EC) est l'une des principales zoonoses responsables de la morbidité et de la mortalité humaines dans le monde. Au Maroc, cette infection pose un grand problème de santé publique par les pertes économiques engendrées chez le cheptel et par son incidence très marquée chez l'homme. Cette zoonose se présente chez l'hôte intermédiaire, généralement un herbivore, et chez l'homme par une forme larvaire représentée par un kyste hydatique qui se trouve dans la plupart des cas dans le foie et/ou les poumons, mais peut également infecter tout autre organe. Chez l'hôte définitif, généralement un chien, *Echinococcus granulosus* est le parasite responsable de la maladie, représenté par un petit ver plat incrusté entre les cryptes intestinales. L'hôte intermédiaire (mouton et autres herbivores) est infecté en ingérant de la nourriture ou en buvant de l'eau contaminée par des œufs éliminés dans les fèces de l'hôte définitif (chien). Les chiens s'infectent en consommant les viscères d'hôtes intermédiaires infectés par le kyste hydatique. L'objectif de ce travail vise à évaluer différentes stratégies de lutte dans le Moyen Atlas, région très endémique au Maroc. La première approche était basée sur le traitement des chiens au Praziquantel (Droncit®) ciblant ainsi le contrôle de l'infection par le ver adulte d'*E. granulosus* chez l'hôte définitif. Et, la deuxième approche était basée sur la lutte immunologique contre le stade larvaire de ce parasite par la vaccination des moutons avec le vaccin EG 95 contre le développement du kyste hydatique. Ce vaccin, utilisé pour la première fois au Maroc et dans le bassin méditerranéen, ainsi qu'en Afrique, chez des moutons naturellement exposés à l'infection. Dans le cadre de ce contexte, des investigations chez les chiens ont été réalisées à Had Oued Ifrane région montagneuse au Moyen Atlas, basée sur l'évaluation de l'effet de la chimioprévention sur l'incidence de l'infection chez une population de 255 chiens issus de trois localités, dont deux catégories de chiens (chiens à propriétaires et chiens errants). Les chiens ont été examinés à trois reprises sur une période allant de 4 à 8 mois entre décembre et août. À chaque investigation, les chiens ont été traités à l'arécoline, ce qui a provoqué la défécation et permis de recueillir les excréments. Les chiens ont ensuite été traités avec du praziquantel. L'examen microscopique des excréments a été effectué pour évaluer le statut infectieux des chiens à chaque investigation, et les échantillons positifs ont subi une copro-PCR pour déterminer la souche circulante d'*E. granulosus*. Une forte prévalence d'infection allant de 23,5% à 38,8% et de 51,3% à 68,5% a été respectivement constatée chez les chiens à propriétaires et les chiens errants. Les résultats de la PCR ont révélé la présence de la souche G1 dans tous les échantillons positifs. Un modèle de régression logistique a été utilisé pour déterminer l'incidence de

l'infection et a montré que les chiens errants présentaient un risque d'infection significativement plus élevé (OR = 14 ; intervalle de confiance à 95% : 6-30 ; p < 0,001) par rapport aux chiens à propriétaires. Le risque mensuel de l'infection en fonction de l'intervalle entre deux traitements diminue si l'intervalle entre traitements diminue. Mais, il reste cependant significativement plus élevé chez les chiens errants. La détermination de l'infection chez le chien n'est pas suffisante pour contrôler ce parasite, l'intervention par le contrôle de l'hôte intermédiaire (mouton) est importante. Pour ce faire, une étude technique préliminaire sur le diagnostic chez les moutons par échographie a été réalisée à l'abattoir de M'Rirt et visait en premier lieu d'évaluer chez 126 moutons âgés entre 1 et 6 ans dans quelle mesure l'échographie permettait de détecter, de quantifier et de qualifier des kystes hépatiques confirmés par autopsie ; et second lieu d'estimer au moyen d'une analyse des kystes présents au niveau hépatique et pulmonaire chez 97 moutons abattus quelle proportion d'animaux présentait exclusivement des kystes pulmonaires non détectables à l'échographie. Cette étude technique a montré une excellente sensibilité de l'échographie hépatique étant donné que 98% des animaux porteurs de kystes ont pu être détectés. Parmi les 126 animaux investigués, 108 présentaient des kystes hépatiques à l'autopsie. Le nombre de kystes augmentant avec l'âge, la capacité de détection atteignait les 100% chez les animaux âgés de 3 ans ou plus. Et parmi les 98 animaux infectés et examinés uniquement à l'autopsie, 22% de ces animaux présentaient uniquement des kystes pulmonaires. Chez ces animaux, le nombre moyen de kystes était plus faible (2,6) par rapport à ceux présentant des kystes hépatiques et pulmonaires (13,3 en moyenne). Pour étudier l'effet protecteur du vaccin EG 95, un effectif de 402 agnelles ont été recrutées pour la vaccination annuelle avec le vaccin anti-*E. granulosus* EG95 et 395 agnelles similaires ont été sélectionnées comme témoins non vaccinées. Elles ont été évaluées pendant quatre années consécutives dans différentes régions du Moyen Atlas marocain avec un traitement des chiens tous les 4 mois. À l'âge d'environ quatre ans, le risque relatif d'infection des moutons vaccinés par des kystes hydatiques viables par rapport aux témoins non vaccinés était de 3 % (9,37% des moutons vaccinés ont été trouvés infectés alors que 72,82% des témoins étaient infectés ; p=0,002). La proportion de chiens infectés a diminué de manière significative après le traitement (12% contre 35% ; p<0,001). L'incidence de la réinfection après le traitement correspondait à un risque mensuel de 4 % (IC à 95% : 3-6%). Dans les circonstances épidémiologiques existant dans la zone d'essai, un traitement quadrimestriel des chiens à propriétaire avec du praziquantel était insuffisant pour avoir un impact majeur sur la transmission d'*E. granulosus* aux moutons. Les résultats des échographies et des autopsies suggèrent que la vaccination des moutons par le EG95 a le potentiel de réduire le niveau de

l’infection par l’échinococcose kystique au Maroc et dans d'autres parties du monde ayant un contexte épidémiologique similaire.

Mots clés : *Echinococcus granulosus*, vaccin recombinant EG95, échinococcose kystique, mouton, chien, incidence, praziquantel, Maroc.

Abstract

Cystic echinococcosis (CE) is one of the major zoonoses responsible for human morbidity and mortality in the world. In Morocco, this infection remains a major public health and economic problem because of the economic losses in livestock and its very high incidence in humans. This zoonosis occurs in the intermediate host, usually an herbivore, and in humans by a larval form represented by a hydatid cyst which is found in most cases in the liver and/or lungs, but can also infect any other organ. In the definitive host, usually a dog, *Echinococcus granulosus* is the parasite responsible for the disease, represented by a small worm encrusted in the intestinal crypts. The intermediate host (sheep and other herbivores) is infected by ingesting food or drinking water contaminated by eggs eliminated in the feces of the definitive host (dog). Dogs become infected by consuming the viscera of intermediate hosts infected with hydatid cyst. The main objective of this work was to evaluate different control strategies in the Middle Atlas, a very endemic region in Morocco. The first approach was based on the treatment of dogs with Praziquantel (Droncit®) aiming at controlling the adult worm infection by *E. granulosus* in the definitive host. The second approach was based on an immunological control of the larval stage of this parasite by vaccinating sheep with the EG 95 vaccine against the development of hydatid cysts. This vaccine, was used for the first time in Morocco and the Mediterranean basin, as well as in Africa, in sheep naturally exposed to the infection. In this context, investigations in dogs were carried out in the Had Oued Ifrane mountainous region in the Middle Atlas, which was based on the evaluation of the effect of chemoprevention on the incidence of infection in a population of 255 dogs from three localities, including two categories of dogs (owned dogs and stray dogs). The dogs were examined three times over a period of 4 to 8 months between December and August. At each investigation, the dogs were treated with arecoline, which caused defecation and allowed for the collection of feces. The dogs were then treated with praziquantel. Feces were microscopically examined to assess the infectious status of the dogs at each investigation, and positive samples were subjected to copro-PCR test to determine the circulating strain of *E. granulosus*. A high prevalence of infection ranging from 23.5% to 38.8% and 51.3% to 68.5% was found in owned dogs and stray dogs, respectively. PCR results revealed the presence of the G1 strain in all positive samples. A logistic regression model was used to determine the incidence of infection and showed that stray dogs had a significantly higher risk of infection (OR = 14; 95% confidence interval: 6-30; $p < 0.001$) compared to owned dogs. The monthly risk of infection as a function of the interval between treatments decreased as the interval between treatments decreased. However, there remained a

significantly higher incidence of infection in stray dogs. Decrease of infection in dogs is not sufficient to control this parasite, so intervention by control of the intermediate host (sheep) is important. To this end, a preliminary technical study on ultrasound diagnosis in sheep was carried out at the M'Rirt slaughterhouse. The first objective was to evaluate the performance of ultrasound to detect, quantify and qualify cysts in 126 sheep between 1 and 6 years of age confirmed by autopsy; and secondly, to estimate by means of an analysis of cysts present in the liver and lungs in 97 slaughtered sheep, what proportion of animals had exclusively lung cysts that were not detectable on ultrasound. This technical study showed an excellent sensitivity of hepatic ultrasound since 98% of the animals carrying cysts could be detected. Among the 126 animals investigated, 108 had hepatic cysts at autopsy. As the number of cysts increases with age, the detection capacity reached 100% in animals aged 3 years or more. And among the 98 animals infested and examined only at autopsy, 22% of these animals had only lung cysts. In these animals, the mean number of cysts was lower (2.6) compared to those with liver and lung cysts (13.3 on average). To study the protective effect of the EG 95 vaccine, 402 lambs were recruited for annual vaccination with the EG 95 vaccine and 395 similar lambs were selected as unvaccinated controls. They were assessed for four consecutive years in different regions of the Moroccan Middle Atlas Mountains with treatment of dogs every 4 months. At approximately four years of age, the relative risk of infection of vaccinated sheep with viable hydatid cysts compared to unvaccinated controls was 3% (9.37% of vaccinated sheep were found to be infected while 72.82% of controls were infected; $p=0.002$). The proportion of infected dogs decreased significantly after treatment (12% versus 35%; $p<0.001$). The incidence of re-infection after treatment corresponded to a monthly risk of 4% (95% CI: 3-6%). Under the epidemiological circumstances in the test area, a four-monthly treatment of owned dogs with praziquantel was not sufficient to have a major impact on the transmission of *E. granulosus* to sheep. Ultrasound and necropsy results suggest that vaccination of sheep with EG95 has the potential to reduce the level of cystic echinococcosis in Morocco and other parts of the world with similar epidemiological context.

Key words: *Echinococcus granulosus*, EG95 recombinant vaccine, cystic echinococcosis, sheep, dog, incidence, praziquantel, Morocco.

Liste des abréviations

OMS	**:** Organisation Mondial de la santé
GST	**:** Glutathion-S-transférase
pH	**:** Potentiel hydrogène
DELM	**:** Direction de l'Epidémiologie et de Lutte contre les Maladies
ANOC	: Association nationale des éleveurs ovins et caprins
ONSSA	: Office National de Sécurité Sanitaire des produits Alimentaires
ADN	: Acide désoxyribonucléique
IgE, M, G, A	: Immunoglobulines E, M, G, A
Fc	: Fragment cristallisable récepteur
Th1 et 2	: T helper 1 et 2
Ag	: Antigène
IL	: Interleukines
IFN-y	: Interféron gamma
C5	: complement 5
US	: Ultrasond
CT	: Computed Tomography
PV	: Poids Vif
TDM	: Tomodensitométrie
IRM	: Image de Résonnance Magnétique
WHO	: World Health Organization
CE	: Cystic Echinococcosus
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
PCR	: Polymerase Chain Reaction
kDa	: Kilodalton
E.coli	: *Escherichia coli*

QuilA : Quillaja saponaria Molina Adjuvant

USA : United States of America

NARILIS : Namur Research Institute for Life Sciences

HC : Hydatid Cyst

Echo : Echographie

COI : Cytochrome c oxydase 1

NDI : NADH dehydrogenase

OR : ODDS RATIO

Cl : Confidence interval

IRR : Incidence Rate Ratio

DEFT : Standard Errors and Design Effects

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'Echinococcose kystique est une zoonose cosmopolite, due au développement chez les herbivores et l'homme d'une larve d'un tænia du chien : *Echinococcus granulosus*.

Elle est très répandue dans les pays où l'élevage du mouton est pastoral et traditionnel (Belamalem et al., 2014). Les pays méditerranéens font partie de ces pays connus par l'élevage ovin qui est une pratique surtout fortement ancrée dans les traditions des pays de l'Afrique du nord dont fait partie le Maroc (Boulanouar and Paquay, 2008).

Au Maroc, la maladie du kyste hydatique sévit à l'état endémique dans plusieurs régions du pays. Ce sont surtout les régions rurales qui sont les plus touchées. L'incidence y est de 5,2 cas opérés pour 100.000 habitants. Le Maroc est le troisième pays le plus affecté au Maghreb après la Tunisie et l'Algérie (Chebli et al., 2017).

Le Moyen Atlas est parmi les régions les plus endémiques au Maroc (Azlaf et al., 2007). Le mouton de la race Timahdit y est élevé et on y trouve une grande population canine.

La présente étude a été réalisée dans des zones montagneuses du Moyen Atlas au Maroc et elle s'insère dans le cadre d'un projet de recherche pour le développement (PRD), financé par l'Académie de Recherche et d'Enseignement Supérieur (ARES, Belgique), l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II (Rabat, Maroc) et Narilis, Université de Namur (Namur, Belgique), visant à évaluer les différentes méthodes de lutte et à renforcer les stratégies de lutte contre l'échinococcose kystique au Maroc.

Ce travail vise une approche intégrée de lutte en se basant sur deux outils de lutte. Premièrement, une lutte par le traitement anthelminthique du chien (hôte définitif) dont le but est de déterminer les facteurs influençant l'infection, la prévalence et l'incidence de l'infection chez les chiens, et l'évaluation de la chimio prévention contre le taenia *E. granulosus* (stade adulte) en fonction du type de chien et en fonction du temps d'exposition. Deuxièmement, une lutte immunologique, par la vaccination des moutons (hôte intermédiaire) par le vaccin EG 95NC- contre le développement du stade larvaire *d'E. granulosus*. Ce vaccin a été utilisé pour la première fois au Maroc chez des moutons exposés naturellement à l'infection. L'objectif était de déterminer dans quelle mesure la vaccination des moutons dès leur plus jeune âge, pourrait réduire l'apparition de l'échinococcose kystique chez les moutons adultes.

Le présent document est scindé en trois parties, la première concerne une étude bibliographique de l'échinococcose kystique, la deuxième énonce l'approche expérimentale adoptée et la troisième détaille les résultats obtenus ainsi que leur discussion.

PREMIÈRE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE SUR L'HYDATIDOSE/ECHINOCOCCOSE

CHAPITRE I : GENERALITES SUR L'HYDATIDOSE

1.1 La problématique de l'hydatidose

L'échinococcose kystique est l'une des plus importantes zoonoses parasitaires sévissant dans différentes régions du monde. Compte tenu de la grande endémicité et de la gravité de la maladie, en 2012, l'OMS établissait une feuille de route pour 2020 dans laquelle l'échinococcose kystique a été classée parmi les 17 maladies négligées (OMS, 2012). Cependant, l'échinococcose kystique est difficile à contrôler dans la plupart des zones endémiques continentales (Zhang et al., 2018). Cette zoonose se manifeste chez l'hôte intermédiaire, généralement un herbivore, et chez l'Homme par une forme larvaire représentée par un kyste hydatique uniloculaire qui se loge dans la majorité des cas au niveau du foie et/ou des poumons, mais il peut aussi infecter tout autre organe. Chez l'hôte définitif, un canidé, généralement le chien, *Echinococcus granulosus* se présente sous forme d'un ver plat de petite taille qui s'incruste entre les cryptes intestinales (Christofi et al., 2002). L'hôte intermédiaire (moutons et autres herbivores) s'infecte suite à l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminés par des œufs éliminés dans les fèces de l'hôte définitif. Ce dernier se contamine en ingérant des viscères d'hôtes intermédiaires infectés par le kyste hydatique.

L'hydatidose constitue depuis longtemps une maladie cosmopolite et endémique (Dakkak, 2010), en particulier dans les pays du bassin méditerranéen, ainsi qu'en Océanie et en Amérique du Sud (Schantz, 2006). Le Maroc est considéré comme une zone hautement endémique avec des prévalences élevées aussi bien chez les animaux d'élevage que chez l'Homme. Les régions du Moyen Atlas représentent l'une des régions les plus endémique au Maroc, avec une prévalence d'infection élevée chez les animaux de 91,7% chez les brebis adultes (âge > 4 ans à l'autopsie), et chez l'Homme à l'échographie abdominale de 1,9% (Chebli et al., 2017).

Une importante population de canidés est présente dans ces régions. Celle-ci inclut des chiens à propriétaires, des chiens errants, des chacals et des renards (Maghnouj, 1999).La prévalence d'infection chez les chiens varie entre 22% et 68,2% à travers différentes régions du Maroc (Ouhelli et al., 1997). L'étude menée par (Azlaf and Dakkak, 2006) dans plusieurs régions du Maroc chez des animaux examinés, toutes catégories d'âge cofendues, a révélé des taux de prévalence de 10,58% chez les ovins, 1,88% chez les caprins, 22,98% chez les bovins, 12,03% chez les camelins et 17,8% chez les équidés. L'étude menée par (El Berbri et al., 2015b) dans la région de Sidi Kacem a révélé une prévalence de 42,9 % chez les bovins, 11 % chez les

ovins et 1,5 % chez les caprins. Toutefois, l'abondance des chiens errants et les pratiques d'abattage permettant aux chiens d'avoir accès aux abats condamnés, en particulier dans les zones rurales, contribuent à la persistance de l'hydatidose.

Cette zoonose représente un grave problème de santé publique et a un impact socio-économique important. L'infection à *Echinococcus granulosus* constitue une contrainte financière importante dérivée des coûts de santé humaine et des pertes de production animale. Le fardeau économique de l'échinococcose kystique sur l'industrie mondiale de l'élevage a été estimé à plus de 2 milliards de dollars par an (Otero-Abad and Torgerson, 2013). Malgré l'impact socio-économique substantiel, l'hydatidose reste toujours une zoonose négligée (Otero-Abad and Torgerson, 2013). Au Maroc, les pertes moyennes dues à l'échinococcose kystique ont été estimées entre 0,07% et 0,06% du produit intérieur brut (PIB) annuel du pays, et chez l'Homme, les pertes annuelles moyennes ont été estimées entre 16 et 18 millions USD par an et celles liées à l'infection animale entre 53 et 56 millions USD par an (Saadi et al., 2020).

Bien qu'un programme de lutte ait été formulée pour le Maroc en 2007 (Comité interministériel de lutte contre l'hydatidose, 2007), les efforts déployés pour le mettre en œuvre ont été incohérents et l'incidence de l'échinococcose kystique dans le pays semble avoir peu changé au cours des années suivantes (DELM, 2015). Le plan visait à (i) briser le cycle biologique du parasite en utilisant un anthelminthique chez les chiens et à réduire l'infection chez les ruminants et les humains, (ii) détecter et traiter les cas humains de manière précoce et (iii) élaborer un arsenal législatif et réglementaire approprié (Comité interministériel de lutte contrel''hydatidose, 2007). Dans d'autres parties du monde, certaines stratégies de lutte ont été couronnées de succès, notamment celles entreprises dans des îles (Islande, Nouvelle-Zélande, Tasmanie, Islas Malvinas et Chypre), ainsi que dans un nombre limité de régions continentales (Chili, Argentine, Uruguay) (Craig et al. 2017). Les programmes de contrôle réussis ont porté sur l'amélioration des abattoirs, l'utilisation de purgatifs et de cestocides pour les chiens, la réglementation de l'abattage des moutons à domicile et la vaccination des hôtes intermédiaires (Economides, Christofi and Gemmell, 1998).

Cette revue de littérature consacrée à la problématique de l'hydatidose abordera dans un premier temps son historique, son agent causal, sa répartition géographique et sa prévalence ainsi que son impact socio-économique. Dans un 2e chapitre, les aspects épidémiologiques seront abordés avant de décrire la relation hôte-parasite dans le 3e chapitre. En ciblant surtout le contexte marocain, les différentes facettes de la maladie, de son diagnostic et de son contrôle

chez l'Homme, le chien et le mouton seront présentées dans le 4e chapitre. Enfin, le 5e chapitre s'attardera sur le plan de lutte existant au Maroc.

1.2 Historique de l'hydatidose

1.2.1 À travers le monde

L'hydatidose est une affection connue depuis l'antiquité, Hippocrate écrivait :

« Quand le foie est plein d'eau, il se rompt dans l'épiploon, le ventre se remplit d'eau et le malade succombe », et même le Talmud (textes fondamentaux du judaïsme rabbinique) a rapporté l'existence de "boules d'eau " dans les viscères d'animaux sacrifiés rituellement.

Plusieurs dates ont marqué la caractérisation de la maladie, ainsi, elle a fait l'objet de nombreux articles de recherches, résumés dans le tableau suivant et les principaux chercheurs qui ont marqué l'histoire de l'échinococcose (figure 1) :

Tableau 1. Principales étapes de la caractérisation de l'échinococcose/hydatidose (Khayat, 2006)

Année	Événement
17e siècle	Description de la maladie d'hydatidose par Thebesius.
1766	Poller a été le premier à rapporter la nature parasitaire de la maladie.
1776	Pallas reconnait le kyste hydatique comme étant un organisme vivant et il a observé les protoscolex.
1804	Mise en évidence de la différence entre l'hydatidose humaine et animale par Laennec.
1808	Rudolphi a employé la première fois le terme kyste d'hydatide pour décrire l'échinococcose chez l'homme.
1812	Identification du parasite par Bresher.
1835	Identification du mode de transmission du parasite par Von Steboud.
1862	Reproduction expérimentale du cycle parasitaire par Leuckart et Heubner à partir de vers adultes.
1872	Reproduction expérimentale du cycle du parasite par Nauxyn en Allemagne, et Kabb en Islande, à partir de protoscolex d'origine humaine.
1902	Mise en évidence du mécanisme anaphylactique provoqué par le parasite
1949	Publication de deux importantes monographies sur l'échinococcose primaire et secondaire par Félix.
1950	Étude de la thérapeutique de la maladie à l'occasion du premier congrès mondial du kyste hydatique qui a eu lieu à Aigre.
1961	Réalisation du test immunologique par fixation du complément par Fishman
1964	Smyth et Smyth ont rapporté l'hermaphrodisme d*'E. granulosus* et la multiplication asexuée des larves avec possibilité de mutations.
1966	Utilisation de l'électrophorèse dans le diagnostic par Capron.
1983	Saimot publiait les premiers résultats obtenus avec l'Albendazole et l'utilisation de l'Arécoline comme purgatif pour le diagnostic de l'échinococcose chez le chien commencera à partir de 1985.

1996	Thompson et Lymbery ont constaté que la majeure partie de variations génétiques d'*Echinococcus granulosus* se produit entre les populations locales avec peu de variation de la structure.
1996	Description d'un vaccin efficace sur base d'un antigène de l'oncosphère EG95 par Lightowlers et ses collaborateurs.
2002	L'identification de dix génotypes différents *d'Echinococcus granulosus* par Thompson et McManus.

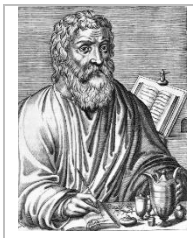
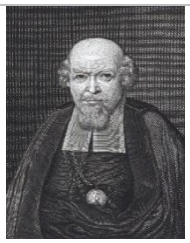
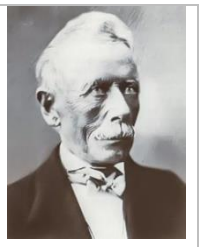
					
Hippocrate Médecin grec 460 - 370 avant J.-C.	**August Batsch** Naturaliste allemand 1761 - 1802	**Johann Wepfer** Pathologiste et Pharmacologiste suisse 1620 - 1695	**Karl Rudolphi** Zoologiste allemand 1771 - 1831	**Karl Leuckart** Zoologiste allemand 1822 - 1898	**Karl Diesing** Zoologiste autrichien 1800 - 1867

Figure 1. Principaux chercheurs qui ont marqué l'histoire de l'échinococcose (Maillard et al., 2009)

1.2.2 Au Maroc

Les principales dates qui ont marqué la caractérisation de l'échinococcose hydatique au Maroc (Tableau 2).

Tableau 2. Principales étapes de la caractérisation de l'échinococcose/hydatidose au Maroc

Année	Événement
1923	Dekester et Martin ont rapporté 24 cas d'hydatidose sur une période de 27 mois à l'hôpital COCCARD de Fès.
1924	Étude épidémiologique qui faite par Dekester, confirmant la forte fréquence de l'échinococcose au Maroc.
1935	Martin et Arnaud conclurent, lors de la réunion mondiale de la fédération des sociétés médicales maghrébines, que l'hydatidose reste une maladie assez rare dans le Royaume.
1949	Fauve a constaté que l'hydatidose au Maroc est bien présente voire même endémique.
1955	Lahbabi décrit la fréquence de l'hydatidose au Maroc dans sa thèse.
1980	L'OMS lors de sa réunion à Fès, a estimé que les chiffres officiels ne représentent que 28% des cas réellement opérés pour l'hydatidose. Le taux d'incidence chirurgicale pour l'ensemble du pays sera de 8,42 pour 100 000 habitants.
1986	Travaux réalisés au CHU de Rabat par Benchekroun et Lakrissa, soulignaient les difficultés du diagnostic et de la thérapeutique.
2003	Un arrêté ministériel (Arrêté ministériel N° 1020-03 du 23 Mai, B.O N° 5122 du 3 juillet 2003) rend la déclaration du kyste hydatique obligatoire chez l'Homme.

2004 - 2005	Un comité interministériel (Ministère de la Santé, Ministère de l'Agriculture et Ministère de l'Intérieur) a été constitué afin de mettre en place une stratégie de lutte contre l'hydatidose. Le programme national de lutte a vu le jour en 2005 et a eu pour but de réduire de moitié le taux d'incidence de l'hydatidose.
2010-2015	Projet ICONZ dérigé par le laboratoire de parasitologie de l'IAV, dont l'objectif est de mener une lutte intégrée contre les zoonoses négligées avec un volet sur les zoonoses émanent du chien (leishmaniose, rage et échinococcose).
2011	Étude socio-culturelle menée par le laboratoire de parasitologie de l'IAV-Rabat Maroc, en collaboration avec l'IMT d'Anvers sur la représentation de l'échinococcose par les communautés.

1.3 L'agent causal de l'hydatidose

1.3.1 Classification du parasite *E. granulosus*

Echinococcus granulosus est un cestode ténidé typique, de petite taille (3-6mm) dépourvu du tube digestif qui pratique ses échanges à l'aide de son tégument syncytial externe. Il se développe suivant un cycle indirect à deux hôtes, dont l'adulte qui est un hermaphrodite, se reproduit sexuellement dans les intestins des canidés, et la larve qui est un métacestode et qui se représente sous forme de kyste hydatique chez l'hôte intermédiaire prolifère d'une manière asexuelle (Thompson, 2017).

D'après Chauve et Thompson, *Echinococcus granulosus* appartient au (Chauve, 1990; Thompson et al., 1995; Thompson, 2017) :

- **Règne** : Animalia
- **Embranchement** : Plathelminthes

Ver plat au corps mince et souple, triploblastique à symétrie bilatérale, acœlomate et aplati dorso-ventralement avec un système excréteur qui se compose de protonéphridies et des cellules de flamme.

- **Classe** : Cestoda

Endoparasite ; dépourvue de tube digestif ; corps externe recouvré d'un tégument syncytial vivant avec des microtriches.

- **Sous-classe** : Eucestoda

Teania ; l'adulte est caractérisé par un corps allongé (strobile) composé d'un ensemble linéaire d'organes reproducteurs (proglottis) ; attachement antérieur spécialisé (scolex) ; hermaphrodite à cycle de vie indirect.

- **Ordre** : Cyclophyllidea

Scolex avec quatre ventouses et un rostellum armé de crochets ; strobile constituée d'un ensemble de proglottis à divers stades de développement, avec chaque proglottis étant clairement délimité par une segmentation externe ; œufs ronds, non operculés, contenant une oncosphère à six crochets non conciliés.

- **Famille** : Taeniidea

Adulte vit dans l'intestin grêle d'un mammifère ; tous les hôtes intermédiaires sont des mammifères ; scolex avec rostellum armé d'une double rangée de crochets ; organes génitaux non appariés dans chaque proglottis, avec des pores génitaux irrégulièrement distribués marginalement ; œufs avec « coquille » dure et striée radialement ; le métacestode est un cysticerque, un cœnure, une hydatide ou un strobilocerque.

- **Sous-famille** : Echinococcinae
- **Genre** : *Echinococcus*
- **Espèce** : *granulosus*

La détermination exacte et finale de la taxonomie d'*Echinococcus granulosus* est restée pendant des décennies controversée et a fait l'objet de plusieurs études et révisions. Ceci est dû principalement à la méthode de définition des espèces appartenant au genre *Echinococcus*. Cette définition se base sur la morphologie du parasite adulte et du métacestode, en combinant les paramètres biologiques, immunologiques et épidémiologiques (Thompson et McManus, 2002).

Des études moléculaires récentes ont montré que 9 espèces présentant une importance en pathologie humaine et vétérinaire (Thompson, 2017). Ces espèces sont les suivantes :

- *Echinococcus granulosus*
- *Echinococcus multilocularis*
- *Echinococcus equinus E.granulosus G4*

- *Echinococcus ortleppi E.granulosus G5*
- *Echinococcus canadensis E.granulosus G7*
- *Echinococcus felidis*
- *Echinococcus vogeli*
- *Echinococcus oligarthrus*
- *Echinococcus shiquicus*

1.3.2 Aspects génétiques du parasite *E. granulosus*

L'analyse de l'ADN mitochondrial a permis de définir 10 souches (Lavikainen et al., 2003) parmi tous les variants observés chez *E. granulosus sensu stricto (ss)* G1, G2 and G3 et *E.granulosus sensu lato (s.l.)* (G4, G5, G6, G7, G8, G9, G10 and *E.felidis*) (tableau 3). Le détail des hôtes définitifs et intermédiaires ainsi que la répartition géographique de chaque souche, sont présentés dans le tableau 3 et figure 2 :

Tableau 3. Souches génotypiques d'*E. granulosus* (Schantz, 2006).

Génotype	Hôte intermédiaire	Hôte définitif	Réparation géographique	Possibilité de l'infection humaine
G1 mouton	Moutons, bovins, porcs, chameaux, chèvres	Chien, renards, dingos, chacals, hyènes	Europe, USA, Afrique, Russie, Moyen-Orient	Oui
G2 mouton de Tasmanie	Moutons	Chiens, renards	Argentine, Tasmanie	Oui
G3 buffle	Buffles, autres bovins	Chiens, renards ?	Asie	?
G4 cheval	Équidés	Chiens	Europe, Moyen-Orient, Afrique du Sud	Non
G5 bétail	Bovidés	Chiens	Europe, Inde, Népal Russie, Afrique du Sud	Oui
G6 chameau	Camélidés, chèvres	Chiens	Moyen-Orient, Afrique, Europe,	Oui
G7 porc	Porcs	Chiens	Russie, Amérique du Sud	Oui
G8 cervidés	Élans, caribous, rennes	Loups, coyotes,	Amérique du Nord, Eurasie, Pologne	Oui
G9 souche innominée	Porcs	Chiens, loups		Oui
G10 cervidé de Scandinave	Rennes, élans	Loups, chiens	Eurasie	?

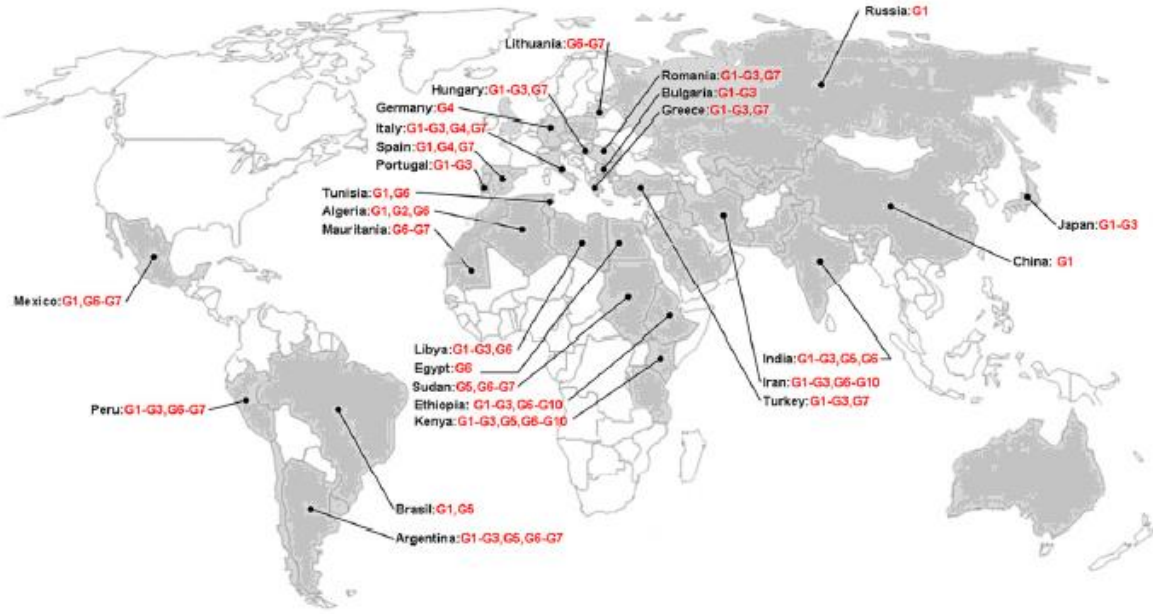


Figure 2. Épidémiologie moléculaire globale du complexe *Echinococcus granulosus s.l.* chez les animaux de rente, basée sur la littérature publiée de 2000. Les zones en gris, indiquent les pays où l'échinococcose kystique a été signalée pendant la même période, mais aucune donnée moléculaire n'est actuellement disponible (Cardona and Carmena, 2013).

La souche ovine commune G1, affecte les ruminants, les ânes, les porcins et l'Homme. La localisation chez l'hôte intermédiaire touche surtout le foie et les poumons. Les hôtes définitifs selon une révision de la taxinomie effectuée par (Thompson and McManus, 2002) sont le chien, le loup, le renard, le chacal et le dingo. La souche ovine espagnole affecte en plus des ovins, les bovins, les caprins, les porcs, le sanglier et l'Homme (Mwambete, Gordo and Bandera, 2004), alors qu'en Italie la souche G1 affecte le buffle (*Bubalus bubalis*) (Capuano et al., 2006).

Cette souche prédomine dans le bassin méditerranéen. La présence de cette souche chez le mouton coïncide également avec des prévalences élevées d'hydatidose humaine dans les mêmes zones (Varcasia et al., 2007).

Les études faites en Grèce (Varcasia et al., 2007), révèlent que les ovins sont infectés principalement par la souche ovine G1 mais aussi par la souche G3. En Italie, les souches G1 et G3 sont trouvées chez le buffle (Garippa, 2006).

Du fait du faible degré d'hétérogénéité génomique entre les souches G1, G2 et G3, plusieurs auteurs proposent de les inclure dans une seule espèce nommée *E. granulosus sensu stricto* (Varcasia et al., 2007).

La souche équine G4 infecte le cheval et l'âne. Cette souche ne semble pas affecter l'homme. La localisation privilégiée chez l'hôte intermédiaire est le foie (Torgerson and Heath, 2003a).

La souche bovine G5 touche rarement l'homme. La localisation chez l'hôte intermédiaire est surtout pulmonaire (Kamenetzky et al., 2002).

La souche caméline G6 peut être à l'origine de l'hydatidose humaine. Le foie et les poumons sont les organes les plus touchés chez les hôtes intermédiaires (Maillard et al., 2007).

La souche porcine (G7 et G9) infecte le porc et le sanglier mais aussi les caprins.

La souche des cervidés (G8 et G10) infecte les cervidés (Renne, Elan, Cerf) et l'Homme. La localisation chez l'hôte intermédiaire est le poumon (Romig, Dinkel and Mackenstedt, 2006).

En Algérie, les souches G1, G2 et G6 ont été mises en évidence (Maillard et al., 2007). En Kirghizstan, les analyses moléculaires révèlent la présence de 3 souches d*'E. granulosus* chez le chien : G1, G4 et G6 (Ziadinov et al., 2008). En Tunisie, les analyses moléculaires révèlent la présence de la souche ovine (G1), de la souche cameline (G6) (Lahmar et al., 2004; Oudni et al., 2004) et de la souche bubaline (G3) (M'rad et al., 2010).

1.3.3 Cycle évolutif du parasite *E. granulosus*

Echinococcus granulosus requiert deux mammifères pour compléter son cycle (figure 3).

Les segments ovigères ou les œufs, sont libérés dans les fèces de l'hôte définitif qui est un carnivore. Les œufs, sont alors ingérés par un hôte intermédiaire.

Le cycle est complet quand l'hôte définitif, un carnivore, mange les organes infectés de l'hôte intermédiaire (Thompson and McManus, 2002). L'action du suc gastrique et de la mastication aboutissent à l'ouverture de ces kystes et libèrent les protoscolex dans le tube digestif qui vont s'invaginer sous l'action d'acidification du pH et l'exposition à la bile et une augmentation de la température et vont s'attacher à la muqueuse intestinale dans l'intestin grêle de l'hôte définitif, et vont se développer envers adultes.

Après ingestion des œufs par un hôte intermédiaire sensible (dans les conditions naturelles : ovins, caprins, porcins, bovins, chevaux et camélidés), les œufs sont acheminés dans l'intestin grêle et libèrent des oncosphères. Ces derniers traversent la barrière intestinale et

migrent par voie sanguine vers divers organes, particulièrement le foie et les poumons. Dans ces organes, l'oncosphère se développe graduellement en kyste. Des protoscolex et des vésicules filles se développent et remplissent l'intérieur de l'hydatide.

L'Homme s'infecte accidentellement par ingestion des œufs d'*E. granulosus*. Il constitue un cul de sac écologique dans le cycle de transmission du parasite, mais le cycle chien-homme est possible au Turkana (Kenya), où les cadavres humains sont traditionnellement abandonnés aux charognards. Donc le Kenya, est le seul pays où l'Homme est un véritable « hôte intermédiaire » (Bourée and Bisaro, 2007).

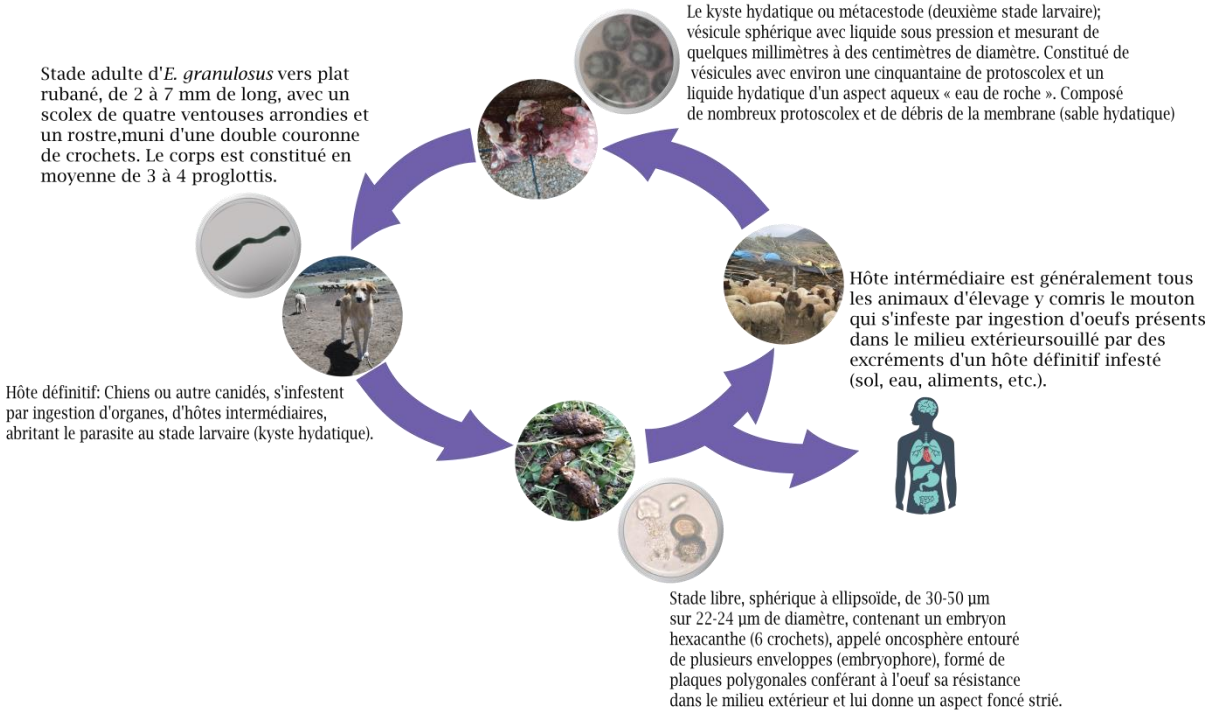


Figure 3. Cycle évolutif d'*Echinococcus granulosus* (Réalisé par Amarir)

1.4 Répartition géographique et prévalence de l'hydatidose

L'échinococcose kystique est classée parmi les zoonoses parasitaires majeures dans le monde (figure 4). Les prévalences d'infection varient considérablement d'une aire géographique à une autre (Dakkak, 2010).

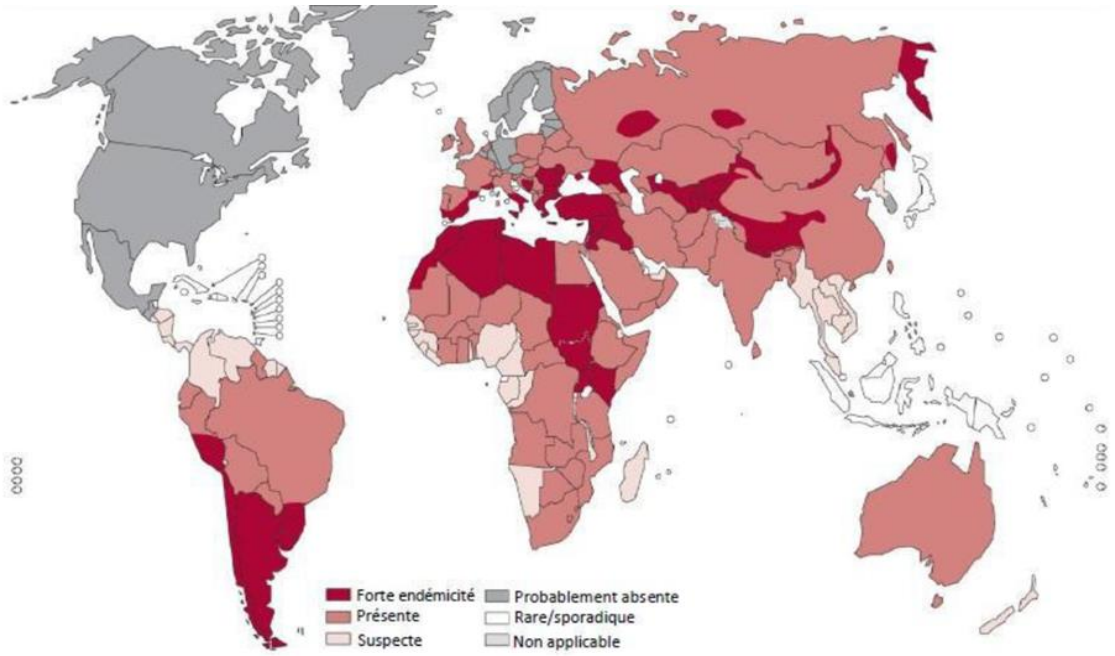


Figure 4. Répartition géographique de l'hydatidose dans le monde (OMS, 2012).

1.4.1 Prévalence de l'hydatidose dans le monde

La prévalence la plus élevée du parasite se rencontre dans certaines régions d'Eurasie, d'Afrique, d'Australie et d'Amérique du Sud. Dans les zones d'endémie, la prévalence du parasite varie de sporadique à endémique, mais seuls quelques pays peuvent être considérés comme indemnes d'*Echinococcus granulosus* (Eckert et al., 2002) Figure 4.

Il a été enregistré que l'échinococcose kystique chez les moutons est très endémique en Éthiopie, en Libye et en Tanzanie, avec des prévalences moyennes estimées à 32%, 20% et 35% respectivement. Des prévalences plus faibles, allant de 0,3% à 11%, ont été documentées en Égypte, au Kenya, en Mauritanie, et au Soudan. Une situation très similaire a été observée chez le caprin, avec des taux de prévalence élevés en Éthiopie (moyenne estimée : 29%) et en Tanzanie (35%) (Cardona and Carmena, 2013).

En Europe l'échinococcose kystique chez les ovins représente un problème de santé animale majeure, préoccupant en Grèce, en Italie (en particulier sur l'île de Sardaigne) et en Turquie, où les prévalences moyennes estimées varient de 20 à 54%. Des taux d'infection par le kyste hydatique ont été signalés chez les ovins en Bulgarie, en Espagne et en Roumanie, allant de 1% à 7%, tandis qu'en Autriche et en Allemagne, les taux de prévalence signalés étaient inférieurs à 1%. Des taux d'infection élevés ont également été constatés chez le caprin en Turquie (22,1%), en Bulgarie (10,5%) et en Grèce (moyenne estimée : 9,8%) (Cardona and Carmena, 2013).

En Asie, les moutons affichent de forts taux d'infection en Chine, dans certaines régions d'Iran, au Kazakhstan, au Turkménistan et en Ouzbékistan, avec des prévalences moyennes estimées allant de 50 à 83% (Cardona and Carmena, 2013).

En Amérique, l'infection par l'échinococcose kystique a été très marquée dans certains pays d'élevage de moutons, avec des prévalences moyennes estimées à 75% au Pérou, 13,6 au Brésil, 9,8% en Uruguay, 9,0 en Argentine et 7,2% au Chili. Un taux de prévalence très élevé de 80% a également été constaté chez les bovins au Pérou, tandis que des taux d'infection moyens de l'ordre de 12 à 20% ont été signalés chez les bovins en Argentine, au Brésil et au Chili (Cardona and Carmena, 2013).

En Australie, la prévalence de l'infection des bovins du Queensland se situe entre 15 et 21%, bien que seulement 0,15% des bovins examinés présentent des kystes viables alors les données sur la prévalence chez les moutons n'ont pas été publiées (Cardona and Carmena, 2013).

1.4.2 Prévalence de l'Hydatidose humaine au Maroc

Au Maroc l'hydatidose sévit à l'état endémique et pose un grand problème de santé publique, engendrant ainsi d'énormes pertes économiques. Son incidence chirurgicale en 2008 était de 5,2 pour 100 000 habitants (Derfoufi et al., 2012, El Amrani Idrissi et al., 1997). En outre, la Direction de l'épidémiologie et de lutte contre les maladies rapporte que les cas d'hydatidose entre les années 1980 et 2008 atteignent 23 512 cas avec une répartition annuelle croissante du nombre des cas et de leur incidence chirurgicale (Figure 5). Selon une étude réalisée par Chebli au Moyen Atlas, l'homme représente une prévalence d'infection à l'échographie de 1,9% (Chebli et al., 2017). Une prévalence similaire détérminée chez l'Homme par échographie abdominale, a été rapporté (Kachani, 2000; Macpherson, 2005).

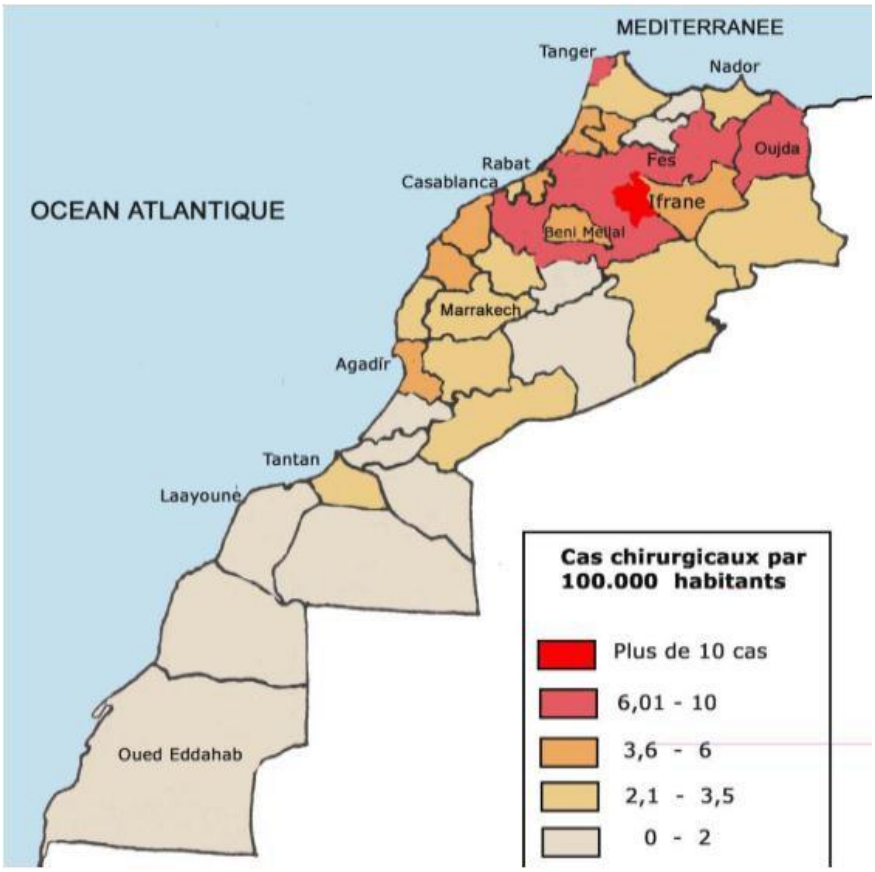


Figure 5. Distribution géographique des cas chirurgicaux au Maroc (DELM, 2008)

1.4.3 Hydatidose au Maroc chez les herbivores

Une étude épidémiologique visant à mettre à jour la prévalence de l'infection par l'échinococcose kystique chez les différentes espèces animales, présentes dans différentes régions les plus endémiques du Maroc fut menée par (Azlaf and Dakkak, 2006). Cette étude a consisté en une inspection post mortem de 2948 moutons, 2337 chèvres, 618 bovins, 482 dromadaires et 455 équidés (325 chevaux, 60 mulets et 70 ânes) dans cinq régions : le Rif (côte méditerranéenne et de hautes montagnes du Rif), le Loukkos (nord-ouest de la plaine Atlantique), le centre (Rabat, Casablanca et leurs régions), les montagnes du Moyen Atlas et le Sud (zones arides et semi-désertique).

Les taux de prévalence obtenus étaient 10,58% chez les ovins, 1,88% chez les chèvres, 22,98% chez les bovins, 12,03% chez les dromadaires et 17,80% chez équidés, toutes catégories d'âge confondues. Les taux d'infection étaient particulièrement élevés au Moyen- Atlas chez les bovins (48,72%) et dans le Nord-Ouest chez les bovins et mouton (37,61% et 31,65%, respectivement).

Ces taux de prévalence étaient plus élevés chez les animaux plus âgés ; ils ont atteint respectivement 86,84%, 68,15% et 52,63% des bovins âgés de plus de 5 ans, des moutons et des chèvres plus de 3 ans.

L'étude menée par El Berbri dans la région de Sidi Kacem a révélé une prévalence de 42,9 % chez les bovins, 11 % chez les ovins et 1,5 % chez les caprins (El Berbri et al., 2015b).

Une étude réalisée au Moyen Atlas en 2017 (Amarir, Communication orale 2017), montre que la prévalence d'infection chez des animaux (tout âge) était de 29,82% chez les bovins (N=102), 13,29% chez les ovins (N=107) et de 2,36% chez les caprins (N=16). En outre, la prévalence d'infection chez les brebis adultes (âge > 4 ans) était de 91,7%.

1.4.4 Échinococcose canine

L'importance de l'hydatidose dans une région est étroitement liée à celle de la population canine, c'est ainsi que dans les régions rurales l'incidence de l'hydatidose est proportionnelle à la concentration des œufs dans l'environnement qui est elle-même liée à la densité de la population canine et aux catégories de chiens (Ouhelli et al., 1997).

Au Maroc existent différentes catégories de chiens : (1) Les chiens feraux : il s'agit de chiens sauvages, qui n'ont aucun contact avec les humains (Arenas et al., 2019). (2) Les chiens en liberté ou chiens errants : il s'agit de chiens qui ne sont pas sous le contrôle permanent de l'homme et donc pas attachés (Arenas et al., 2019). Cette catégorie de chiens représente la majorité des chiens qui se déplacent librement dans les zones rurales (78,46%), contrairement aux chiens des zones urbaines (seulement 11,54%) (Bouaddi et al., 2018). Ces chiens peuvent être aussi classés comme chiens vagabonds c'est-à-dire des chiens qui vivent en contact avec la communauté pour se nourrir mais sans propriétaire déterminé. A cette catégorie appartiennent des chiens qui naissent dans cette population ainsi que les chiots nés chez des propriétaires mais qui ont été abandonnés. (3) Ensuite, on a les chiens à propriétaire dont la liberté est contrôlée ou limitée par leur propriétaire et qui sont nourris (Bouaddi et al., 2018; Arenas et al., 2019).

La majorité des chiens dans les zones rurales (78,46 %) ne sont pas correctement nourris par leurs propriétaires ou ne reçoivent que des restes de nourriture humaine, ne permettant pas de couvrir leurs besoins quotidiens (Bouaddi et al., 2018). Certains sont autorisés à errer librement à la recherche de nourriture et d'un abri, et sont donc alors classé comme chien à propriétaires errants (Bouaddi et al., 2018). Ces chiens fréquentent généralement les souks, les

décharges publiques mais surtout les abattoirs qui représentent une source importante de nourriture (abattoirs dépourvus de clôture, organes saisis et déchets généralement non détruits mais jetés à l'extérieur) (Ouhelli et al., 1997). Par conséquent, en milieu rural les abattoirs jouent un rôle important dans la contamination des chiens (Dakkak et al., 2017).

Au Maroc, les taux d'infection par *Echinococcus granulosus* chez le chien sont très élevés dans les régions rurales avec une prévalences élevée de 62,7%, 95% IC 48,1-75,9% (Dakkak et al., 2017).

La pression d'infection et l'intensité d'*E. granulosus* chez les chiens étaient étudiées dans plusieurs régions du Maroc. Les résultats rapportés par Dakkak en 1992, ont montré une prévalence élevée de 22 à 58,8% et une intensité de 1 à 18 940 vers par chien infecté (DAKKAK, 1992).

Des études menées au Département de Parasitologie de l'IAV Hassan II de Rabat entre 1979 et 1983 ont rapporté que près de la moitié des chiens sont infectés par *E. granulosus*. Les chiens errants sont les plus infectés vu qu'ils ont plus d'opportunités pour accéder aux kystes hydatiques (Ouhelli et al., 1997).

Une autre étude réalisée chez 151 chiens errants dans deux régions du Maroc : 68 chiens dans le nord-ouest (Loukkous) et 83 chiens dans le sud-ouest (Tiznit) (Azlaf and Dakkak, 2006), a montré que la prévalence de l'échinococcose chez les chiens était de 58,82 % au nord-ouest et de 55,42 % au sud-ouest. D'après ces études, il s'avère que la prévalence de l'échinococcose canine chez le chien errant est alarmante dans plusieurs régions du pays.

Une autre étude a été menée par, Azlaf en 2007 dans le cadre d'une modélisation de transmission de l'*E. granulosus* chez les chiens en nord-ouest et sud-ouest du Maroc, cette étude a montré que le temps moyen d'exposition à l'infection variait à partir de 8 mois à 2 ans environ et que l'abondance (i.e. le nombre moyen d'*E. granulosus* par chien) était de 476 (Azlaf et al., 2007).

Une autre étude a été menée par, El Berbri entre 2009 et 2013 sur un total de 224 chiens a révélé une prévalence d'infection de 35,5% des chiens (El Berbri et al., 2015a).

1.5 Impact et importance de l'hydatidose

1.5.1 Impact économique et importance de l'hydatidose chez l'Homme et chez le cheptel au Maroc

Chez l'Homme le kyste hydatique est la cause d'une importante morbidité et mortalité à travers le monde et il est responsable d'une perte économique significative dans le secteur de santé publique (Craig and Larrieu, 2006; Saadi et al., 2020). Le kyste hydatique a plusieurs conséquences, incluant les frais directs de diagnostic, hospitalisation, traitement chirurgical, soins post chirurgicaux, pour le patient et les membres de la famille, sans oublier les pertes indirectes de mortalité, souffrance et conséquence sociale de perte de jours de travail et l'arrêt des activités agricoles par les personnes infectées ou à risques (Craig and Larrieu, 2006; Battelli, 2009; Saadi et al., 2020). Les personnes qui souffrent de kyste hydatique ne retrouvent jamais un état de santé parfait même après la guérison (Torgerson and Heath, 2003a).

En 2015, 1627 personnes souffrant d'hydatidose ont subi une intervention chirurgicale (5,2 cas pour 100 000 habitants) dans l'ensemble du pays (Chebli et al., 2017). Les chirurgies doivent être répétées dans 3 % des cas, et une mortalité de 3 % a été signalée (Ministère de la Santé du Maroc, 2015). Les coûts de traitement ont été estimés à environ 1 700 et 3 200 dollars US pour les cas simples et répétés, respectivement, et représentent une charge financière importante pour le secteur de la santé (Elyagoubi et al., 1997). Les coûts indirects dus aux récidives et aux réexamens, à la réduction de la qualité de vie après l'opération, à la morbidité due à l'hydatidose non diagnostiquée et à la perte de revenus dans les cas mortels n'ont pas été pris en compte dans ces calculs de la charge et augmenteraient encore cette estimation (Ministère de la Santé du Maroc, 2012). Selon Saadi, les pertes annuelles totales (pertes dues aux saisies des organes infectés aux abattoirs et les pertes dues à l'infection humaine se composent également d'invalidité et de pertes de productivité au travail des individus) ont été estimées à 73 millions USD (54-92 millions USD) (Saadi et al. 2020). Chez le cheptel, ce sont les pertes de production qui sont en jeu, et leur importance est variable en fonction de la race et du type de production concernés (Battelli, 2004) :

- Organes non utilisables et saisis à l'abattoir, surtout le foie et le poumon.
- Coût de la destruction des viscères infectés et des animaux morts ;
- Interdiction éventuelle d'exportation des animaux et de leurs produits ;
- Cachexie hydatique associée au poly-parasitisme chez les animaux, qui est un motif de réforme des ovins adultes dont la vie productive est raccourcie ;

- Mortalité brutale à la suite de la rupture d'un kyste hydatique.

En élevage ovin, on estime à 7-10% les pertes en lait, 5-20% les pertes en viande ou poids total de la carcasse et 10-40% les pertes en laine (Battelli, 2004). En 1980, une évaluation réalisée en Italie (Mantovani, 1980) mettait en évidence une réduction de 10% de la valeur commerciale d'un mouton infecté, ce pourcentage prenant en compte le coût de la destruction des viscères. Il faut noter que l'impact économique des viscères infectés dépend de la réglementation du pays et du nombre d'animaux abattus sous contrôle vétérinaire, ainsi que du coût du matériel utilisé (Battelli, 2004).

CHAPITRE II : EPIDEMIOLOGIE DE L'HYDATIDOSE

L'hydatidose présente un caractère épidémiologique différent d'une région à l'autre. Elle peut être sous forme d'une endémie massive comme c'est le cas dans les pays du Maghreb et dans certains pays d'Amérique latine ou sous forme sporadique comme dans les pays où un programme de prévention efficace a été mis en place (Australie).

2.1 Aspects épidémiologiques de l'hydatidose

Il s'agit d'une zoonose à prédominance rurale mais qui peut aussi se développer en milieu urbain. Dans ce cas le cycle s'effectue à sens unique dans le sens bétail-chien sans s'achever dans le sens chien-bétail (Klotz et al., 2000).

Ainsi, il est possible de distinguer des cycles épidémiologiques ruraux, sylvestres et urbains : Le cycle rural se déroule entre les chiens et les animaux domestiques (bovins, ovins, camelin, et équidés) (Euzéby, 1971). Les chiens errants et les chiens à propriétaires en milieu rural jouent le rôle principal dans ce cycle. Au Maroc, le cycle le plus rencontré est de type ovin-chien (Dakkak et al., 2017).

Le cycle sylvestre fait intervenir des carnivores sauvages du genre *Canis* et des herbivores sauvages ou domestiques (Euzéby, 1971; Thompson, 1971). Il peut exister entre les carnivores sauvages et les ruminants domestiques hébergeant *E. granulosus* (Euzéby, 1971).

Dans le cycle urbain, les chiens du milieu urbain se contaminent par ingestion des viscères parasités saisis au niveau des abattoirs et contaminent essentiellement l'Homme.

La principale source directe de contamination du milieu extérieur est représentée par le chien qui libère avec ses fèces les proglottis pouvant contenir jusqu'à 800 œufs contaminant ainsi les aires de pâturage des herbivores. En plus, les œufs sont doués d'un fort pouvoir résistant dans le milieu extérieur. En effet dans les conditions naturelles leur résistance minimale à la surface du sol est de 18 mois à 2 ans à des températures, variant entre -25°C à 25°C (Vuitton et al., 1985). Certains carnivores sauvages comme le loup, le chacal, l'hyène et le renard constituent aussi une source de contamination du milieu extérieur (Andersen, Ouhelli and Kachani, 1997).

Les sources de contamination indirecte sont représentées par les hôtes intermédiaires qui sont constitués par les herbivores domestiques (bovins, ovins, caprins, dromadaires, équidés…). Dans cette région selon une croyance les populations laissent les corps des personnes mortes en pleine savane afin que leurs âmes puissent être transportées par les dieux exposant ainsi les corps aux canidés sauvages qui peuvent se contaminer (Develoux, 1996).

Quant au mode de contamination, il convient de distinguer l'Homme, l'hôte intermédiaire et l'hôte définitif.

2.1.1 Contamination de l'Homme

La contamination de l'Homme se déroule exclusivement par voie digestive suite à l'ingestion des œufs et elle se déroule selon deux modalités (Kachani et al., 1997) :

- ***Contamination directe :*** dans ce cas les matières fécales de l'animal souillent sa bouche, son poil et l'Homme se contamine en portant ses mains au niveau de la bouche après avoir caressé le chien ;
- ***Contamination indirecte :*** elle se fait suite à l'ingestion d'aliment (légumes crus, fruits ramassés par terre souillés par les œufs), mais aussi suite à l'ingestion d'eau contaminée par les matières fécales du chien.

2.1.2 Contamination de l'hôte intermédiaire

L'hôte intermédiaire se contamine en ingérant une alimentation souillée par les œufs (Azlaf and Dakkak, 2006):

- Herbe contaminée dans les pâturages ;
- Eau des bords de ruisseau et d'abreuvoirs pour animaux ;
- Fourrage vert incomplètement séché ;
- Matières fécales du chien (coprophagie par des porcins).

2.1.3 Contamination de l'hôte définitif

L'hôte définitif se contamine en ingérant les viscères infectés de l'hôte intermédiaire. Ceci est favorisé essentiellement par l'absence d'infrastructure de destruction des déchets d'abats contaminés et par l'absence de clôtures au niveau des abattoirs et décharges publics ou sont jetés les saisies d'organes infectés (Kachani et al., 1997).

2.2 Aspects zoonotiques de l'Hydatidose chez le chien et le mouton

2.2.1 Chez le chien

La dynamique de transmission et la stabilité épidémiologique dépendent du chien en tant qu'hôte définitif qui assure la dispersion dans l'environnement et le rythme de cette dispersion. D'ailleurs, en Tunisie, Lahmar et al. ont trouvé 21% de chiens infectés et une moyenne de 2534 parasites par chien infecté (Lahmar et al., 2001). Selon Gemmell, 8470 œufs sont pondus par jour chez un chien infecté en moyenne (Gemmell et al., 2001). Ainsi, la forte prévalence de l'échinococcose chez les chiens des zones rurales ou périurbaines et la forte proportion de chiens errants et de chiens en liberté entraînent une très forte pollution de l'environnement par les œufs (Dakkak, 2003). En outre, les œufs sont très résistants dans le milieu extérieur et peuvent être dispersés dans l'environnement, sur une zone bien plus importante que ce que l'on imagine. Ils sont transportés passivement par les mammifères, les oiseaux, les arthropodes, les lombrics, les mollusques, le vent, la pluie ou les cours d'eau. Ainsi, théoriquement, un seul chien parasité et maintenu à l'attache pourrait contaminer une surface de 30 000 ha (Lawson and Gemmell, 1983; Gemmell, 1985).

2.2.2 Chez le mouton

E. granulosus subit au cours de son développement, une régulation principalement densité-dépendante par la réponse immunitaire de l'hôte. Dans un système stable où les pâtures sont en permanence contaminées, seul le surplus de parasites est éliminé et la mort de l'hôte par hyper parasitémie est rare. Le parasite est en équilibre avec son hôte. Au contraire, dans le cas où les pâtures ne seraient contaminées qu'occasionnellement, les mécanismes de rétrocontrôle négatif ne sont pas mis en place, et la régulation dépend de facteurs extrinsèques, comme le climat. Le système est alors instable et les super-infections peuvent avoir lieu entraînant parfois la mort de l'hôte (Gemmell, 1985).

CHAPITRE III : RELATION HOTE-PARASITE

3.1 Chronologie de l'infection parasitaire

Chez le chien, les protoscolex, migrent vers l'intestin grêle où ils se fixent, environ 6 heures après leur ingestion. Ils commencent leur développement pour atteindre enfin le stade adulte au bout de 40 jours. La période prépatente qui commence avec l'introduction du parasite dans l'organisme de l'hôte et qui se termine par la production du premier segment ovigère dure alors en général entre 4 et 6 semaines (Dumon et Quilici, 1978; Anderson et al., 1992; Thompson, 2017).

Chez le mouton, les oncosphères qui seront ingérées parcourent le tube digestif et libèrent les larves hexacanthes une fois qu'elles arrivent à l'intestin grêle. Après leur arrivée, elles atteignent le foie 3 à 8 heures après leur ingestion. Il faut compter au moins 16 mois pour que les kystes hydatiques atteignent la fertilité chez les ovins, et généralement 35 mois chez les autres espèces. Cette variabilité de la durée de développement est due à l'adaptation du parasite à certaines espèces plus que d'autres (Sweatman et Williams, 1963; Dumon et Quilici, 1978; Eckert et al., 2002; Thompson, 2017).

3.2 Réceptivité des hôtes

La réceptivité des animaux ainsi que de l'Homme pour l'hydatidose a été le centre de nombreuses études dans le but de repérer les individus à risque.

3.2.1 Réceptivité de l'Homme

3.2.1.1. Impact de l'âge

L'hydatidose est reconnue comme une maladie de l'adulte jeune, car c'est à l'âge de 40 ans que la maladie est généralement diagnostiquée tard chez l'Homme (Klotz et al., 2000; Khayat, 2006; Faouzi et Rhimi, 2014).

La prévalence élevée de la maladie chez les patients âgés peut aussi être expliquée par l'immunosénescence naturelle. D'après une étude récente, il est supposé que le vieillissement influence la réponse des anticorps antiparasitaires. La majorité des patients âgés ont montré des réponses moins intenses, en produisant des taux d'anticorps antiparasitaires (IgE, IgG, IgA et IgM) inefficaces. Ainsi, ces faibles taux pourraient expliquer la facilité d'établissement et du maintien de l'infection parasitaire chez ces sujets (Ettlin et al., 2018).

3.2.1.2. Sexe

Une prédominance féminine estimée à 70 % a été enregistrée dans la majorité des études. Cette prédominance se justifie par le rôle de la femme dans la gestion et les contacts avec les chiens ainsi que dans la manipulation quotidienne des légumes et fruits qui pourraient être contaminés ce qui augmente les chances d'exposition de la femme à l'infection kystique. Des facteurs hormonaux et immunologiques pourraient aussi intervenir dans cette prédominance (Klotz et al., 2000; Khayat, 2006; Faouzi and Rhimi, 2014).

3.2.1.3. Mode de vie

La population rurale vivant à proximité des chiens semble être plus touchée par l'hydatidose que la population urbaine. L'hydatidose touche surtout les bergers et les gens de meute. Dans le contexte marocain, 69,5 % des cas d'échinococcose kystique ont été enregistrés chez la population du milieu rural (Klotz et al., 2000; Khayat, 2006; Faouzi and Rhimi, 2014).

3.2.1.4. Souche

L'Homme réagit différemment aux différentes souches *d'Echinococcus granulosus.* Sa réceptivité au parasite est très variable. En effet, il semble que l'Homme présente une sensibilité spécifique à cinq souches ; la souche ovine (G1), la souche du mouton de Tasmanie (G2), la souche du buffle (G3), la souche cameline (G6) et la souche porcine (G7). Néanmoins, il semblerait que l'Homme soit résistant à la souche équine (G4) (Khayat, 2006; Faouzi and Rhimi, 2014).

D'après les données publiées par Boufana, 88,44 % de l'hydatidose humaine dans le monde est causée par *Echinococcus granulosus sensu stricto,* seuls trois autres sous espèces contribuent à un nombre significatif de cas d'échinococcose kystique chez l'homme, ce sont les génotypes G2, G6 et G7 (Boufana et al., 2015). Dans certaines régions où ces génotypes sont prédominants chez les animaux, ils peuvent être responsables de la majorité des cas d'hydatidose humaines. Toutes les preuves d'une pathogénicité accrue *d'Echinococcus granulosus sensu stricto.,* par rapport aux autres souches de l'échinococcose kystique, sont basées sur des observations épidémiologiques. Tant en Europe qu'en Afrique du Nord, une forte endémicité de l'hydatidose humaine est signalée dans les zones où la transmission *d'Echinococcus granulosus sensu stricto*. est bien fréquente (Europe du Sud, Maghreb), tandis que dans les régions voisines où d'autres souches *d'Echinococcus granulosus* sont fréquemment trouvés chez les animaux, les cas humains sont rares ou sont focalisés (Boufana et al., 2015).

3.2.2 Réceptivité du mouton

3.2.2.1 Âge

Des prévalences élevées d'hydatidose ont été remarquées chez les animaux les plus âgés. En effet, une étude a montré que les ovins et les caprins âgés de plus de trois ans (généralement les femelles sont les plus abattues à cet âge que les mâles) ont un risque d'infection de 1,6 de plus que les groupes moins âgés. Cette constatation peut être expliquée par la corrélation positive qui existe entre le taux d'infection et l'âge de l'animal et qui est due à la lenteur du développement des kystes et de leur persistance (Khayat, 2006; Otero-Abad and Torgerson, 2013; Faouzi and Rhimi, 2014).

3.2.2.2 Sexe

Des recherches ont relevé que les femelles étaient beaucoup plus susceptibles d'être infectées que les mâles chez les bovins et les ovins. Cependant, une étude qui a eu lieu en Ethiopie a rapporté un taux d'infection plus élevé chez les mâles des petits ruminants. Le fait que les femelles soient généralement abattues à un âge plus avancé que les mâles, ce qui résulte en une durée plus longue d'exposition au parasite, pourrait expliquer la prévalence élevée chez ce sexe (Khayat, 2006; Otero-Abad and Torgerson, 2013; Faouzi and Rhimi, 2014).

3.2.2.3 Souche

La réceptivité des espèces à l'infection par *Echinococcus granulosus* est très variable et elle est essentiellement liée à la souche du parasite. Les souches de ce parasite varient dans de nombreuses caractéristiques notamment la morphologie, la biochimie, la physiologie, la pathogénicité et l'infectiosité des hôtes. Elles sont le résultat du système de reproduction unique d'*Echinococcus* qui génère une grande diversité biologique probablement sous l'influence de l'environnement et des facteurs de l'hôte qui influencent d'une manière significative le phénotype du parasite (Hobbs et al., 1990). La reproduction biphasique (sexuelle chez l'HD et végétative chez l'HI) du parasite accélère l'uniformité génétique des populations, d'où la tendance d'un mutant à devenir une population clonale affecterait la spéciation des souches d'*Echinococcus*. Par conséquent, le changement d'hôte aux stades adulte et larvaire pourrait avoir eu lieu en tant que sélection adaptative des variantes réussies (Guarnera et al., 2004).

Souche (G1) : D'après les études épidémiologiques, le génotype (G1) d'*Echinococcus granulosus sensu stricto.* est globalement l'espèce dominante du parasite. D'après Nakao, Cette espèce s'est peut-être généralisée autour du monde à la suite des mouvements anthropiques des

chiens et des moutons, d'abord coïncidant avec la propagation du pastoralisme en Eurasie, puis avec l'expansion et la colonisation européennes. Cette souche peut infecter l'ensemble des animaux domestiques (Nakao et al., 2013).

Souche (G2) et souche (G7) : La souche du mouton de Tasmanie (G2) ainsi que la souche porcine (G7) semblent être endémiques dans les régions où ils se trouvent même s'il y a présence de la souche G1. Ceci est dû à la courte période de maturation nécessaire qui permet aux vers adultes de ces deux souches de libérer des œufs infectants avant les vers adultes de la souche G1 commune du mouton (Rosenzvit et al., 1999).

Souche (G4) : L'échinococcose kystique équine avec les hydatides pleinement développées dans le foie a été rapportée presque dans le monde entier et les caractéristiques du parasite dérivé du cheval ont été examinées d'une manière intensive sous divers aspects biologiques. Tout d'abord, il a été démontré que le parasite d'origine équine britannique différait nettement dans sa morphologie par rapport à *Echinococcus granulosus* d'origine ovine. À ce jour, la souche du cheval (G4) n'a pas été signalée chez les moutons ou les humains, et la souche du mouton (G1) n'a jamais été identifiée chez les chevaux. Le fait que les caractéristiques génétiques des différentes formes d'*Echinococcus granulosus* (forme équine et forme ovine) soient maintenues en sympatrie dans les zones endémiques où les cycles de vie se chevauchent, renforce l'argument selon lequel les deux formes sont deux espèces distinctes. Les études épidémiologiques suggèrent fortement qu'*Echinococcus equinus* utilise exclusivement les chevaux et n'est pas zoonotique (Nakao et al., 2013).

Souche (G5) (E. ortleppi) : La forme (G5) d'*Echinococcus granulosus* qui est adaptée aux bovins en tant qu'hôte intermédiaire justifie également une reconnaissance taxonomique. Cette forme est caractérisée par la nature du développement de métacestodes pulmonaires avec la production de kystes principalement fertiles, sa morphologie strobilaire inhabituelle et la vitesse de développement rapide du ver adulte (McManus & Thompson, 2003).

3.2.2.4 Dans le contexte marocain

Au niveau national, les bovins ont enregistré un risque plus élevé d'infection en comparaison aux ovins. Ces derniers sont plus touchés que les caprins, les dromadaires et les chevaux (Khayat, 2006; Otero-Abad and Torgerson, 2013; Faouzi and Rhimi, 2014).

En revanche, les kystes du mouton sont généralement entièrement fertiles, les vésicules filles endogènes bourgeonnant de manière asexuée à partir de la couche germinale et les

protoscolex se développent à partir de la paroi interne de ces vésicules. Il a été suggéré que cette différence pourrait être due à la variation de la souche du parasite, mais la même situation s'applique aux bovins et aux ovins de la même zone d'infection endémique. Cela implique que les bovins peuvent avoir une immunité naturelle qui inhibe le développement et la croissance des protoscolex ce qui donne des kystes infertiles (Zhang and McManus, 2003).

3.2.2.5 Facteurs externes

Une pluviométrie annuelle élevée, une haute altitude et un système d'élevage mixte et intensive contre un système pastoral pour les petits ruminants, sont tous des facteurs d'environnement et de management d'élevage qui favorisent l'infection échinocoque chez les hôtes intermédiaires (Otero-Abad and Torgerson, 2013).

3.2.3 Réceptivité du chien

Plusieurs études ont rapporté un risque d'infection plus élevé par *Echinococcus granulosus* chez les jeunes chiens que chez les adultes. Une prévalence canine plus élevée a été fréquemment enregistrée chez les jeunes animaux moins de 2 ans. De même, les chiens de plus de 5 ans ont montré une positivité du coproantigène plus faible et une charge parasitaire encore plus faible que les groupes les moins âgés. Ceci est dû à l'immunité protectrice contre le parasite que le chien acquiert pendant sa vie (Otero-Abad and Torgerson, 2013).

3.2.3.1 Sexe

Bien que nombreuses études aient enregistrées des prévalences plus élevées chez les mâles que les femelles, il n'y a qu'une seule étude qui a révélé que cette différence a été d'un ordre significatif (Otero-Abad and Torgerson, 2013). Selon Otero-Abad une raison plausible pourrait expliquer cette différence entre les mâles et femelles, c'est que les chiens mâles ont tendance à se séparer de la meute et à explorer des zones plus vastes que les femelles, en raison de leur tendance à adopter un comportement territorial et à aller à la chasse (Otero-Abad and Torgerson, 2013).

3.2.3.2 Milieu de vie

Les chiens ayant plus de possibilité d'entrer en contact avec les cadavres et les viscères du bétail étaient plus susceptibles d'être infectés. Les chiens d'une communauté pastorale semi-nomade en Chine ont présenté une positivité coproantigène 2,5 fois plus élevée pendant l'hiver que pendant l'été, probablement à cause de la grande disponibilité d'abats lors de l'abattage des

animaux à cette période. Les chiens de ferme et les chiens bergers affichent des taux d'infection plus élevés que les autres types de chiens. De même, les chiens vivant dans les communautés rurales ou ayant accès aux champs présentaient un risque d'infection plus élevé que les chiens urbains. La capacité des chiens à se déplacer librement était l'un des facteurs de risque d'infection les plus fréquemment signalés. Les chiens errants ont montré une plus grande intensité d'infection que les chiens domestiques (Otero-Abad and Torgerson, 2013).

3.2.3.3 Autres facteurs

L'absence du traitement anthelminthique combiné au manque de connaissances du propriétaire du chien sur la transmission du parasite sont également des facteurs qui influencent la prévalence de l'hydatidose chez l'hôte définitif (Otero-Abad and Torgerson, 2013).

3.3 Aspects immunitaires chez les moutons et chiens infectés

3.3.1 Réponse immunitaire des chiens infectés contre les vers adultes du parasite *E. granulosus*

L'étude de la réponse immunitaire chez le chien à l'échinococcose n'a pas été bien développée. Cela peut être est dû au fait que les vers adultes, étant des parasites de la lumière intestinale, étaient considérés comme peu susceptibles d'évoquer des réponses immunitaires systémiques et également en raison du manque de connaissances des réponses immunitaires protectrices de l'hôte à la ré-infection par les cestodes (Deplazes et al., 1994; Zhang and McManus, 2003).

Antigènes du vers adulte

L'identification des produits d'excrétion-sécrétion libérés par le ver adulte et qui constituent les protéines antigéniques principales de ce dernier, pourrait fournir des informations précieuses sur les interactions hôte-parasite et améliorer le répertoire des protéines candidates utilisées dans les kits du diagnostic immunologique, la vaccination et la thérapie.

Une étude récente menée par Wang, 12 molécules antigéniques ont été identifiées, dont trois antigènes pour la première fois (Severin[a], Protéine hypothétique EGR_06319 et Triosephosphate isomérase) (Wang et al., 2015). Les antigènes identifiés sont nommés dans le Tableau 4.

Tableau 4. Molécule antigèniqus du ver adulte d'*Echinococcus granulosus* dont trois nouveaux antigènes identifiés (Severina, Protéine hypothétique EGR_06319 et Triosephosphate isomérase) (Wang et al., 2015)

Antigène	Nom
Paramyosine	*EG36*
Calréticuline	*CALRm*
Protéine de choc thermique 60	*HSP60*
Protéine de choc thermique 70	*HSP70*
Severine	*AG8*
Enolase	*EGR09630*
Actine	*EgAFFP*
Protéine hypothétique EGR_06319	*EGR06319*
Malate déshydrogénase cytoplasmique	*MDH*
Triosephosphate isomérase	*EGR08633*
Superoxyde dismutase	*EGR10137*
Cyclophiline	*EA21*

L'analyse protéomique des produits d'excrétion-sécrétion de l'*Echinococcus granulosus* adulte, a montré que l'énolase était le produit le plus abondant. Cet antigène a été décrit comme une protéine de surface multifonctionnelle qui présente des propriétés d'interaction avec l'hôte et qui est impliquée dans l'invasion parasitaire. L'énolase est susceptible de jouer aussi un rôle important dans les mécanismes d'évasion du système immunitaire de l'hôte. Le deuxième produit antigénique le plus abondant était la cyclophiline, qui jouait également un rôle dans le développement du parasite et dans les interactions hôte-parasite (Wang et al., 2015).

Certaines de ces protéines antigéniques ont un potentiel dans le développement des vaccins ; notamment la paramyosine qui a montré une certaine protection en immunoprévention contre la schistosomiase, et le vaccin EG 95 synthétisé à partir d'une protéine oncosphérique (œuf du ver adulte d'*E. granulosus*) et qui a montré une protection contre l'hydatidose supérieure à 95% voire 98%. Les paramyosines, qui sont des modulateurs multifonctionnels de la réponse immunitaire de l'hôte, jouent un rôle dans la liaison des composants du complément, des immunoglobulines et des composants sécrétés lors de la réponse immunitaire cellulaire (Wang et al., 2015).

L'énolase, la malate déshydrogénase et la cyclophiline, sont des protéines exclusives du ver adulte et n'ont jamais été identifiées dans le liquide hydatique ou dans l'oncosphère (Wang et al., 2015).

3.3.2 Réponse immunitaire locale

L'immunité muqueuse contre les parasitoses intestinales est désormais reconnue comme un phénomène important, elle permet d'inhiber le développement, la destruction et l'expulsion des parasites. Cette immunité est basée sur l'action des IgA et IgE libérées par les plaques de Peyer qui se lient directement aux antigènes d'*Echinococcus granulosus* et qui attirent également les cellules immunitaires effectrices. Ces cellules sont représentées par les éosinophiles et les mastocytes de la muqueuse ; elles se lient aux régions constantes des immunoglobulines via les récepteurs Fc. Après leur activation lorsqu'elles sont liées au parasite opsonisé, elles déchargent leurs granulations. Cette méthode de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps est bien établie en tant que mécanisme important par lequel l'hôte peut endommager un parasite multicellulaire (Deplazes et al., 1994; Zhang and McManus, 2003).

La prolifération spécifique des cellules de la plaque de Peyer et la production des IgA et des IgG spécifiques contre le ver adulte *Echinococcus granulosus*, mettent en évidence le rôle très important que jouent les plaques de Peyer dans la réponse immunitaire contre le cestode (Zhang, Li and McManus, 2003).

3.3.3 Réponse immunitaire systémique

La présence du ver adulte ne passe pas inaperçue par l'immunité de l'hôte et une réponse humorale spécifique avec la production des anticorps circulants se produit (figure 6). Le scolex qui est en contact intime avec la circulation systémique et qui échappe à la réponse immunitaire muqueuse en supprimant l'activité cytotoxique, excrète par sa glande rostrale des antigènes qui provoquent la réaction immunitaire humorale (Deplazes et al., 1994; Thompson, 2017; Zhang et al., 2003).

Les cellules dendritiques situées dans la muqueuse intestinale arrivent à détecter les antigènes d'échinocoques et à les présenter afin de stimuler et activer les cellules des lymphocytes T et B pour enfin induire une réaction systémique (figure 6).

La Figure 6 illustre les mécanismes de la réponse immunitaire de l'hôte contre l'infection par le ver adulte d'*Echinococcus granulosus.*

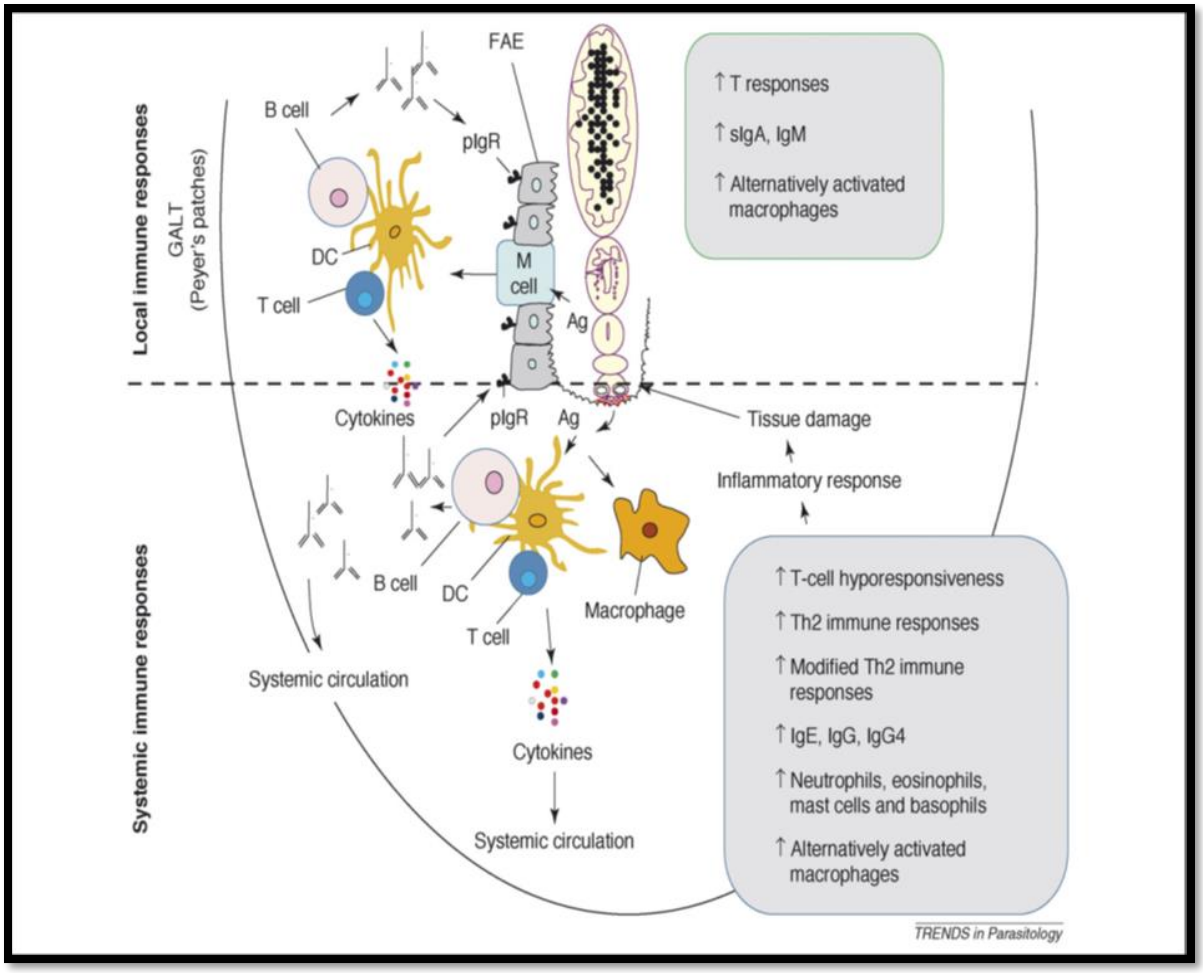


Figure 6. Mécanismes de la réponse immunitaire locale et systémique de l'hôte définitif à l'infection par *Echinococcus granulosus* (Zhang & McManus, 2008)

3.3.4 Réponse immunitaire chez les ovins infectés par le stade larvaire du parasite *E. granulosus* ou kyste hydatique

Les réponses immunitaires chez les ovins (hôte intermédiaire) contre *Echinococcus granulosus* ont été relativement bien étudiées. Grace aux études immunologiques in vitro et in vivo ainsi que les technologies de biologie moléculaire et d'immuno-protéomique nous ont fourni des informations intéressantes sur les mécanismes impliqués dans l'initiation de l'infection à *Echinococcus granulosus* et l'induction et la régulation de la réponse immunitaire qui en résulte chez cet hôte.

Antigènes de l'oncosphère et du kyste hydatique

Depuis les années 1960, la recherche sur l'échinococcose kystique s'est concentrée sur l'identification de protéines immunologiquement importantes, en particulier les candidates potentielles à un diagnostic immunologique ou à un vaccin. En raison de l'expression de

différents antigènes au cours des différents stades de développement, l'hôte intermédiaire répond indépendamment aux stimuli antigéniques de l'oncosphère envahissante, du métacestode en transformation à partir de l'oncosphère et, enfin, du métacestode mature (kyste hydatique) (Siracusano et al., 2012b).

D'après les dernières études, il semble que les oncosphères stimulent une forte immunité contre l'infection hydatique. De fortes réponses en anticorps contre les protéines oncosphériques purifiées ont également été rapportées dans le sérum de moutons infectés expérimentalement (Siracusano et al., 2012b).

La membrane germinale du kyste constitue une barrière contre les cellules immunitaires compétentes de l'hôte. Il est admis que généralement, les dommages dans cette couche, comme les fissures ou la rupture, induisent une stimulation antigénique. Lorsque cette stimulation antigénique se produit, il y a une élévation continue des valeurs immunologiques pendant une durée indéterminée. Cette élévation se produit également après la manipulation du kyste (chirurgie, ponction, etc.) (Siracusano et al., 2012b).

Des études approfondies se sont concentrées sur les antigènes du liquide hydatique qui représentent toujours la principale source antigénique pour le diagnostic de la maladie hydatique. À l'heure actuelle, malgré le grand nombre d'études, les antigènes parasitaires présents dans le liquide hydatique qui ont une valeur immuno-diagnostique majeure dans la détection d'*Echinococcus granulosus* sont l'antigène 5 (Ag5) et l'antigène B (AgB) (Siracusano et al., 2012a).

3.3.5 Réponse immunitaire chez l'hôte intermédiaire

Toutes les études qui se sont intéressées à l'immunité induite par l'hydatidose ou autre helminthose chez l'hôte intermédiaire (moutons) ont montré que l'infection produit une réaction immunitaire cellulaire et une activation des lymphocytes T qui activent à leur tour les B. Ainsi, certains parasites, notamment l'*Echinococcus,* ont développé la capacité d'induire des réponses Th2 qui les protégeront contre une réaction Th1 antiparasitaire potentiellement toxique. *Echinococcus granulosus* induit un équilibre entre les réponses immunitaires Th1 et Th2 de l'hôte (Siracusano et al., 2012b; Zhang et al., 2003).

Chez l'hôte intermédiaire, le parasite produit des quantités importantes de molécules antigéniques qui modulent et qui induisent les réponses immunitaires de l'hôte, et celles-ci comprennent à la fois la réponse humorale et la réponse cellulaire contre ce parasite. Les hôtes

infectés produisent des réponses humorales importantes, y compris des anticorps (IgG, IgA et IgE) et des réponses des cellules T (figure 7). L'infection échinocoque se caractérise par une immunité cellulaire et, à des stades ultérieurs, par une réponse Th2. Il est admis que les réponses humorales et médiées par les cellules T semblent jouer un rôle important lors de l'infection hydatique (Meymarian and Schwabe, 1962; Riesle et al., 2014; Díaz et al., 2016).

Dans les infections chroniques à *Echinococcus granulosus*, des niveaux élevés d'IgG, IgM et IgE sériques ont été détectés (figure 7).

Chez l'homme, la réponse Th2 est exprimée par l'apparition d'une sous-classe IgG4 prédominante qui est associée à des kystes hydatiques progressifs. À l'inverse, l'activation des cellules Th1 est supposée induire une immunité protectrice. Des études conçues pour évaluer la réponse des sous-classes d'IgG dans le sérum humain ont montré que la sous-classe d'anticorps la plus importante dans l'échinococcose kystique est l'IgG1 (qui est en corrélation avec la maladie inactive) et l'IgG4 (qui est en corrélation avec la maladie active) (Lightowlers, 1990; Siracusano et al., 2012b; Riesle et al., 2014; Gottstein et al., 2017).

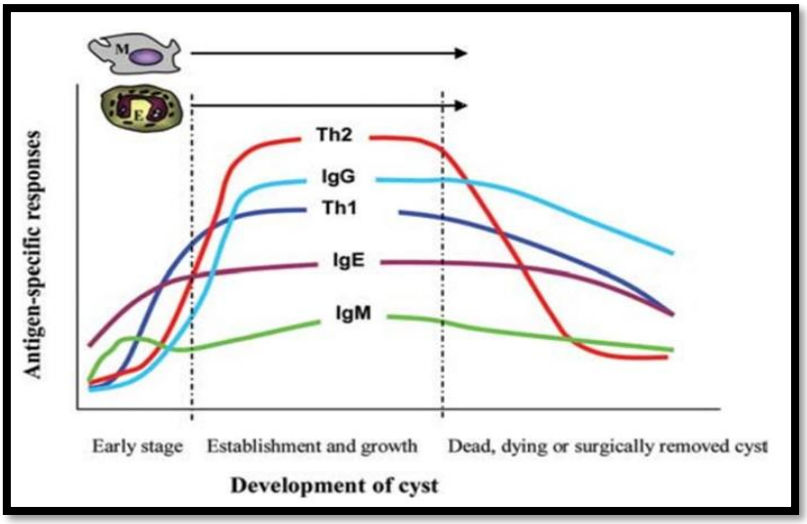


Figure 7. Réponse immunitaire de l'hôte intermédiaire lors du développement d'un kyste hydatique à *Echinococcus granulosus* (Zhang & McManus, 2008)

Par conséquent, il a été proposé que les IgG spécifiques des antigènes parasitaires situés à la couche germinale induisent l'infertilité des kystes. L'IgG1 est la sous-classe d'immunoglobulines la plus pertinente présente dans la couche germinale des kystes infertiles et liée avec une forte affinité à cette structure parasitaire. Au contraire, bien que la sous-classe d'IgG2 ait également été trouvée dans les couches germinales et adventitielles, ces immunoglobulines présentent une faible affinité pour les antigènes parasitaires (Siracusano et al., 2012a; Riesle et al., 2014).

3.4 Nouveaux marqueurs antigéniques

Après tous les efforts fournis pour briser le cycle de vie du parasite, une nouvelle approche a été adoptée pour le développement d'un vaccin par l'identification de nouveaux marqueurs moléculaires, qui peuvent agir comme de puissants antigènes chez l'hôte durant l'infection. Jusqu'à présent peu de marqueurs ont été isolés : Fatty Acid Binding Protein, Actine et Calcium Binding Protein (Esteves, Dallagiovanna and Ricardo, 1993).

Selon Lahmar, la prévalence de l'hydatidose peut diminuer par le développement d'un vaccin oral recombinant chez le chien (Lahmar et al., 2007). Ce vaccin inclut 2 protéines recombinantes EgA31 isolée du ver adulte et oncosphère et EgTrop des protoscolex. Ce vaccin montre au Maroc comme en Tunisie, une réduction de 80% du nombre d'échinocoques et chez les chiens vaccinés, un retard de croissance chez 44% des vers encore présents dans l'intestin des chiens après vaccination.

Une récente étude a montré que des chiens vaccinés avec deux protéines spécifiques du ver adulte *E. granulosus* EgM9 et EgM123, émulsifiées avec les adjuvants de Freund ont induit une efficacité protectrice significative en termes de réduction de la charge de vers et de la production d'œufs après 45 jours après l'infection (Zhang et al., 2018).

3.5 Modulation et contrôle du système immunitaire de l'hôte par *Echinococcus granulosus*

Echinococcus granulosus peut utiliser deux mécanismes pour moduler la réponse immunitaire de l'hôte : l'évasion passive, dans laquelle le parasite, en se transformant en kyste hydatique, pour éviter les effets néfastes d'une réponse immunitaire, et l'immunomodulation par laquelle le parasite interagit activement avec le système immunitaire de l'hôte pour réduire l'impact de la réponse de l'hôte (Gottstein et al., 2017).

Chez la larve, la couche stratifiée représente une première barrière contre l'attaque immunitaire de l'hôte ; en outre, le kyste est lié par une couche adventice fibreuse produite par l'hôte, qui joue un rôle dans la protection contre les attaques immunitaires de l'hôte. La capsule est le produit d'une réponse de type inflammatoire cellulaire à trois couches de l'hôte, initiée aux premiers stades du développement post-oncosphérique par infiltration d'éosinophiles, de fibroblastes et de cellules mésothéliales ; les réactions immunologiques précises impliquées dans la formation de l'adventice, qui semblent cruciales pour limiter le kyste et protéger le

parasite, sont mal connues et nécessitent certainement des évaluations complémentaires (Gottstein et al., 2017).

La plupart des parasites ont développé des stratégies supplémentaires d'évasion immunitaire dont la variation antigénique, le masquage des protéines de surface, le mimétisme moléculaire, l'immunosuppression, l'inclinaison du profil des cytokines Th1 / Th2, la modulation de l'activité du complément, la séquestration, la modulation antigénique et l'inhibition des enzymes de l'hôte lors d'une infection au parasite adulte. Des études récentes ont démontré qu'*Echinococcus granulosus* sécrète plusieurs molécules présentes dans les protoscolex et dans le liquide hydatique qui peuvent moduler directement les réponses immunitaires en altérant ainsi l'équilibre des cytokines vers une réaction Th2 favorisant l'évasion immunitaire et perpétuant la survie des parasites chez l'hôte. Ces molécules interfèrent avec la présentation de l'antigène, la prolifération et l'activation des cellules et la production d'anticorps (Chandra, 1982; Gottstein et al., 2017).

3.5.1 Modulation antigénique

La membrane tégumentaire des métacestodes établis doit être une frontière extrêmement active car elle permet non seulement l'absorption de nutriments et la libération, par sécrétion ou excrétion, de produits ou de déchets, mais elle est aussi l'interface avec les facteurs de défense de l'hôte. Les processus physiologiques normaux de synthèse et de renouvellement de cette membrane et les caractéristiques de ses mécanismes de transport sont si peu connus qu'il est difficile d'évaluer si la modulation de l'antigénicité de surface par internalisation ou exocytose pourrait faire partie d'une stratégie d'évitement. Des similitudes structurelles et fonctionnelles entre les téguments des cestodes et des trématodes ont été signalées ailleurs, et l'émergence de preuves d'une modulation antigénique par les membranes de surface de *Schistosoma mansoni* soulève la possibilité que des larves ténidés puissent entreprendre des manœuvres comparables (Rickard and Williams, 1982).

3.5.2 Séquestration

Après une période de migration précoce et souvent brève dans les tissus, les larves ténidés deviennent sessiles. Le site où ils finissent par s'installer, ainsi que la nature de leur relation avec la réponse encapsulante de l'hôte, peuvent contribuer à une séquestration efficace des parasites de l'attaque immunitaire (figure 8).

Il est apparu que les kystes pulmonaires d'*Echinococcus granulosus* chez les patients humains sont également souvent indétectables sur le plan immunologique, surtout si le parasite est vivant et que les membranes germinales et stratifiées sont lisses et intactes, ce qui donne une apparence dite « hyaline » par radiographie. Les kystes hyalins dans les autres tissus sont fréquemment associés à des réponses minimales d'anticorps de l'hôte et il semble probable que les larves soient efficacement séquestrées par les laminations externes intactes et la capsule de l'hôte de sorte qu'il se produit très peu de stimulation immunologique (figure 8) (Rickard and Williams, 1982).

3.5.3 Inhibition des enzymes de l'hôte

L'inhibition des enzymes de l'hôte est un élément bien connu de la défense des cestodes adultes contre la dégradation par les sécrétions intestinales dans la lumière intestinale. La récente observation selon laquelle les cysticerques de *Tænia pisiformis* maintenus in vitro libèrent un puissant inhibiteur de faible poids moléculaire de la trypsine et de la chymotrypsine soulève la possibilité que des tactiques anti-enzymatiques puissent également être utilisées par le ver adulte d'*Echinococcus granulosus* pour éviter les sécrétions indésirables des cellules inflammatoires de l'hôte (Rickard and Williams, 1982).

La Figure 8 illustre la réaction interactive qui se produit entre l'hôte et le kyste hydatique.

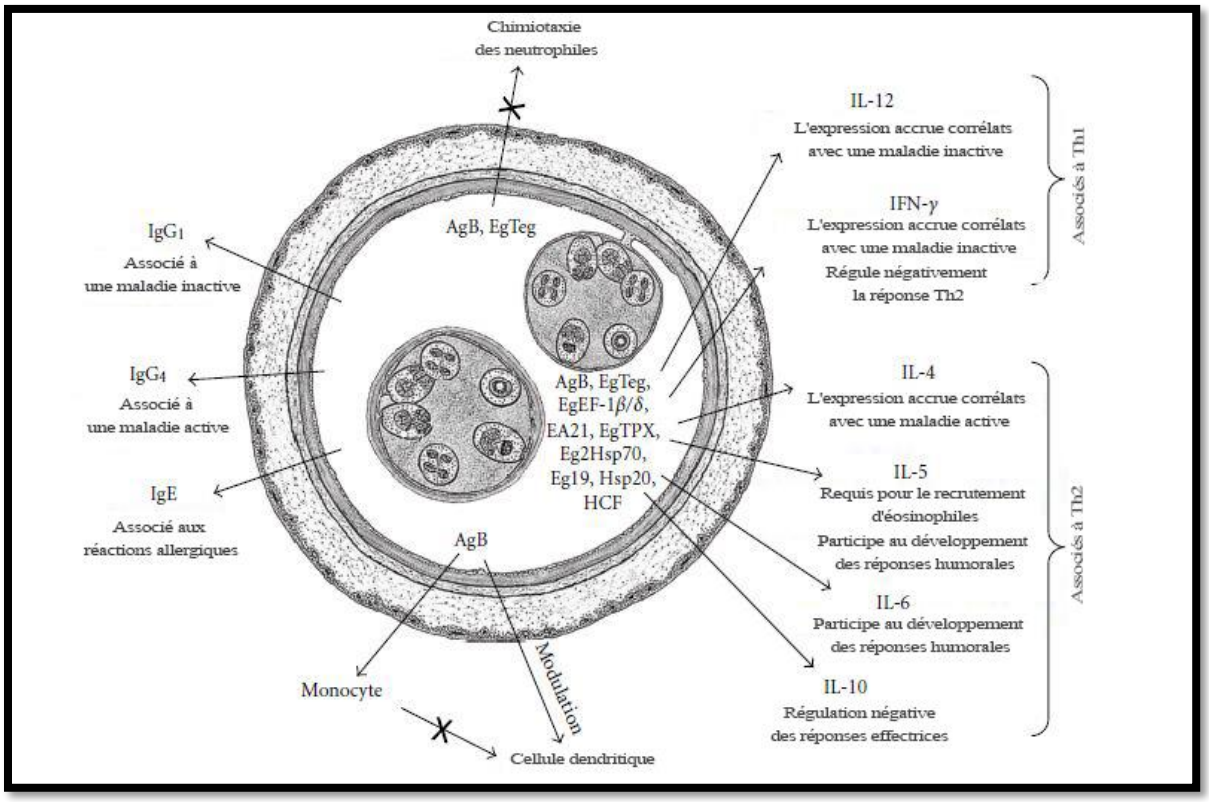


Figure 8. Composants majeurs de la réponse immunitaire au liquide hydatique chez l'hôte intermédiaire: immunomodulateurs dérivés d'*Echinococcus granulosus* et principales cytokines qui régulent cette réponse (Siracusano et al., 2012b)

3.6 Réponse du parasite face à la réaction immunitaire de l'hôte

Il est généralement admis qu'*Echinococcus granulosus* n'est pas affecté par la réponse immunitaire de l'hôte lors du stade de développement. Cependant, les infections naturelles chez les moutons indiquent que certains kystes peuvent être tués au cours des derniers stades de développement, avec la survenue relativement fréquente des métacestodes morts calcifiés ou des kystes nécrotiques. Celles-ci sont dues à la dégénérescence du kyste primaire (mère), laissant la cavité pleine de leucocytes de l'hôte et de kystes filles dérivés des protoscolex. Il n'y a aucune preuve directe que la mort de ces kystes est due à un phénomène immunologique, mais c'est une probable possibilité. Si une progression de la dégénérescence des kystes se produit, la réponse immunitaire peut alors jouer un rôle dans la mort du parasite. Cela peut signifier une stimulation immunologique accrue avec la progression des kystes (Boukoffa et al., 1998; Zhang et al., 2003).

Le système du complément et par les effecteurs médiés par les C5 contribue aux défenses de l'hôte en limitant à la fois l'établissement de l'infection et en contrôlant la croissance des kystes établis ; cette contribution peut être associée à la capacité du C5a à favoriser l'infiltration des éosinophiles. La lyse dans le sérum immun et le sérum normal est dépendante des anticorps et médiée par le complément. Les protoscolex d'*Echinococcus granulosus* sont lysés par le sérum frais de nombreuses espèces différentes de mammifères. La présence des kystes hydatiques semble épuiser le complément de l'hôte (Díaz et al., 1999; Heath & Lawrence, 1996).

CHAPITRE IV : ETUDE DE LA MALADIE : MANIFESTATION CLINIQUE, DEPISTAGE, DIAGNOSTIC ET MOYEN DE CONTROLE DE L'HYDATIDOSE/ECHINOCOCCOSE

4.1 Signes cliniques

4.1.1 Chez l'Homme

La symptomatologie de l'échinococcose kystique chez l'homme n'est jamais pathognomonique. La phase initiale de la maladie est toujours asymptomatique et peut persister pendant plusieurs années, avec 60 % des cas qui resteront asymptomatiques (les cas des petits kystes ou des kystes calcifiés) (Pawlowski, 1997).

Les manifestations cliniques varient en fonction de la localisation, de la taille des kystes, de l'intégrité des membranes et du génotype du parasite. Ce dernier facteur semble fortement influencer la pathogénicité du kyste hydatique. Par exemple, les kystes dus à la souche des cervidés (G8) sont généralement localisés au niveau des poumons, se développent très lentement et ne causent que rarement des complications (Higuita, Brunetti and McCloskey, 2016).

Les signes cliniques sont secondaires soit à l'existence d'un syndrome de masse dans l'organe atteint, à l'obstruction du flux sanguin ou lymphatique (Klotz et al., 2000).

Lors de l'hydatidose hépatique, on note : des douleurs au niveau de l'hypochondre droit, une cholestase, une hypertension portale et une péritonite si une rupture intrapéritonéale a eu lieu. Dans le cas de la localisation pulmonaire, une toux chronique associée à une hémoptysie, une dyspnée, une pleurésie et des douleurs thoraciques peuvent être perceptibles. Des crises d'épilepsie, une hypertension intracrânienne, l'hémiparésie, l'hémianopsie et les troubles du langage sont relevés dans les cas de l'hydatidose cérébrale. La localisation médullaire entraîne des paraplégies par compression. La localisation splénique passe fréquemment asymptomatique, parfois responsable d'un inconfort abdominal ou d'une gêne de l'hypocondre gauche. Les fractures, souvent au niveau des vertèbres, sont présentes lors de l'hydatidose osseuse. Lors d'une infection cardiaque par les kystes hydatique, les signes cliniques suivants peuvent être notés : dyspnée d'effort, des palpitations, une ischémie myocardique, une hémoptysie et une anomalie électrique (Klotz et al., 2000).

Des rares réactions immunitaires ont été décrites dans la littérature : urticaire, asthme, néphropathie membranaire et choc anaphylactique lors de rupture (le choc entraînait la mort dans 5% des cas) (Adidou, 2015).

Les lésions causées par les kystes hydatiques chez l'Homme diffèrent selon l'organe, la localisation au niveau de l'organe, le type du kyste (primaire ou secondaire) et le nombre des kystes présents. C'est des lésions d'atrophie globale de l'organe infesté à cause de l'augmentation de la taille du kyste et la compression de l'organe avec des réactions cellulaires inflammatoires accompagnées de la nécrose au niveau histologique (Eckert, Gemmell and Meslin, 2001).

4.1.2 Chez le mouton

Les kystes croissent souvent lentement, parfois même sur plusieurs années et se caractérisent par l'absence de signes bien définis même en cas de présence de plusieurs kystes hépatiques et pulmonaires.

Cependant dans certains cas, on peut observer des symptômes qui ne sont pas spécifiques à l'hydatidose.

En cas de localisation hépatique, on note des troubles digestifs et un ictère en cas de compression des canaux biliaires (Eckert and Deplazes, 2004).

Dans le cas de la localisation pulmonaire, une dyspnée et une toux rebelle au traitement sont relevées. Des fractures spontanées, des troubles nerveux et des problèmes circulatoires ont été décrits chez les animaux infectés (Eckert et al., 2002).

Comme chez l'Homme, les lésions hydatiques sont rencontrées dans des organes différents mais majoritairement au niveau du foie et des poumons. La lésion qu'on rencontre dans la majorité des organes est une lésion d'atrophie globale de l'organe parasité à cause du développement de la taille du kyste et la compression de cet organe avec des réactions cellulaires inflammatoires accompagnées de la nécrose au niveau histologique. Lors de cette compression, on peut avoir soit une hypertrophie compensatoire du parenchyme restant soit une destruction partielle comme dans le cas de la compression du parenchyme rénal (Sweatman and Williams, 1963; Klotz et al., 2000; Salem et al., 2010; Jubb and Kennedy, 2015).

Dans le cas d'une hydatidose hépatique, le foie présente de nombreux granulomes inflammatoires accompagnés de l'œdème avec les noyaux des hépatocytes qui deviennent

pycnotiques. Une nécrose par ischémie du trame fibro-conjonctive des canaux biliaires peut aussi avoir lieu. Une cholangite due à la migration des vésicules filles a été reportée, et dans des cas graves elle peut se transformer en cholangite sclérosante ou en cirrhose biliaire secondaire. Si une rupture d'un kyste hydatique se passe au niveau de la vésicule biliaire, une cholécystite aiguë pseudo-lithiasique s'installera. Le matériel hydatique peut éventuellement causer une pancréatite lors du reflux brutal dans la vésicule biliaire (Klotz et al., 2000; Solcan et al., 2010).

Des lésions dégénératives avec des artérioles œdématiées et infiltrées de lymphocytes et de polynucléaires éosinophiles sont très fréquentes au niveau des poumons lors de l'échinococcose kystique. Les corpuscules de Malpighi présentent une glomérulonéphrite proliférative (Solcan et al., 2010).

Dans le cas d'hydatidose cardiaque, une péricardite aiguë sérofibrineuse ou purulente s'installe. Fracture, suppuration et fistulisation cutanée sont les lésions rencontrées lors de l'hydatidose à localisation osseuse (Klotz et al., 2000).

Au niveau de l'appareil lymphatique, un épaississement des deux septa, l'inter-folliculaire et l'inter-cordial, est rencontré dans les nœuds lymphatiques mésentériques (Solcan et al., 2010).

4.1.3 Chez le chien

L'infection échinocoque par le ver adulte d'*Echinococcus granulosus* chez le chien est généralement asymptomatique, même lors d'une forte charge parasitaire (jusqu'à 6000 vers) cette parasitose peut passer inaperçue sans aucun signe clinique (Villeneuve, 2003). Dans des cas de pénétration des segments gravides du ver dans les glandes anales, un prurit anal peut être induit (Ripoche, 2009). Il a été noté que chez quelques chiens, des signes d'entérite peuvent être présents (Euzéby, 1971). Ces signes ne sont pas, cependant, pathognomoniques. Les œufs n'étant pas visibles à l'œil nu, aucun signe externe ne permet de repérer l'infection.

Deux types de lésions ont été décrites chez l'hôte définitif. Le ver adulte d'*Echinococcus granulosus* qui se loge dans le duodénum provoque soit un aplatissement local avec une légère infiltration cellulaire et une production accrue de mucus (Eckert et al., 2002), soit une entérite catarrhale avec cette fois-ci un épaississement de la muqueuse (Palmer, Jubb and Kennedy, 2015). Une infiltration lympho-éosinophilique est rencontrée dans les deux cas (Solcan et al., 2010).

4.2 Méthodes de diagnostic

4.2.1 Diagnostic parasitologique

4.2.1.1 Chez l'Homme

Une ponction de biopsie d'un kyste hydatique suspect peut être envisagée mais reste très rarement recommandée en raison du risque de dissémination et d'apparition de foyers secondaires. La ponction n'est envisageable que dans un contexte thérapeutique. Le liquide hydatique peut être récupéré du foie, du poumon ou autres organes par la technique PAIR (Ponction, Aspiration, Injection, et Réaspiration) guidée peropératoire chez des patients opérés ou bien lors d'une vomique d'un liquide claire contenant le parasite, causée par une rupture du kyste dans une bronche pour un kyste hydatique pulmonaire qui se manifestant chez le patient par des douleurs thoracique et un crachat de ce liquide. Les matériaux obtenus par ponction de biopsie, par chirurgie ou par PAIR ou la vomique peuvent être examinés sous microscope optique à la recherche des protoscolex et crochets ou de la membrane germinale du parasite (Eckert, Gemmell and Meslin, 2001).

Traditionnellement, la biopsie des kystes hydatiques du foie était déconseillée, car elle était considérée comme un comportant de risque de réactions anaphylactiques dangereuses ou de fuite du matériel hydatique viable induisant une échinococcose secondaire. Certaines études récentes ont montré que la ponction des kystes à l'aiguille fine guidée par l'échographie, par voie trans-hépatique et sous couverture anthelminthique, peut être considérée comme une technique relativement sûre. Ainsi, cette ponction a été utilisée comme procédure de diagnostic dans les cas douteux où les petites lésions de l'hydatidose ressemblent à des lésions simples et quand aucun anticorps sérique anti-*Echinococcus* n'a été détecté (Eckert et al., 2002).

Afin de prévenir l'échinococcose secondaire, une chimiothérapie à base d'albendazole est recommandée quatre jours avant la ponction et au moins un mois après la ponction d'une lésion diagnostiquée comme étant un kyste d'*Echinococcus granulosus*. Il faut mentionner que la ponction de biopsie est maintenant utilisée dans le cadre d'une nouvelle procédure de traitement de l'hydatidose (Eckert et al., 2002).

4.2.1.2 Chez les ovins

Généralement, l'examen des animaux se fait à l'abattoir lors de l'inspection vétérinaire des viandes et carcasse, à la recherche des vésicules à double membrane avec du liquide sous-tension généralement au niveau du foie et des poumons constitue toujours l'examen de base pour le diagnostic de l'hydatidose chez les ovins (Eckert et al., 2002).

4.2.1.3 Chez le chien

Le diagnostic de l'échinococcose kystique chez le chien en ante-mortem peut être réalisé à l'aide de plusieurs techniques :

4.2.1.3.1 Coproscopie

La coproscopie consiste à la recherche des œufs ou les proglottis du ver adulte dans les matières fécales de l'hôte définitif. Cette technique doit être manipulée avec une grande prudence vu le risque zoonotique que présente les œufs pour l'investigateur. Les œufs peuvent être détectés dans les échantillons fécaux par la technique de flottaison, ou sur la peau péri-anale en attachant un papier adhésif transparent sur la peau et l'examinant à la loupe ou sous un microscope. Mais cette détection microscopique des œufs *d'Echinococcus granulosus* n'est pas recommandée à cause de la ressemblance de l'œuf à ceux des autres espèces des tænias. En outre, l'élimination des œufs est souvent irrégulière (Benito and Carmena, 2005). Toutefois, les proglottis *d'Echinococcus granulosus* libérés spontanément par les chiens et détectés sur la surface des échantillons fécaux peuvent permettre un bon diagnostic de la parasitose chez le chien (Eckert et al., 2002).

4.2.1.3.2 Purgation par l'Arécoline

La méthode de diagnostic standard utilisée pendant des décennies pour la détection des vers *d'Echinococcus granulosus* chez le chien, consiste à la purgation du contenu intestinal de l'hôte par le bromhydrate d'arécoline.

L'arécoline est une molécule parasympathomimétique qui a un effet stimulant sur les muscles lisses et l'activité sécrétoire de l'intestin et qui paralyse en même temps les vers adultes. La purgation élimine les vers paralysés avec les matières fécales qui doivent être inspectées par la suite (Eckert et al., 2002).

L'avantage de cette technique est la grande spécificité qui peut atteindre les 100 %. Par contre, la sensibilité n'atteint pas 50 % si elle n'est utilisée qu'une seule fois. Ce test est contre-indiqué chez les chiennes gestantes, les chiens âgés et les chiots. L'arécoline doit être administré oralement à une dose de 4 mg/kg PV. Ce dosage doit être bien calculé car des effets secondaires indésirables graves peuvent apparaître (Benito and Carmena, 2005). En effet, avant la mise en place de ce test, certaines mesures d'éthiques doivent être mises en œuvre par un personnel bien formé, avec l'autorisation des autorités responsables et sous contrôle vétérinaire. Une grande attention doit être accordée à toutes les phases du protocole de ce test (Eckert, Gemmell and Meslin, 2001).

4.2.1.3.3 Diagnostic nécropsique : Sédimentation et comptage

Après avoir divisé l'intestin à plusieurs sections, ces dernières doivent être placées dans des plateaux métalliques, et ouvertes par des ciseaux pour enfin être immergées dans une solution physiologique saline. Le raclage de l'intestin permettra de détacher les vers accrochés à l'épithélium intestinal. Et la solution saline permettra une stratification différentielle entre les œufs, les vers et les matières fécales : les œufs flottent vers la surface puis les vers vont se trouver au milieu de la solution et les débris des matières fécales vont se sédimenter vers le bas.

Les vers sont ensuite comptés à l'aide d'une loupe ou un microscope binoculaire. L'inconvénient de cette méthode est le fait que les petits vers peuvent échapper à la recherche (Eckert et al., 2002).

4.2.2 Imagerie médicale

4.2.2.1 Chez l'Homme

Les procédures d'imagerie telles que l'échographie (US), TDM et l'IRM sont fréquemment utilisées pour le diagnostic. Une classification internationale des images des kystes hydatiques a été publiée (tableau 5, figure 9) (OMS, 2003).

Tableau 5. Comparaison entre la classification de (Gharbi et al., 1981) et la nouvelle classification standard proposée par (OMS, 2003)

Gharbi et al**., 1981**	**Classification proposée par la WHO**	**Groupe clinique**
-	CL	**Groupe 1** : Active group : développement des kystes qui sont généralement fertiles
Type 1 Type III Type II	Type CE1 Type CE2 Type CE3	**Group 2:** Transition groupe : les kystes commencent à se dégénérer, mais contiennent toujours des protoscolex viables
Type IV	Type CE4	**Group 3**: Inactive groupe : dégénérescence ou calcification partielle ou totale, les kystes ne semble pas fertile à ce stade
Type V	Type CE5	**Groupe 3 :** Lésion calcifiée

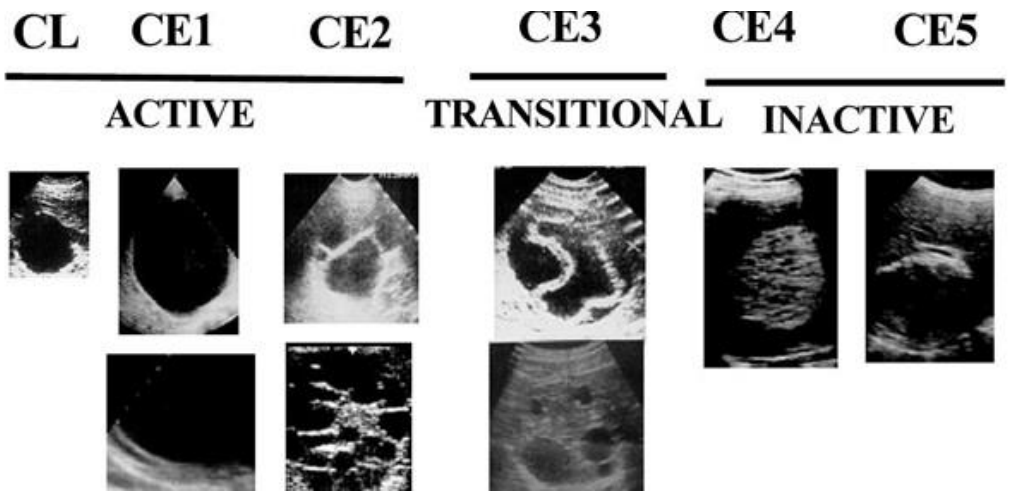


Figure 9. Résumé des lésions et des types de kystes hydatiques observés par l'échographie montrant les types de kystes actifs, transitoires et inactifs (OMS, 2003)

Concernant la radiologie, elle constitue le moyen de diagnostic le plus adapté pour les kystes pulmonaires, chez les adultes, le kyste hydatique typique des poumons, est présenté dans un cliché radiographique comme une grande masse bien délimitées, sphériques, ou de multiples nodules d'une masse homogènes (Figure 10) (Morar & Feldman, 2003). Les kystes viables (kystes remplis de liquide hydatique et de protoscolex) et kystes morts (calcifiés et sans liquide hydatique) sont reconnaissables à la radiologie. Les kystes viables apparaissent sur les scanners comme des lésions hypodenses fortement délimitées avec une densité de 0 à 30 unités de Hounsfield (HU), c'est-à-dire isodenses avec du liquide. Après l'administration d'un produit de contraste, elles ne présentent aucune amélioration ni aucun changement de densité (>10 UH) contrairement aux kystes calcifiés qui représente un chagement de densité (Engler et al., 2019). Les kystes peuvent mesurer entre 1 cm et 20 cm de diamètre. Les grands kystes peuvent affectér

le médiastin, et les kystes périphériques peuvent produire une réaction pleurale, ou causer une atélectasie du parenchyme adjacent (Sinner, 1993).

Figure 10. Clichés radiographiques des kystes hydatiques thoraciques, présentés comme une grande masse bien délimitées, sphériques, ou de multiples nodules.

L'IRM (image de résonnance magnétique) est utilisée dans certains cas pour le diagnostic d'un kyste hydatique du cerveau par exemple ou pour visualiser les changements pouvant survenir dans le système vasculaire à l'intérieur ou à l'extérieur du foie (Pawlowski, 2001).

La tomodensitométrie joue un rôle important dans le diagnostic topographique exact et le dénombrement des kystes (Tajdine et al., 2006).

4.2.2.2 Chez les ovins

Au cours des 30 dernières années l'échographie a été utilisée avec succès dans les élevages pour déterminer le nombre de fœtus et le stade de gestation, permettant ainsi une meilleure gestion des élevages en fin de gestation. Mais également, l'examen échographique peut fournir des informations cliniques importantes sur les lésions hépatiques chez les moutons (Scott and Sargison, 2010), mais aussi sur d'autres organes tel que : la vessie, l'utérus, le vagin, l'abdomen ventral, le rein droit, le diamètre abomasal des agneaux nouveaux nés, le prolapsus vaginal, scrotum et les articulations (Scott and Sargison, 2010).

Chez la plupart des animaux notamment le mouton, le foie est observable du côté droit, en tenant l'animal soit debout ou sur un décubitus latéral du 7e au 12e espace intercostal à une fréquence de 3.5 MHz (Kandeel et al., 2009). La hauteur du foie observée est plus importante au niveau du 11e espace intercostal (en moyenne 30 cm) et plus faible au niveau du 8e espace intercostal (en moyenne 11,5 cm). Le parenchyme hépatique apparait à l'échographie sous la forme d'une multitude d'échos distribués de manière homogène, et contient de nombreux

vaisseaux dont la lumière apparait anéchogène. La veine porte est visualisée principalement du 10e au 12e espace intercostal, mais elle est parfois visible au 9e voire au 8e espace intercostal. Elle se différencie des autres vaisseaux par sa paroi échogène et au niveau de sa ramification étoilée se distribuant dans le parenchyme hépatique. Elle a une section circulaire. Son diamètre, plus important que celui de la veine cave caudale, varie en fonction de l'espace-intercostal choisit : il est maximal au 12e espace intercostal puis diminue progressivement jusqu'au 8e espace intercostal (Kandeel et al., 2009).

L'échographie est l'examen le plus performant pour le diagnostic de l'hydatidose hépatique. L'échographie s'est imposée comme l'examen de référence en raison de sa disponibilité même dans les zones reculées, surtout avec le développement et introduction des échographes portables qui devrait fournir plus de données épidémiologiques et des informations sur l'hydatidose ovine pour la planification et aussi pour le dépistage de masse des moutons pour évaluer l'efficacité des actions de contrôle car les ovins représentent le principal indicateur de l'infection dans un programme de contrôle (Lahmar et al., 2007). L'utilisation de l'examen post mortem comme méthode de dépistage régulier et de masse pour la surveillance ne serait guère acceptée par les éleveurs pour des raisons économiques, culturelles et zootechniques. En outre, dans les pays en développement où la maladie hydatique est souvent très endémique, cette méthode de dépistage devrait être moins coûteuse et plus pratique que l'abattage régulier d'un grand nombre de moutons (Lahmar et al., 2007).

Plusieurs études explorant cette technique chez des ovins ont été entreprises. En 1996, dans le district de Turkana au Kenya, foyer de la prévalence la plus élevée de la maladie au monde chez l'Homme, la sensibilité et la spécificité de l'échographie était respectivement de 54,36 % et 97,64 %. Les faux positifs étant le résultat, dans la grande majorité, de la présence de cysticerques de *Taenia hydatigena* (boule d'eau) dans le foie des animaux examinés (Maxson et al., 1996). Une autre étude a déterminé une sensibilité et spécificité de l'échographie élevée de 80 % et 100 % respectivement (Hussein and Elrashidy, 2014). Ainsi, il s'avère effectivement que l'échographie est une méthode également de choix, pour le diagnostic de l'hydatidose kystique, chez l'animal vivant.

4.2.3 Diagnostic immunologique

4.2.3.1 Chez l'Homme

Le diagnostic immunologique est un excellent moyen complémentaire du diagnostic chez l'Homme, son utilité se présente non seulement pour le diagnostic primaire, mais également

pour le suivi des patients après un traitement chirurgical ou une chimiothérapie. C'est une procédure qui se fait systématiquement pour la confirmation du diagnostic. Ce diagnostic repose généralement sur la détection des anticorps circulants dans le sérum car cette recherche est plus spécifique que la détection des antigènes d'*Echinococcus granulosus* dans le même organisme (Zhang & McManus, 2006).

Les lipoprotéines, antigène B (AgB : une molécule hautement immunogène) et antigène 5 (Ag5), les principaux composants du liquide hydatique, ont reçu le plus d'attention en ce qui concerne le diagnostic. Avec le liquide du kyste, ils sont les antigènes les plus largement utilisés dans les tests immunologiques de l'hydatidose actuels, avec une sensibilité et spécificité estimées à 65 % et 91 % respectivement pour l'AgB et à 63 % et 97,2 % pour l'Ag5. Les deux antigènes ont été bien caractérisés par immunoblot et/ou par immunoprécipitation d'antigène radiomarqué. Bien que ces deux antigènes se soient révélés utiles sur le plan diagnostique, la standardisation de leur utilisation pose encore problème. La réactivité croisée avec les antigènes d'autres tænias constitue un problème majeur (Zhang et al., 2003; Zhang & McManus, 2006).

Les tests sérologiques du diagnostic de l'échinococcose kystique pourraient être améliorés si on pratique une utilisation combinée des antigènes natifs et recombinants (Zhang et al., 2003).

4.2.3.2 Chez les ovins

Les ovins, sont souvent infectés par plusieurs tænias simultanément ce qui provoque des réactions sérologiques interspécifiques entre les différentes espèces des vers. Toutefois, ces animaux ne produisent qu'un faible taux d'anticorps contre l'infection parasitaire. D'après une étude menée dans des régions endémiques dans le monde, il s'est apparu que chez l'espèce ovine des anticorps contre quelques antigènes d'*Echinococcus granulosus*, dont l'antigène 5, ne peuvent être détectés que chez certains individus infectés et non pas tous. Ces attestations démontrent les faibles spécificités et sensibilités des tests immunologiques, ce qui rend leur utilisation non-envisageable (Zhang & McManus, 2006).

4.2.3.3 Chez le chien

Durant ces dernières années, il y'a un progrès considérable en matière de recherche et du développement d'un diagnostic immunologique pour l'échinococcose canine. Le test coproantigène, en particulier, peut être considéré de bonne sensibilité pour refléter une infection courante et donc peut remplacer la purgation à l'aide de l'arécoline.

4.2.3.3.1 Détection des copro-antigènes

Cette technique consiste à la recherche de l'un des deux types d'antigènes, soit des antigènes extraits somatiques bruts du ver, soit des antigènes excrétoires-sécrétoires du protoscolex dans les matières fécales de l'hôte à l'aide des kits ELISA double sandwich (Eckert et al., 2002; Benito and Carmena, 2005).

Des résultats positifs de l'ELISA peuvent être recueillis même dans la période prépatente, et cela à partir du 5e jour post-infection. Les valeurs commencent à décroître à des valeurs négatives 2 à 4 jours après l'élimination des vers *d'Echinococcus granulosus* par un traitement au praziquantel. Les résultats des études faites sur cette technique ont montré que les valeurs de l'ELISA ont une corrélation positive avec la quantité de ver présente dans l'intestin, et que le taux des antigènes est à sa part corrèle avec cette quantité (Zeyhle et al., 1992). Cette technique a montré son importance avec une sensibilité de 99 % et une spécificité de 97 % (Eckert et al., 2002).

Les échantillons fécaux peuvent être pris directement du sol ou du rectum et peuvent être gardés à froid (-20 °C) jusqu'à 6 mois. Le test peut être utilisé pour l'identification des cas infectés lors des programmes de lutte, y compris les chiennes gestantes, les chiens âgés et les chiots. Aujourd'hui trois kit ELISA sont disponibles dans le commerce (Zhang et al., 2003).

4.2.3.3.2 Détection des anticorps sériques

Des anticorps sériques (IgG, IgA et IgE) spécifiques peuvent être détectés dans le sérum des chiens infectés par *Echinococcus granulosus*, en utilisant des préparations antigéniques provenant des protoscolex dans des kits ELISA. Ces anticorps peuvent être détectés 2 à 3 semaines post-infection. Une étude suggère que les œufs libérés dans l'intestin grêle de l'hôte définitif, après l'apolyse des proglottis, peuvent pénétrer la barrière intestinale et causent une stimulation immunologique chez l'hôte (Zhang et al., 2003).

Les kits ELISA disponibles ont une faible sensibilité et une spécificité très variable. Pourtant, un nouveau kit utilisant un antigène recombinant nouvellement dérivé du protoscolex a montré une spécificité de 100%, mais la sensibilité n'est pas comparable à celle des anciens kits. L'utilisation des kits ELISA pour la recherche des anticorps sériques est toujours discutable à cause de sa faible sensibilité, la persistance des anticorps dans le sérum après l'élimination des vers et l'absence de corrélation avec la pression d'infection (Craig et al., 1995; Eckert et al., 2002; Zhang et al., 2003).

Si une séropositivité a été détectée mais avec un résultat négatif par la recherche de coproantigènes, cela renseigne sur une possible exposition récente (Zeyhle et al., 1992).

4.2.4 Test de biologie moléculaire

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une méthode de très bonne sensibilité et spécificité. Elle est utilisée chez l'Homme et l'hôte intermédiaire pour la confirmation de kystes hydatiques douteux mais surtout pour l'identification de la souche circulante. Cette technique se base sur un protocole identique chez l'Homme et l'hôte intermédiaire puisque l'ADN doit être extrait à partir des kystes hydatiques (protoscolex ou membrane germinale) d' origine humaine ou animale (Dousti et al., 2013). Le protocole est basé d'abord sur une extraction de l'ADN soit par un Kit d'extraction ou bien par une extraction classique (couple phénol-chloroforme) (Rostami Nejad et al., 2008). Ensuite, l'ADN extrait fera l'objet d'une amplification de ses séquences pour permettre de dupliquer de manière exponentielle la séquence à étudier (amplicon), même si la séquence initiale est très faible. Elle permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN. Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes : une dénaturation de l'ADN par température élevée pour séparer les deux brins qui le composent, une hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée en utilisant soit des amorces mitochondriales ou bien des amorces nucléaires, puis une élongation grâce à l'action d'une ADN polymérase ce cycle est ciblé (la durée d'un cycle est de l'ordre de la minute). Les trois étapes, constituant un cycle de PCR, sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique. Le produit de la PCR sera révélé par électrophorèse sur Gel d'agarose qui permettra la migration des bandes d'ADN amplifiés en fonction de leurs poids moléculaire.

Chez le chien (hôte définitif), la PCR est utilisée pour déterminer la souche circulante mais aussi pour détecter les chiens positifs à l'infection. Elle est basée sur le même principe technique décrit précédemment chez l'hôte intermédiaire mais avec quelques légères modifications car les matières fécales contiennent des substances inhibitrices de la PCR, ce qui nécessite d'ajouter une étape de lavage de l'ADN extrait par le PBS. L'extraction de l'ADN du parasite peut être obtenue à partir des œufs (rassemblé grâce à la technique de flottaison), des proglottis ou des cellules du ver parasite et peut être détecté directement dans les matières fécales après une amplification par PCR. L'extraction de l'ADN se fait soit par kit d'extraction spécifique aux matières fécales ou bien par la méthode classique avec lavage de l'ADN obtenu. Pourtant, aucune copro-PCR n'est valable à nos jours pour la détection de toutes les souches

d'*Echinococcus granulosus* ; des amorces de PCR pour les souches G1, G5 et combiné G6/7 ont été conçues (Mathis and Deplazes, 2006).

La PCR, vu son coût élevé, n'est utilisée que pour la confirmation sur des échantillons positifs dans les régions où la prévalence de l'échinococcose kystique est faible (Mathis et Deplazes, 2006).

4.3 Moyens de contrôle de l'hydatidose/échinococcose

Malheureusement, le cycle du parasite est mal compris par la population, ce qui affecte gravement le respect des mesures d'hygiène recommandées pour réduire la transmission de cette maladie (Thys et al., 2019).

Battelli a préconisé l'intégration des facteurs sociaux, politiques et économiques et a insisté sur une meilleure utilisation des ressources disponibles et l'adaptation des stratégies de lutte au contexte régional (Battelli, 2009).

4.3.1 Mesures prophylactiques

Le contrôle de l'hydatidose est basé sur des mesures prophylactiques strictes qui doivent être appliquées au niveau des pays endémiques afin d'éradiquer l'infection hydatique. Ces mesures sont particulèrement importantes au niveau des populations à risque, des élevages de mouton, des abattoirs et des populations canines (Klotz et al., 2000; Eckert et al., 2002; Marossi, 2010).

Les programmes efficaces de lutte contre l'échinococcose kystique ont montré que la prévention de la transmission à l'un des hôtes peut réduire, voire éliminer l'infection dans les populations humaines et animales. Des programmes de lutte basés sur le traitement des chiens ont connu un succès. Par conséquent, si l'un ou les deux hôtes peuvent être vaccinés, l'effet sera d'améliorer et d'accélérer plus rapidement le contrôle de cette maladie (Heath et al., 1994).

4.3.1.1 Chez l'Homme

Dans les régions endémiques à l'hydatidose, le contact chien (non vermifugé) - Homme doit être minimisé, car la proximité entre les chiens et les humains favorise les infections humaines (El Berbri et al., 2015a). Il faut interdire l'accès des chiens aux exploitations agricoles et même à la cuisine, car le risque de contamination des productions agricoles et des aliments par des fèces de chien contenants les œufs du parasite *E. granulosus* est très élevé. Il est

important de questionner et faire évoluer les traditions et pratiques de la population locale, en interdisant l'abattage à domicile car les organes infectés sont servis directement aux chiens à propriétaires. De même, les abattages non contrôlés où les saisies d'abats infectés sont donnés aux chiens errants ou jetés sans destruction dans les décharges publiques sans clôtures sont sources de contamination. Il faut prévenir la consommation de crudités, la consommation d'eau non traitée provenant de puits non couverts, mais aussi sensibiliser la population sur les mauvaises pratiques d'hygiène, en particulier chez les enfants (El Berbri et al., 2015a). Il s'avère que l'éducation sanitaire de toutes les catégories d'âge et de toute la population s'avère très importante (Saadi et al., 2020).

4.3.1.2 Chez le mouton

Dans les pays méditerranéens y compris le Maroc, les systèmes de production animale reposent essentiellement sur un élevage extensif et traditionnel, caractérisé par le pastoralisme, les mouvements incontrôlés d'animaux et le nomadisme. Chaque troupeau est suivi par des chiens qui sont souvent nourris d'abats et les carcasses sont laissées aux chiens errants et aux autres carnivores sauvages pour être éliminées (Dakkak, 2010). La vaccination des ovins dans ces zones endémiques représentera une des solutions les plus prometteuses (Larrieu et al., 2013).

Aux bergeries, chez les éleveurs, il est important d'interdire l'accès des chiens non traités à la bergerie des moutons, et de réduire le nombre de chiens de garde et de berger par foyer (El Berbri et al., 2015a).

4.3.1.3 Chez le chien

C'est surtout les abattoirs et les souks qu'il faut revoir car ils sont caractérisés par une infrastructure médiocre favorisant un accès facile aux chiens errants et représentant ainsi une source d'un énorme volume d'organes contaminés, en raison de l'élimination inadéquate des abats infectés et donc contribuant à une infection des chiens continue (El Berbri et al., 2015a).

La sensibilisation des propriétaires à traiter leurs chiens par le Praziquantel est l'unique médicament, sans effets indésirables notoires reconnu efficace contre *E. granulosus*. Avec une dose de 5 mg/kg, il peut atteindre, en effet d'une efficacité de 100% (Farias et al., 2004; Larrieu and Zanini, 2012). En raison de son indice thérapeutique très large, le praziquantel est particulièrement adapté pour les programmes de contrôle de l'échinococcose kystique (Thomas

and Gönnert, 1978). Il a été effectivement largement utilisé après son introduction en 1977 dans la majorité des programmes qui ont entrepris la lutte contre la maladie.

D'autres actions peuvent être menées comme la contraception et stérilisation des chiens errants, que ce soit par la chirurgie, par une stérilisation chimique, ou une contraception physique par isolement des femelles en chaleur. L'application de ce type de mesures s'avère cependant difficile et onéreuse à appliquer à la population des chiens errants. La stérilisation et la contraception ont surtout été associées aux programmes antirabiques. En effet, un programme nommé ″Animal Birth Control (A B C) ″ (Contrôle des naissances des animaux), a été adopté dans de nombreux pays (Totton et al., 2010). Il s'agit d'une stratégie de contrôle de la population canine dans laquelle des chiens errants sont capturés, stérilisés, vaccinés contre la rage et libérés à leur point de capture. L'exemple type est celui de Jodhpur (Inde) où cette stratégie avait débuté en 1994. En 2002, un total de 24 986 chiens a été traité, soit 65% des femelles stérilisées chirurgicalement et vaccinées. La population canine a été alors réduite de 28%.

4.3.2 Moyens de lutte

4.3.2.1 Traitement des chiens

Le traitement des chiens au Praziquantel peut être efficace si le protocole du traitement est bien étudié en fonction de l'état d'infection des chiens et de la situation épidémiologique de la région. Le praziquantel (Droncit®) avec une dose de 5 mg / poids vif, constitue actuellement le médicament de choix avec une efficacité de 100% contre le taenia échinocoque. Il a l'avantage d'être actif sur les échinocoques immatures dès la 4ème semaine post-infection et même plus tôt. Selon Cabrera, un essai de contrôle de la transmission d'*E. granulosus* des chiens aux moutons dans différentes régions du département de Floride en Uruguay par le traitement des chiens toutes les 6 semaines au Praziquantel, était basé sur la période prépatente de l'infection par *E. granulosus*. Le traitement des chiens a permis d'éviter la transmission de l'*E. granulosus* aux animaux nés 1 an après le début des traitements, contrairement au traitement tous les 12 et 16 semaines qui ont été basés sur le taux de réinfection par le ténia chez les chiens de la région. Les chiens ont été réinfectés par *E. granulosus* entre 2 et 4 mois après le traitement, alors qu'ils ont été réinfectés par les *Taenia sensu stricto* dans les 2 mois suivant le traitement (Cabrera et al., 2002). Alors que chez les agneaux ce traitement des chiens à des intervalles de 12 et 16 semaines n'a pas permis d'arrêter la transmission *d'E. granulosus*, mais le nombre d'exploitations et le nombre de moutons infectés par *E. granulosus* étaient

inférieurs dans les zones où les chiens recevaient 12 traitements hebdomadaires par rapport aux chiens recevant 16 traitements hebdomadaires (Cabrera et al., 2002). Autres résultats ont montré que six traitements hebdomadaires des chiens ont été efficaces pour réduire le taux d'infection par *E. granulosus* de ces chiens traités en l'espace d'un an (Lloyd et al., 1992). Le traitement des chiens toutes les 12 semaines, n'a pas réussi à prévenir la transmission d'*E. granulosus* aux chiens traités (Cabrera et al., 1996).

4.3.2.2 Aperçu sur le dévoloppement de la vaccination en parasitologie

Beaucoup de problèmes de résistance aux médicaments sont causés par l'administration parfois irrationnelle des molécules chimiques pour le traitement contre les maladies parasitaires. La vaccination reste une alternative importante et plus respectueuse de l'environnement que les médicaments, car les vaccins ne laissent pas de résidus et ne présentent pas de problème de résistance aux parasites (Smith and Munn, 1990). Bien qu'en parasitologie, peu de vaccins sont efficaces car plusieurs difficultés s'opposent au developpement de vaccin (Riveau, 2000). La première contrainte concerne déjà les parasites qui sont des organismes multicellulaires et complexes comparés aux virus et bactéries et qui rend le développement de vaccins difficile. En outre, les parasites évoluent avec leurs hôtes au fils du temps et utilisent des astuces pour vivre à l'interieur ou sur les animaux sans être détectés par le système immunitaire. Cela les rend donc difficiles à cibler (Bourdoiseau, 2017). Les parasites gastro-intestinaux sont très variables que ça soit chez l'Homme ou l'animal. Chaque parasite est antigéniquement très complexe et présente des stades de développement distincts (Bourdoiseau, 2017). Mais les scientifiques ont pu arriver à développer des vaccins à base d'antigène recombinant et qui ont montré des taux de protection élevés surtout contre *T. ovis* and *E. granulosus* et plus recement contre *T. saginata*, *E. multilocularis*, et *T. solium* (Lightowlers et al., 2003). D'autres vaccins ont été développés, comme le vaccin contre *Fasciola hepatica* (Silvane et al., 2020), ou le vaccin contre le paludisme. Sinon, de nombreuses publications mettent en avant des vaccins efficaces contre la leishmaniose et une babésiose canine, une teigne bovine, la toxoplasmose ovine, les coccidioses aviaires et des tiques de bovins ; malheureusement en dépit de ces nombreuses publications, peu de vaccins parviennent à la commercialisation (Bourdoiseau, 2017).

4.3.2.3 Vaccination de l'hôte intermédiaire

Ces méthodes classiques de lutte contre ce parasite incluent la destruction à l'abattoir des organes infectés et la vermifugation régulière des chiens. En outre, le risque d'infection

humaine peut-être réduit en lavant et cuisant les aliments contaminés et en évitant les contacts avec les chiens. Les stratégies de contrôle basées sur ces principes ne semblent pas être efficaces. Pour aider à l'éradication du parasite, la vaccination de l'hôte intermédiaire est un domaine en plein essor qui a considérablement progressé ces dernières années suite au développement d'un vaccin recombinant contre l'infection à *Tænia ovis* chez les ovins. Le vaccin 45W fut le premier vaccin recombinant efficace contre une infection parasitaire et dans ce cas, contre *Tænia ovis* infectant le mouton (Lightowlers, 2006). Des homologues des antigènes To18 et To 45W ont été trouvés dans le génome de *Tænia saginata* et *Tænia solium* permettant ainsi un développement rapide de vaccins recombinants contre ces espèces. Une approche similaire a été appliquée avec succès pour développer un vaccin recombinant contre *Echinococcus granulosus* (Lightowlers et al., 2000). Auparavant, une gamme d'antigènes différents, y compris du liquide hydatique, des membranes kystiques et des protoscolex, avaient été utilisés comme prototype de vaccin contre *Echinococcus granulosus* (Tableau 12). Cependant, les oncosphères ou les antigènes oncosphériques induisaient des niveaux de protection beaucoup plus élevés chez les moutons et les souris lors des essais. Une protéine recombinante de 16,5 kDa, appelée EG95, isolée et utilisée en forme native avant d'être produite par biotechnologie, a induit une protection significative de 96 % à 98 % contre le développement des kystes hydatiques chez les ovins. L'immunité (médiée par des anticorps fixant le complément) générée par deux injections du vaccin à 1 mois d'intervalle persiste pendant au moins 12 mois. Par la suite, une vaccination annuelle du bétail domestique est recommandée. La durée de conservation du vaccin formulé est d'au moins 12 mois (David Heath et al., 1981; Lightowlers et al., 1996, 1999; Zhang et al., 2001).

Un litre de culture d'*E.coli* peut donner plus de 10 000 doses de vaccin, ce qui signifie que ce vaccin pourrait être fabriqué à moindre coût s'il était produit à grande échelle. D'autres caractéristiques remarquables du vaccin EG95 sont l'immunité qui peut être transférée passivement à des nouveau-nés avec les anticorps de mères vaccinées. En outre, le vaccin a conféré un degré élevé de protection contre le challenge par différents isolats géographiques d'*Echinococcus granulosus*, ce qui indique qu'il pourrait avoir une large applicabilité en tant que nouvel outil à utiliser dans les campagnes de lutte contre les maladies hydatiques (Lightowlers et al., 1996; Woollard et al., 2000; Zhang et al., 2003).

La vaccination contre l'infection primaire semble être une approche très prometteuse pour contribuer au contrôle de l'infection. Les niveaux de protection sont très élevés et pratiquement uniques parmi les infections helminthiques. Une des raisons pourrait être trouvée dans

l'antigénicité oncosphérique conservée au stade précoce des métacestodes de ces parasites. L'oncosphère pénètre très rapidement dans son hôte non immun et atteint sa destination finale en quelques minutes ou heures, où elle commence à mûrir rapidement en un stade de prolifération protégé par la couche stratifiée. De toute évidence, l'immunité innée n'élimine pas cette oncosphère qui s'établit très tôt. Il faut environ 5 à 7 jours à l'hôte pour monter une réponse immunitaire spécifique au parasite (y compris les composants humoraux et cellulaires). Pendant ce temps, la couche protectrice a été entièrement synthétisée et fournit une barrière physique contre les attaques immunitaires (Gottstein et al., 2017).

En résumé, la courte fenêtre offerte par l'oncosphère qui permet une clairance immunitaire relativement facile pendant la première phase d'infection a fait d'*Echinococcus* l'un des candidats helminthes les plus prometteurs pour une immunisation protectrice efficace (tableau 6). Le vaccin fournit donc un nouvel outil précieux pour aider à contrôler la transmission de cet agent pathogène et a également le potentiel de prévenir la maladie hydatique directement par la vaccination des hôtes intermédiaires et des humains (Gottstein et al., 2017; Zhang et al., 2003).

Tableau 6. Vaccins candidats pour la protection contre l'infection par les métacestodes d'*Echinococcus granulosus* (Gottstein et al., 2017)

Vaccin	Molécule(s)	Adjuvant	Protection %	Hôte
rEg95	Protéine de la glande de pénétration oncosphérique	QuilA	**97**	Ovins
rEg95	Protéine de la glande de pénétration oncosphérique	QuilA	**87-100**	Bovins
rEgG1Y162	Nouvelle protéine sécrétée	rBCG	**75**	Souris
rEg 14-3-3	14-3-3-Protein	Freund's c/i	**85**	Souris
rEgGST	Recombinant glutathion S-transférase	Freund's c/i	**89**	Souris
Epitopes des cellules multi-T	Protéines (EgGST, EgA31, Eg95, EgTrp et P14-3-3)	Freund's c/i	**99**	Souris
rEg-P29	Antigène de diagnostic du métacestode	Freund's c/i	**96**	-

Le vaccin EG 95 s'est révélé d'une efficacité remarquable chez les moutons, assurant une protection presque totale (96-100%) et pouvant persister plus d'un an après la vaccination. Trois ans après l'introduction du vaccin EG95 dans un programme de contrôle de la maladie dans la province de Rio Negro en Argentine, les résultats ont bien montré que la prévalence chez les ovins a diminué de 26,2 à 7,8% (Larrieu et al., 2013).

4.3.2.4 Vaccination de l'hôte définitif

Comparées aux avancées majeures de la vaccination des hôtes intermédiaires contre *Echinococcus granulosus,* les tentatives de vaccination des hôtes définitifs canidés n'ont pas encore atteint un niveau de succès similaire. Néanmoins, une série d'expériences visant à induire l'immunité chez les chiens par vaccination ont été menées, et a donné des résultats encourageants (Zhang et al., 2003). Cependant le travail fait par (Zhang et al., 2006a) a fourni une preuve que la vaccination de l'hôte canin est réalisable. La période prépatente dans les infections à *Echinococcus granulosus* chez le chien est d'environ de 40 jours ; la vaccination avec des antigènes solubles du protoscolex et des protéines recombinantes peut induire une inhibition totale de la production d'œufs ou une embryogenèse retardée. Parce que les vers peuvent survivre dans l'intestin du chien jusqu'à 2 ans, la production d'œufs retardée ou réduite peut être suffisante pour réduire la transmission dans les zones où le parasite est endémique. Ils ont pu montrer que les antigènes directement impliqués dans la protection peuvent être produits sous forme recombinante pour une application à grande échelle, soit seuls, soit en combinaison avec des complexes immunostimulants ou des *Salmonella typhimurium* vivants atténués (Turner et al., 1933; Zhang et al., 2006a).

EgM123 et EgM9 mélangés à l'adjuvant QuilA ont entraîné un niveau d'immunogénicité similaire à ces protéines émulsifiées avec les adjuvants de Freund, et ont induit des niveaux similaires d'efficacité protectrice chez les chiens contre l'infection expérimentale à *Echinococcus granulosus* dans une étude récente faite par (Zhang et al., 2018) (figure 11). D'après la figure 11, on constate que la protection induite par les deux vaccins reste supérieure aux témoins vaccinés par le PBS ; le nombre des œufs excrétés chez les sujets vaccinés à l'EgM9 ou à l'EgM123 ne dépassait pas 1 œuf par gramme de matière fécale, et ce n'est qu'à partir du 135e jour post-infection (Zhang et al., 2018). Ces résultats renforcent la pertinence d'EgM123 et d'EgM9 en tant que vaccins candidats contre *Echinococcus granulosus* chez le chien. Mais, l'application de ces vaccins dans les conditions de terrain surtout dans les régions épidémiques à l'échinococcose kystique comme le cas du Maroc, semble être difficile et

limitée, car, la population canine est très variable (difficulté de gérer les chiens errants et les chiens à propriétaires) (El Berbri et al., 2015a), en plus des canidés sauvages (loups, renards, chacal) qui vivent en pleines forêts et montagnes dans des zones très accidentés (Maghnouj, 1999; Moliner et al., 2016).

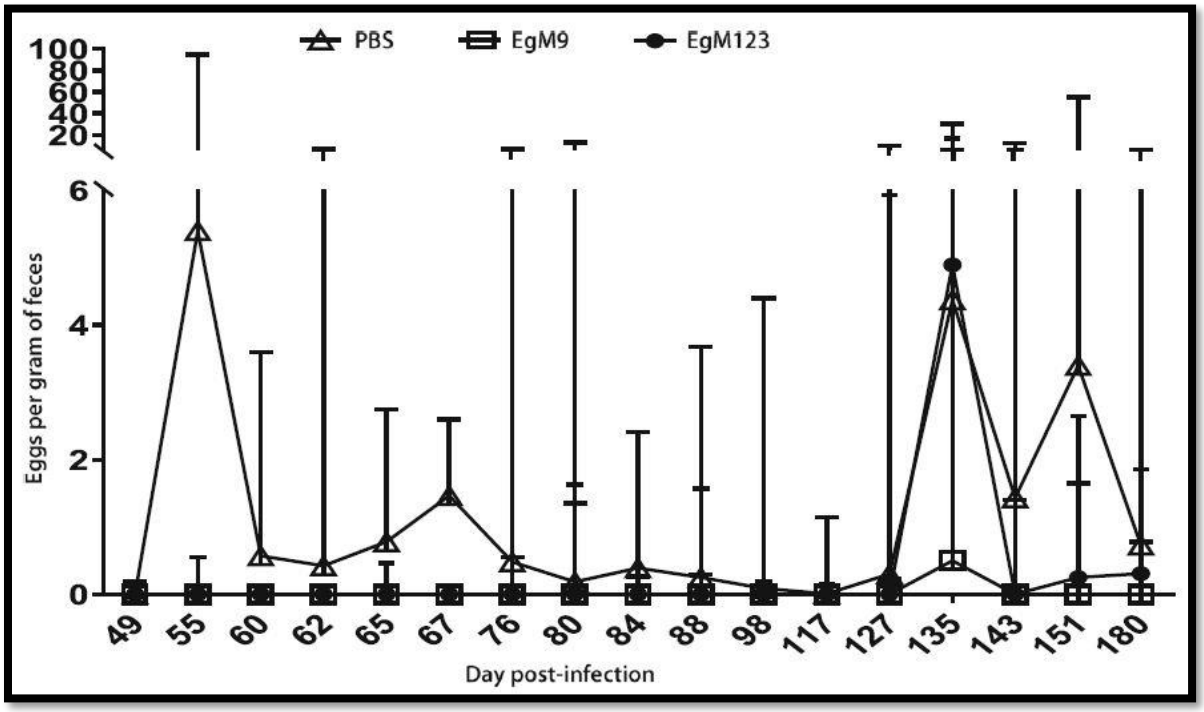


Figure 11. Évolution dans le temps de l'excrétion des œufs par gramme *d'Echinococcus granulosus* dans les fèces de chiens vaccinés avec EgM9 et EgM123 par rapport au PBS (chiens témoins) (Zhang et al., 2018)

CHAPITRE V : PROGRAMMES DE LUTTE CONTRE L'HYDATIDOSE AU MAROC ET DANS LE MONDE

5.1 Situation dans le monde : différents moyens suivis dans des programmes de lutte contre l'hydatidose

Plusieurs pays ont instauré des programmes de contrôle contre l'hydatidose. Théoriquement, la maladie peut être facilement contrôlée si toutes les parties prenantes et les autorités résponsables s'impliquent rigoureusement dans le programme de lutte (Gemmell, 1991). Le premier programme de lutte contre l'hydatidose a été instauré en 1863 en Islande. Par la suite, plusieurs programmes ont succédé dans plusieurs pays endémiques du monde et dont l'objectif a été de réduire ou même éradiquer cette maladie (Craig and Larrieu, 2006). Mais seulement deux pays, le Chili et l'Argentine, ont réussi à réduire la maladie par rapport aux autres pays du monde et ce ne sont que les îles qui ont pu réussir à bien contrôler ou éradiquer cette zoonose à savoir l'Islande, la Nouvelle-Zélande, la Tasmanie, les Iles Malouines et Chypre (Craig and Larrieu, 2006; Larrieu and Zanini, 2012).

5.1.1 Modèles de programmes de luttes contre l'hydatidose en Amérique du Sud

5.1.1.1 Argentine

- Province de Neuquén

Un programme de lutte a été inauguré en 1970. Le programme a été intitié dans le petit département de Huiliches en déparasitant les chiens par le bromhydrate d'arécoline tous les 45 jours. Les activités ont été étendues par la suite à l'ensemble de la province, et consistaient plutôt en l'utilisation du praziquantel (Larrieu and Zanini, 2012). Des études de survéillance épidémiologique ont montré qu'après 34 ans d'intervention, ce programme a réussi à réduire le taux de transmission à l'Homme, mais pas au niveau des régions fortement infectés. Donc, il a été conclu que les mesures de contrôles mise en œuvre dans ce programme n'ont pas été éfficaces pour une amélioration durable de la situation épidémiologique de la maladie (Pierangeli et al., 2007).

- Terre de Feu

En 1976 un programme de lutte à vue le jour au niveau de cette région. Ce programme été basé sur la vermufigation des chiens avec du praziquantel (5 mg/kg) tous les six mois, la

sensibilisation de la population, l'épidémiosurveillance de la population canine et ovine et la gestion des abattoirs et les élevages pour réduire la réinfection du chiens (Zanini et al., 2006).

Entre 1997 et 1999 des investigations ont permis de déterminer une réduction de la prévalence d'infection chez les ovins de 1,1 % (versus 55 % déterminée en 1976). Autres investigations ont été entrepris chez l'Homme via des enquêtes échographiques entre 1997 et 2006 et ont révélé chez des personnes adultes et des enfants âgés de 4 à 17 ans, des prévalences respectives de 0,9 % et de 0,0 % (versus 38,2 % et 50,8 % en 1976). Ce programme a montré une éfficacité dans la réduction de la prévalence observés chez l'Homme et l'animal en environ 30 ans (Zanini *et al.*, 2006, 2009; Larrieu and Zanini, 2012).

- Rio Negro

Le programme de contrôle de l'échinococcose kystique a été lancé dans la province de Río Negro en 1980. Tous les chiens à propriétaires ont été enregistrés et traités avec du praziquantel (5 mg/kg) tous les 60 jours dans les zones rurales et tous les 180 jours dans les zones urbaines. De plus, une loi provinciale a été adoptée en 1994, exigeant l'enregistrement de tous les chiens et établissant un engagement pour chacun de leurs propriétaires d'en empêcher la réinfection (Larrieu et al., 2000). En 2008, des enquêtes échographiques chez des enfants de 6 à 14 ans ont montré que la prévalence de l'hydatidose kystique équivalait à 0,3 %. Ainsi, bien que la maladie en Río Negro demeure endémique le programme a réussi à diminuer significativement la prévalence d'infection chez l'Homme (Larrieu and Zanini, 2012).

5.1.1.2 Uruguay

En Uruguay un programme de lutte a été mis en place en 1992. Il a été basé sur la vermufigation des chiens tous les 30 jours. En 1995, le traitement des chiens a été mené dans plus de 90 % du pays. En 1997, la prévalence chez le chien a été réduite à 0,7 % et l'incidence nationale chez l'Homme a chuté à 6,5 cas/100 000 habitants. À ce stade, le modèle uruguayen semblait sur la bonne voie pour éradiquer l'hydatidose dans le pays en cinq ans. En 2006-2007, des changements politiques ont donné lieu à des changements structurels : introduction de nouveaux systèmes de surveillance ainsi que de nouvelles initiatives comme la castration pour le contrôle de la population canine. Les résultats de ces changements sur les prévalences de la l'"échinococcose kystique ne sont pas encore publiés (Larrieu and Zanini, 2012).

5.1.1.3 Brésil

Un programme de lutte a été instauré à Santana do Livramento, qui s'est basé sur un traitement mensuel des chiens durant huit mois avec du praziquantel. Les résultats montrent que la prévelence de l'infection chez les chiens a été réduite de 28 % à 0 %. Mais quatre mois après l'arrêt du traitement, la prévalence d'infection était de 36,8 %. Ce programme basé uniquement sur le traitement des chiens avait réussi à réduire l'infection mais d'une façon temporaire. Ce projet a échoué sensibiliser la population rurale à l'importance du traitement des chiens et à l'intérêt d'établir un programme de contrôle à long terme de cette municipalité. La situation endémique à l'hydatidose est toujours maintenue au Brésil (Farias et al., 2004; De La Rue, 2008; Larrieu and Zanini, 2012).

5.1.1.4 Pérou

En 1974, le Ministère de la Santé a lancé un programme de contrôle de l'hydatidose kystique dans le Sierra centrale du Pérou. Les actions entreprises consistaient essentiellement en l'utilisation du bromhydrate d'arécoline chez le chien. De 1974 à 1978, le taux d'infection chez le chien a en effet diminué, cependant le territoire est tombé sous l'emprise de la guérilla et le programme a dû être interrompu. Depuis, il n'a pas eu d'autres tentatives entreprises pour lutter contre la maladie dans le pays. Les études les plus récentes ont révélé des prévalences élevées aussi bien chez l'Homme que chez les ovins (Larrieu and Zanini, 2012).

5.1.1.5 Chili

Au Chili un programme de contrôle contre l'hydatidose a été lancé en 1982. Ce programme national n'a concerné que deux régions du pays. Les actions entreprises ont consisté en un déparasitage des chiens avec le praziquantel huit fois par an pendant 15 ans, avec une couverture de plus de 90 % (Larrieu and Zanini, 2012). En 1991, l'infection par *E. granulosus* a diminué chez l'Homme à 11,8 et à 20 pour 100 000 habitants (versus 38 et 80 pour 100 000 habitants en 1982), et chez le chien à 1,6 % et à 5 % (versus 31 % et 71 % en 1982) dans les deux régions concernées par le programme. En 1998, le programme s'est décentralisé vers différentes régions du Chili. Ceci a été au détriment de la couverture. Ainsi, actuellement le déparasitage est volontaire et mené par les propriétaires des chiens. Par conséquent, une étude récente se basant sur le diagnostic par coproantigènes a révélé une prévalence chez le chien de 48,2 % (Alvarez, 2005; Larrieu and Zanini, 2012).

5.1.2 Modèle de programmes de luttes contre l'hydatidose en Amérique du Nord : Utah (États-Unis d'Amérique)

L'Utah est un Etat situé à l'Ouest des Etats-Unis. Elle a connu les plus nombreux cas autochtones de l'hydatidose humaine, signalés au Etats-Unis (Condie et al., 1981). Un programme de contrôle de la maladie hydatique dans le centre de l'Utah, à savoir le comté de Sanpete, a été initié en 1971. Le programme a concerné l'éducation sanitaire de la population (communiqués de presse, distribution de brochures, distribution au niveau des écoles de bandes de pellicules et de livres de coloriage pour les enfants, etc.), le traitement des chiens avec du chlorhydrate de bunamidine (1974 - 1978) et ensuite avec du praziquantel (1979 - 1981), la surveillance de l'infection chez le chien, les ovins ainsi que l'Homme, et communication des résultats dans les journaux locaux. Mais malgré tout les efforts fournis dans ce programme, ce dernier n'a pas réussi à réduire la transmission du parasite à l'Homme (Andersen et al., 1983).

5.1.3 Modèles de programmes de luttes contre l'hydatidose dans les iles

5.1.3.1 Iles Malouines

En 1965, un programme de contrôle de l'hydatidose a été mis en place aux Iles Malouines. Il s'est basé d'abord sur la purgation des chiens avec l'arécoline et depuis 1970, le traitement des chiens toutes les 12 semaines avec le chlorhydrate de bunamidine. Ce dernier a été remplacé en 1977 par le traitement au praziquantel toutes 6 semaines. En parallèle, l'amélioration des abattoirs en assurant l'interdiction d'accès aux chiens et la destruction totale des abats contaminés a été mise en place. En 1993, la prévalence de l'hydatidose chez les ovins a été réduite à 0,16 %. Chez le chien, le test ELISA-coproantigènes, a révélé un taux d'infection de 1,7 %. Et le dernier cas humain a été rapporté en 1992. Pour maintenir cette situation de contrôle de la transmission du parasite, une épidémiosurveillance de la population canine a été entreprise par l'introduction d'un système national d'enregistrement des cheins, l'application périodique de test de coproantigène chez la population canine, le maintien du traitement des chiens au praziquantel toutes les six semaines et la destruction des abats contaminés. L'évaluation de ce programme par des investigations en 2010, ont montré la présence d'un seul cas positif chez un ovin âgé de 7 ans porteur d*'E. granulosus*, et 0,004 % chiens positifs au test coproantigènes (Macpherson et al., 2013).

5.1.3.2 Nouvelle Zélande

Un programme de lutte a été introduit en Nouvelle-Zélande en 1959 (Macpherson et al., 2013). Ce programme a été basé sur l'application de certaines mesures obligatoires imposées par la loi de 1959 (Larrieu and Zanini, 2012; Macpherson et al., 2013), comme l'obligation des propriétaires des chiens (en ville ou en compagne) de traiter leurs chiens toutes les six semaines, le contrôles de la population canine par la réattribution des chiens sans popriétaire à des nouveaux propriétaires ou parfois l'euthanasie de ces chiens, l'exigence de paiement de taxe à des propriétaires qui ont laissé leurs chiens en liberté, la réglementation de l'abattage à domicile avec interdiction de nourrir les chiens avec les abats crus (cuisson obligatoire) et surveillance rigoureuse au niveau des abattoirs en interdisant l'accès des chiens (Davidson, 2002). Ces mesures ont été combinées à une sensibilisation de la population mais surtout des propriétaires de chiens. Les ministères de l'agriculture et de la santé ont organisé tout d'abord des formations en rapport avec l'éducation pour des comités de contrôle constitués par des agriculteurs volontaires. Ceci a donné lieu par la suite à l'établissement d'une association nationale de l'hydatidose constituée par des représentants d'agriculteurs, de propriétaires des chiens, de l'association des vétérinaires, de collectivités locales et des ministères de l'agriculture et de la santé. Cette association était chargée de l'élaboration de mesures pour éradiquer la maladie, de diffuser les informations, les instructions et les conseils, ainsi que de l'organisation de la surveillance de l'infection des chiens et du bétail (Belkourati, 2010). Ce programme avait réussi à réduire l'incidence de l'hydatidose chez l'Homme mais également chez le bétail. En 2002, la Nouvelle-Zélande a été déclarée indemne de l'hydatidose (Craig and Larrieu, 2006).

5.1.3.3 Tasmanie

En 1964 un programme de lutte a été lancé en Tasmanie (Macpherson et al., 2013). Il a consisté a traiter les chiens à propriétaires toutes les six semaines, a sensibiliser la population à l'importance du traitement des chiens et à l'éducation sanitaire, a contrôler la population canine par un système d'enrgistrement obligatoire de tous les chiens y compris les chiens errants qui ont été soit réattribués à un maître, soit euthanasiés, a exiger le paiement de taxe par les propriétaires dont les chiens ont été trouvés en liberté, a enregistrer les nouveau cas humains, a appliquer une surveillance rigoureuse au niveau des battoirs en appliquant un système de traçabilité remontant aux élevages, a contrôler les déplacements des animaux et a exiger la mise en quarantaine des fermes atteintes. La Tasmanie a été déclaré indemne d'*E.granulosus* après une lutte rigoureuse qui a duré plus de 30 ans (Jenkins, 2004).

5.1.3.4 Islande

Les manifestations de contrôle de la maladie ont commencé progressivement dès 1864 (Beard, 1973). Le dernier cas humain opéré pour l'hydatidose kystique dans l'île, date de 1988, et depuis 1979 la maladie n'a été observée chez aucun animal (Sigurdarson, 2010). La campagne de contrôle de la maladie hydatique en Islande a duré plus d'un siècle, et elle s'est basée essentiellement sur ce qui suit (Sigurdarson, 2010; Macpherson et al., 2013) :

- une éducation sanitaire intense de la population pendant plus de 26 ans. Ceci a été facilité par le fait que la plupart des gens en Islande avaient perdu soit des parents ou des amis à cause de la maladie. Ainsi, une forte mobilisation de la population a été aisée ;

- la réduction de la population canine grâce à l'application de taxes sur tous les chiens, et d'autres plus élevées sur les chiens non nécessaires, ainsi qu'à l'interdiction de posséder un chien sans autorisation,

- un système d'enregistrement obligatoire des chiens,

- la nécessité d'empêcher l'accès du chien aux abats non cuits, et de brûler tous les organes infectés,

- le traitement anthelminthique annuel de tous les chiens après la saison d'abattage,

- l'interdiction de l'abattage à domicile,

- la réduction de l'âge d'abattage des ovins de 4-5 ans à 4-5 mois (un âge où les kystes ne sont pas encore fertiles) car l'élevage des brebis a été abandonné, déjà plus de 80 % des moutons abattus depuis 1920 environ étaient des agneaux de 5 mois,

Du reste, de nombreux facteurs propres à l'Islande, ont contribué amplement à la réussite du programme de lutte, notamment la faible population humaine, le taux élevé d'alphabétisation ainsi que la courte saison d'abattage des ovins (6 à 7 semaines par an) (Burridge and Schwabe, 1977).

5.1.4 Modèles de programmes de lutte contre l'hydatidose en Europe

5.1.4.1 Chypre

En 1971 un programme national a vu le jour en république de Chypre (Ripoche, 2009; Macpherson et al., 2013). Ce programme vise l'abattage massif des chiens errants (92 000 chiens abattus entre 1971 et 1990), enregistrement des chiens à propriétaires, encouragement à la stérilisation des chiènnes en baissant les prix d'enregistrement pour les femelles stérilisées, purgation obligatoire avec de l'arécoline tous les trois mois des chiens à propriétaires, et euthanasie des chiens positifs à *E.granulosus* après test coprologique, éducation saniatires de la population (porte-à-porte) et amélioration de l'infrastructure des abattoirs. Après la division de Chypre en 1974, le programme le programme ne s'est poursuivi qu'au niveau du Sud de l'île. En 1985, le programme a pris fin officiellement et le Sud de l'île a été considéré comme indemne d'*E. granulosus* aussi bien chez le chien que chez les animaux d'élevage. Toutefois, une surveillance menée entre 1985 et 1993, a démontré que le cycle de vie du parasite se poursuivait à des niveaux très bas (Economides and Christofi, 2000). Pour prévenir la réémergence de l'hydatidose, un programme de lutte a été réintroduit en 1993. Ce programme été basé sur le traitement des chiens avec du praziquantel 2 à 3 fois par an, l'élimination des chiens errants, avec utilisation régulière d'appâts de praziquantel dans les zones adjacentes à celles atteintes, la poursuite judiciaire des gens pratiquant l'abattage illégal, la mise en quarentaine des élvages atteints et le contrôle des mouvements des animaux issus des zones non contrôlée (Economides and Christofi, 2000; Macpherson et al., 2013).

Des investigations réalisées entre 1994 et 1999 visant à déterminer des prévalences de l'hydatidose enregistrées au niveau des abattoirs de la zone Sud de l'île, a révélé que la maladie a été contrôlée et que le taux d'infection a considérablement diminué chez toutes les espèces, à savoir respectivement de 1994 à 1999, de 0,088 à 0,011 % chez les bovins, de 0,033 à 0,007 % chez les ovins et de 0,0112 à 0,0006 % chez les caprins (Economides and Christofi, 2000). En 2004, pour un total de 172 022 ovins, 110 372 caprins, 16 667 bovins et 82 199 porcins abattus, seul un ovin était infesté par *E. granulosus* (Dakkak, 2010). Dans la zone Nord de l'île, les cas enregistrés dans les abattoirs, ont révélé, de 1990 à 1998, une augmentation des prévalences de la maladie de 34,6 à 47,4 % chez les bovins et de 40 à 60,6 % chez les ovins (Economides et Christof, 2000). En 2004, ces taux ont diminué à 6,61 % et à 1,5 % respectivement (Dakkak, 2010). Malgré ce programme réussi dans le sud du Chypre, la réémergence de la maladie est toujours possible à cause des déplacements des animaux entre les le Nord (zone non controlée) et le Sud du chypre (zone controlée).

5.1.4.2 Sardaigne (Italie)

Depuis 1955 un programme de lutte contre l'hydatidose a été entrepris en Italie. Cinq ans plus tard, la Sardaigne a enregistré le taux d'infection humaine et animale le plus élevée dans le pays. Il en résulte une succession de trois plans de lutte (Castiglia et al., 2004; Scala, Varcasia and Garippa, 2004). Le premier plan de lutte a été appliqué entre 1956 et 1960, et a consisté en une purgation par arécoline semetrielle obligatoire et gratuite des chiens, une lutte contre les chiens errants (euthanasie), une éducation sanitaire de la population, et déclaration obligatoire des cas humains atteint par l'hydatidose. Ce programme a été arrêté en 1967 ce qui a contribué à l'echec de ce programme (Ripoche, 2009). Le second programme de lutte a été établi entre 1978 et 1981. Ce programme se base essentiellement sur le traitement obligatoire des chiens avec du praziquantel. Mais ce programme aussi a été interompu en 1981, vu que le budget dédié à ce programme a été utilisé pour la lutte contre la peste porcine africaine (Ripoche, 2009). Le troisième programme de lutte a été réalisé entre 1978 et 1981. Ce programme a visé la sensibilisation de la population avec un focus sur les enfants, implication des médias dans compagne de sensibilisation, l'enregistrement des chiens à propriétaires et l'euthanasie des chiens errants, le contôle rigoureux au niveau des abattoirs, la prise en charge de la destruction des cadavres d'animaux au niveau des fermes ou prairie et l'amélioration de la coordination erntre les parties prenantes (Castiglia *et al.*, 2004; Scala et al., 2004; Ripoche, 2009). Malgré les efforts déployés, les résultats obtenus n'ont pas été différents de ceux des deux programmes de lutte précedents (Scala et al., 2004). Car le programme n'a jamais continué dans le temps (Ripoche, 2009).

5.1.4.3 Rioja (Espagne)

Un programme de lutte contre l'hydatidose a été instauré entre 1984 et 1987 à Rioja au Nord de l'Espagne, suite à une augmentation du nombre annuel des cas chirurgicaux du kyste hydatique humain à 19 pour 100 000 habitants (Jimenez et al., 2002). Ce programme de lutte a visé essentiellement l'éducation sanitaire de la population, traitement des chiens au praziquantel tous les 45 jours (8 fois/an), l'euthanasie des chiens errants et le renouvellement des infrastructures des abattoirs avec destruction totale des abats contaminés (Jimenez et al., 2002; Macpherson et al., 2013). Toutes ces mesures ont permis de réduire la prévalence d'infection chez le chien de 7 % à 0.2 % en 2000 (réduction de 97,2 %). La prévalence chez les ovins adultes a diminué de 82,3 à 20,3 %, (réduction de 75,4 %), tandis que le nombre moyen de kystes par animal infecté a diminué de 6,5 à 0,58 %, (réduction de 91 %). L'incidence de

nouveaux cas chirurgicaux chez l'Homme a chuté de 78,9 % suite à l'instauration du programme de contrôle, passant de 19 à 4 pour 100 000 habitants (Jimenez et al., 2002).

5.1.4.4 Pays de Galles (Royaume Uni)

Une enquête a été menée de 1974 1983, dans certaines parties du pays de galles et le long de la frontière anglaise, avait montré une indence des cas chirurgicaux de l'hydatidose humaine de 0,2 et de 2 cas par million d'habitants avec le plus haut taux, 5,6 cas par million d'habitants observé dans le Sud du comté de Powys. Afin de réduire cette incidence, un programme de lutté a été introduit entre 1983 et 1989 et qui a visé le traitement des chiens avec du praziquantel toutes les six semaines (Buishi et al., 2005). Cette mesure a induit une diminution du taux de l'infection des ovins de 23,5 % à 10,5 %. Ce programme a été arrêté en 1989 et remplacé par un autre programme basé sur la sensibilisation de la population. Jusqu'à 1993, l'admission d'enfants (<15 ans) pour motif d'hydatidose kystique clinique a cessé au niveau des hôpitaux de la zone en question. Cependant, un nouveau foyer de la maladie humaine a été identifié dans une zone adjacente à la précédente durant la période 1984-1990 (Palmer et al., 1996). En effet, un suivi au niveau des abattoirs et des enquêtes (coproantigènes) chez le chien entre 1995 et 1996, ont révélé que l'infection par *E. granulosus* avait refait surface chez les ovins et chez le chien dans la zone d'intervention. Une observation confirmée, en 2002, suite à une large enquête chez le chien, qui a révélé un taux d'infection de 8,1 % au niveau du pays de Galles. Ce taux comparé à celui obtenu en 1993, de 3,4 %, laisse supposer une augmentation éventuelle du risque de la transmission du parasite à l'Homme (Buishi et al., 2005).

5.1.5 Modèles de programmes de lutte contre l'hydatidose en Afrique

Turkana situé en Nord-ouest du Kenya représente l'une des zones les plus endémique à l'hydatidose dans le monde avec de prévalence très élevée observées chez l'Homme et l'animal. En 1983, un programme de contrôle a été implanté par la Fondation Africaine de Médecine et de Recherche (AMFR) (Macpherson et al., 2013). Le programme été basé sur la sensibilisation et l'éducation de la population humaine, le traitement des chiens toutes les six semaines avec du praziquantel, la surveillance annuelle de masse par des enquêtes séro-épidémiologiques et par échographie abdominale chez les humains, l'euthanasie des chiens errants et les compagnes de stérilisation des chiennes (Macpherson and Wachira, 1997). Ce programme a durée 10 ans et il a aboutit à une réduction de la prévalence de l'infection à 50 % (Macpherson and Wachira, 1997). Mais, il n'a pas réussi a érradiqué cette maladie.

Les principales approches de lutte contre l'hydatidose qui ont été adoptées par différents programmes de contrôle sont synthétisées dans le tableau 7 (El Berbri, 2015) :

Tableau 7. Principaux moyens de luttes utilisés par différents programmes de lutte contre l'hydatidose dans différents pays (El Berbri, 2015).

Pays	***Région du programme***	**Moyen de lutte**	**Animaux ciblés par le programme**	**Résultats**	**Durée**	**Référence**
Argentine	*Province de Neuquén*	Arécoline, praziquantel (45 j)	Chiens	Echec	1970-2004 (34 ans)	Pierangeli et al., 2007
Argentine	*Terre de Feu*	Praziquantel (6 mois), éducation sanitaire	Chien et ovin	Diminution des prévalences	1976-2006 (30 ans)	Zanini et al., 2006
Argentine	*Rio Negro*	Praziquantel (60 j), enregistrement des chiens	Chien à propriétaire et ovin	Diminution des prévalences	1980-1997 (28 ans)	Larrieu et al., 2000
Uruguay	*Uruguay*	Praziquantel (30 j), stérilisation des chiennes	Chien	Diminution des prévalences	Depuis 1992	Larrieu et Zanini, 2012
Brésil	*Brésil (Livramento)*	Praziquantel (30 j)	Chien	Echec	1983 (8 mois)	Farias et al., 2004
Pérou	*Pérou (Sierra centrale)*	Arécoline	Chien	Echec	1974-1978 (4 ans)	Larrieu et Zanini, 2012
Chili	*Chili (régions XI et XII)*	Praziquantel (8 fois/ans)	Chien à propriétaire	Diminution des prévalences	1982-1997 (15 ans)	Larrieu et Zanini, 2012
Royaume-Uni	*Iles Malouines*	Praziquantel (6 semaines), enregistrement des chiens, législation, contrôle au niveau des abattoirs	Chien	Contrôle	1965-2010	Ripoche, 2009
Nouvelle-Zélande	*Nouvelle-Zélande*	Praziquantel (6 semaines), enregistrement des chiens, euthanasie des chiens errants, législation rigoureuse, surveillance au niveau des abattoirs avec un système de traçabilité, éducation sanitaire	Chien	Eradication	1959-1997 (38 ans)	Macpherson et al., 2013
Australie	*Tasmanie*	Praziquantel (6 semaines), législation	Chien à propriétaire	Eradication	1965-1996 (31 ans)	Ripoche, 2009

		rigoureuse, surveillance au niveau des abattoirs avec un système de traçabilité, éducation sanitaire, contrôle des mouvements des animaux				
Islande	*Islande*	Education sanitaire, traitement anthelminthique des chiens, réduction de l'âge d'abattage des ovins	Chien et ovin	Eradication	1863-1960 (97 ans)	Bread, 1973
Chypre	*Chypre*	Education sanitaire, praziquantel (2 à 3 fois/an), amélioration de l'infrastructure des abattoirs, contrôle des mouvements des animaux, stérilisation des chiennes	Chien à propriétaire	Contrôle	1971-1985 (14 ans)	Ripoche, 2009
Espagne	*La Rioja*	Education sanitaire, Praziquantel (45 j), amélioration de l'infrastructure des abattoirs	Chien à propriétaire et chien errant	Diminution des prévalences	1984-2000 (16 ans)	Jimenez et al., 2002
Royaume Uni	*Pays de Galles (Powys)*	Praziquantel (6 semaines), éducation sanitaire	Chien	Echec	1983-1993 (10 ans)	Palmer et al., 1996
Italie	*Sardaigne*	Education sanitaire, arécoline, praziquantel, amélioration de l'infrastructure des abattoirs, lutte contre les chiens errants	Chien à propriétaire et chien errant	Echec	1955-1993 (38 ans)	Ripoche, 2009
État-Unis	*Utah*	Education sanitaire, praziquantel	Chien	Echec	1971-1981 (10 ans)	Andersen et al., 1983
Kenya	*Turkana*	Education sanitaire, praziquantel (6 semaines), abattage des chiens errants, stérilisation des chiennes	Chien à propriétaire et chien errant	Echec	Depuis 1983	Macpherson et al., 2013

5.2 Impact de la lutte contre l'hydatidose/échinococcose

Généralement les avantages des programmes de contrôle peuvent être aussi bien d'ordre financier que non financier. Les bénéfices que pourraient procurer un programme de contrôle de l'hydatidose kystique, sont essentiellement (Battelli, 2004) :

- Une augmentation de la production animale,
- Une augmentation du nombre de jours de travail par an et par personne,
- Une diminution des coûts d'hospitalisation, de diagnostic et de traitement,
- Une amélioration des services vétérinaires et de santé publique, ainsi que d'hygiène,
- Une amélioration du statut physique, physiologique et social de la population,
- Une diminution d'autres problèmes de santé ou de zoo-économie tels que la rage et la leishmaniose viscérale (à travers le contrôle de la population canine), les infections d'origine alimentaire, les infections par les autres cestodes larvaires chez les animaux de l'élevage, etc.

5.3 Situation au Maroc avant l'apparition du programme de lutte

5.3.1 Facteurs de risque et de persistance de l'Hydatidose au Maroc

5.3.1.1 Etats des abattoirs

Quatre-vingt pourcent de la totalité des abattoirs sont situés dans les agglomérations. Alors que les abattoirs doivent être distants de plus de 500 m des agglomérations (selon la loi Marocaine), et environ 38% des abattoirs ruraux étaient situés en dehors des agglomérations avec une distance moyenne entre une tuerie et le service vétérinaire le plus proche de 64 Km (El Mansouri et al., 2015).

5.3.1.2 Abattoirs municipaux

La plupart des abattoirs municipaux sont anciens. Seuls 15 de ces abattoirs ont moins de 15 ans (schéma directeur des abattoirs 1986) et nécessitent des aménagements pour la séparation entre le secteur propre et le secteur souillé, et pour la destruction et le traitement systématique et efficace des saisies et des déchets rejetés. Les abattoirs municipaux sont équipés soit en postes fixes d'abattage soit de chaînes d'abattage (trois unités seulement sont équipées de chaine d'abattage) (Touimi, 2005).

Cependant la capacité potentielle des abattoirs municipaux dépasse largement le volume réel traité actuellement. Cette sous-utilisation est liée essentiellement à la concurrence des

abattoirs ruraux se trouvant dans les mêmes zones d'action et fonctionnant souvent plusieurs jours par semaine.

5.3.1.3 Abattoirs ruraux

Selon TOUIMI, l'âge moyen des abattoirs ruraux est de plus de 20 ans et le choix d'emplacement est déterminé par le souk préexistant (Touimi, 2005).

Environ 38% sont situés hors agglomération. 58 % sont déjà inclus et les autres 4% seront inclus dans les agglomérations vue la vitesse d'extension des villes.

Les tueries sont toutes construites en dur, 45% seulement sont couvertes, la superficie moyenne est de 120 m^2.

Ce type d'abattoir est d'une conception très sommaire (aire d'abattage) avec un équipement très rudimentaire et insuffisant pour interdire l'accès des chiens à l'intérieur et donc représentant ainsi un impact négatif direct sur les conditions hygiéniques de leur fonctionnement. 38% des tueries ne sont pas doté d'un système d'évacuation des déchets (Touimi, 2005)

5.3.1.4 Gestion des déchets et saisies

Les moyens utilisés pour la dénaturation des saisies au niveau des abattoirs sont principalement, l'application de produits dénaturants, l'incinération, la destruction ou la combinaison de ces moyens. La fréquence d'usage de ces moyens et leur nature diffère entre les abattoirs ruraux et urbains. Les saisies ne sont pas dénaturées dans 20% des abattoirs ruraux et 11 % des abattoirs urbains (Touimi, 2005). Les moyens les plus utilisés sont l'application des produits dénaturants (29% des abattoirs en zone rurale et 46 % en zone urbaine) (Touimi, 2005). Les saisies recueillies, dénaturées ou non dénaturées, sont déposées à l'aire libre dans 42% des abattoirs ruraux et 22% des abattoirs urbains (Touimi, 2005). Par contre, elles sont envoyées à la décharge publique dans 15 et 36% respectivement pour les ruraux et les urbains. L'incinération est le moyen le moins utilisé (Touimi, 2005).

Le danger majeur est le risque d'infection du chien par l'agent hydatique *(Echinococcus granulosus).* Ce danger est important quand les saisies ne sont pas dénaturées, encore plus quand celles-ci sont rejetées à l'air libre à la portée des chiens errants, car 9% des abattoirs urbains et 28% des ruraux déposent leurs saisies à l'aire libre ou dans la décharge publique sans

dénaturation préalable. L'absence des moyens assurant une dénaturation efficace et permanente des abats saisis ferait des abattoirs des foyers à risque certains pour l'hydatidose (Touimi, 2005).

5.3.2 Description du programme

Dans le cadre des actions nationales de lutte contre les maladies et grâce au soutien de l'organisation mondiale de la santé , un premier guide d'information et de directives sur la lutte contre l'hydatidose /échinococcose au Maroc a été établi en 2007, constituant ainsi un véritable instrument de travail pour la structuration et la mise en place d'une stratégie nationale de lutte (DMT/DELM, 2007). En effet, ce programme se base sur une nouvelle approche qui s'est développée, dénommée « One Health » (une seule santé), visant à renforcer les liens entre la santé humaine, la santé animale et la gestion de l'environnement. La mise en œuvre d'une collaboration entre les différents secteurs et disciplines, aussi bien au niveau local et national qu'à l'échelle internationale, devrait permettre d'obtenir une santé optimale pour les populations, les animaux et l'environnement.

D'ailleurs, au Maroc, l'approche « One Health » est devenue le concept clef dans la recherche, le renforcement des capacités et les consortiums transnationaux, tels que les projets de recherche financés par l'union européenne : Lutte Intégrée Contre des Zoonoses Négligées (ICONZ) et la formation « One Health-Prochaine Génération » (OH-NEXTGEN), ainsi que le consortium Afrique One financé par la fondation Wellcome Trust (Zinsstag et al., 2015).

En effet, d'après les responsables de la direction de l'Epidémiologie et de Lutte contre les Maladies, de la Planification et de l'Equipement, et de l'Elevage, l'intervention médicales pour lutter contre les maladies transmises par des vecteurs ou des hôtes intermédiaires, n'est pas suffisante pour interrompre leur cycle de transmission. Les autres déterminants non sanitaires de la maladie doivent également être maîtrisés. Ceci implique la mise en place de nouvelles stratégies par de différents départements en combinant l'ensemble des interventions. Ainsi on agit à la fois sur la maladie et sur les vecteurs et les hôtes intermédiaires qui entretiennent l'endémie.

L'incidence des cas de kyste hydatique opérés chaque année était de 5,6 cas pour 100.000 habitants en (2004) dans tout le pays, d'où la fixation d'un objectif national à atteindre pour l'horizon 2015 concernant la réduction de moitié le taux d'incidence de l'hydatidose/échinococcose humaine soit un taux de 2,8 cas pour 100.000 habitants. Cet objectif devait être réajusté au niveau de chaque province compte tenu des caractéristiques

épidémiologiques spécifiques à chacune d'elle, de l'importance que revêt la maladie localement, des facteurs de risques et des ressources disponibles pour la lutte.

5.3.3 Objectifs du programme

5.3.3.1 Les objectifs généraux

L'objectif principal du programme de lutte fixé en 2007, avait deux visions, la première vise à moyen terme de réduire l'incidence de 50% en 2015. Et la deuxième qui vise à long terme la possibilité de contrôler l'hydatidose au niveau national. Malheureusement, cet objectif n'a pas été atteint.

5.3.3.2 Les objectifs spécifiques

Des objectifs spécifiques ont été visés par le programme de lutte et qui consistent au niveau santé humaine à renforcer les activités de dépistage chez l'Homme, et à prendre en charge les cas diagnostiqués positifs à l'hydatidose. Et au niveau service vétérinaire à renforcer la lutte contre les chiens errants et améliorer les conditions d'hygiène des abattoirs.

Toute la population du territoire national a été ciblée par ces objectifs.

5.3.4 Piliers de base du programme

La lutte contre l'hydatidose/échinococcose repose sur trois principaux axes stratégiques :

5.3.4.1 Axe 1 : Application de mesures de prévention pour interrompre le cycle biologique du parasite

Cet axe constitue l'investissement à long terme le plus sûr et le plus rentable. Le contrôle de la maladie passe nécessairement par la stricte application de l'ensemble des mesures de prévention préconisées. Elles sont assurées par les Ministères de l'Agriculture (ONSSA) et de l'Intérieur (Autorités et Collectivités Locales). Ainsi, ces départements assument la charge de la programmation des activités de prévention pour la protection du cheptel ainsi que les activités de lutte contre les chiens errants.

5.3.4.2 Action ciblant les hôtes intermédiaires

- Aménagement des abattoirs selon des normes sanitaires reconnues.
- Amélioration des conditions d'hygiène des lieux d'abattage
- Renforcement du contrôle sanitaire des viandes à l'abattage

- Contrôle plus strict des destructions des saisies infectées

5.3.4.3 Action ciblant l'hôte définitif

Deux actions ont été entretenues :

- Traitement vermifuge des chiens à propriétaire

Le Praziquantel reste le traitement de choix qui peut constituer un moyen efficace et peu coûteux pour rompre le cycle du parasite et par conséquent contrôler rapidement la maladie.

- Lutte contre les chiens errants

Les campagnes périodiques d'abattage des chiens errants doivent être entreprises par les autorités locales de chaque province et préfecture. Malheureusement ceci est insuffisant, il faut ajouter la stérilisation des chiens et la responsabilisation et sensibilisation des propriétaires de chiens. Dans cette optique, le programme national de lutte contre la rage doit être mis à profit pour contrôler en même temps l'hydatidose.

5.3.4.3.1 Actions ciblant l'Homme

L'information, l'éducation et la communication (IEC) reste l'action majeure vis-à-vis la population en général et celle exposée en particulier. Elle vise à long terme le contrôle et la réduction de l'incidence de la maladie au niveau de l'ensemble des hôtes, tout en sensibilisant la population sur la gravité de la maladie des kystes hydatiques, ses causes et les mesures de prévention et de lutte.

L'action IEC doit être plus intense dans les jours qui précèdent l'Aid Al Adha (fête de sacrifice) qui constitue généralement une occasion propice pour la propagation de la maladie (plus de cinq millions de têtes entre ovins et caprins ont été sacrifiés en 2004). Aussi, pendant les périodes de moussems ou de festivités particulières à une région où les rituels d'abattage sont fréquents.

Le public cible de l'action IEC sont de quatre types : les décideurs au niveau des autorités et collectivités locales, les associations et organisations non gouvernementales, les professionnels exposés et la population en général y compris les enfants au niveau des écoles.

Le Ministère de l'éducation nationale doit obligatoirement être associé à la réalisation de cette activité par l'enseignement aux enfants scolarisés de cours spécifiques sur la maladie de l'hydatidose et sur les mesures de prévention à adopter pour se protéger contre l'infection.

5.3.4.3.2 Axe 2 : Dépistage précoce et prise en charge médicale des personnes atteintes de l'hydatidose

Cet axe stratégique concernant les personnes atteintes de kystes hydatiques, fait appel à deux activités majeures : le dépistage précoce des cas et la prise en charge médicale. Il relève exclusivement des services de santé étant donné que l'Homme est un cul de sac pour la transmission.

5.3.4.3.3 Dépistage précoce

Le dépistage peut quelquefois être organisé sous forme d'une campagne ciblée notamment chez les populations exposées vivant dans des zones reconnues comme hautement endémiques.

5.3.4.3.4 Prise en charge médicale des cas de kyste hydatique

Les cas suspects ou confirmés référés à l'hôpital le plus proche sont pris en charge pour être traités. Une fois la maladie confirmée, elle doit également faire l'objet d'une déclaration obligatoire Le responsable des activités de lutte contre les maladies parasitaires au niveau provincial ou préfectoral doit établir à la fin de chaque année, un rapport annuel sur les activités de lutte entreprises dans la province.

5.3.4.3.5 Formation et information du personnel

Pour atteindre les objectifs fixés par le plan d'action de lutte contre le kyste hydatique, il est indispensable de former et d'informer l'ensemble du personnel avec un accent particulier pour ceux des provinces considérées comme hautement endémiques.

5.3.4.3.6 Collecte des données

Pour apprécier la situation épidémiologique de l'Hydatidose/Echinococcose et de son évolution, des supports d'informations sont mis en place. Ainsi, un registre a été mis en place en 2003 pour la consignation des cas humains de kyste hydatique opérés et des registres aux niveaux des services vétérinaires et des abattoirs pour avoir des données sur la santé animale et l'hygiène vétérinaire.

5.3.4.4 Axe 3 : Disponibilité d'un arsenal législatif et réglementaire appropriés

L'existence de textes législatif et réglementaire avec des dispositions régissant certaines des activités de lutte, et leurs applications strictes constituent un instrument primordial de la lutte contre l'Hydatidose/Echinococcose. Les professionnels impliqués dans la lutte contre cette dernière, doivent bien les connaître et veiller à les respecter et à les appliquer.

5.4 Autres actions de lutte

Jusqu'à 2007, les actions entreprises au Maroc pour le contrôle de l'hydatidose restent ponctuelles et très limitées dans l'espace. L'exemple éloquent reste celui des investigations entreprises dans le cadre du projet BAFI/BYU – IAV Hassan II (Benson Agriculture and Food Institue de Brigham Young University, Utah, USA) dans le Moyen Atlas. En effet, depuis le lancement de ce projet en 1999, plusieurs études et actions de terrain, en rapport avec l'Hydatidose/Echinococcose chez l'Homme, les ruminants et le chien, ont été entreprises dans le Moyen Atlas. Ces travaux ont permis d'acquérir des connaissances valeureuses sur la situation épidémiologique de la maladie, les facteurs de risque qui déterminent sa fréquence et sa persistance dans le contexte étudié ainsi que les contraintes qui pourraient s'opposer aux actions de prévention et de lutte.

A travers ces résultats, différentes actions orientées vers la lutte contre la maladie ont été entreprises en collaboration avec des partenaires nationaux et internationaux. On évoque principalement l'organisation de sessions d'éducation sanitaire au profit d'un public cible varié et le dépistage échographique des kystes hydatique chez l'Homme ainsi que la prise en charge médicale et/ou chirurgicale des personnes atteintes (Kachani *et al.*, 1997; Kachani, 2000; Macpherson, 2005).

Afin de valoriser ses acquis, l'équipe du projet a lancé en 2005 un programme pilote de lutte contre la maladie dans la Commune Rurale d'El Kebab. Ce programme est basé essentiellement sur les actions suivantes (Khayat, 2006):

- L'éducation sanitaire sur la transmission du parasite, utilisant différents outils de communication (livret, brochure, exposé…) au profit d'un public cible varié (chefs de foyers ruraux, femme rurale, élèves des écoles primaires, professionnels d'abattage et de commercialisation des viandes rouges, techniciens d'élevage et personnel de la santé publique, élèves techniciens en agronomie…).
- Le contrôle de la population canine et lutte contre les chiens errants.

- La mise à niveau d'un abattoir rural pour réduire les risques associés à l'hydatidose à ce niveau.
- Le dépistage échographique chez la population humaine couplé d'actions d'éducation sanitaire à titre collectif et individuel. Les personnes identifiées atteintes bénéficiaient d'un suivi médical et/ou chirurgical.

Toutes les activités signalées ci-dessus ont privilégié l'aspect éducation sanitaire relative à l'Hydatidose /Echinococcose et sur le développement des outils de communication et de sensibilisation.

DEUXIÈME PARTIE : OBJECTIFS, MATÉRIEL ET MÉTHODES

CHAPITRE I : OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

Comme la revue de littérature a pu le souligner, l'échinococcose kystique représente un sérieux problème sanitaire et économique au Maroc, notamment dans les zones rurales. En effet, les régions rurales les plus atteintes par cette zoonose sont caractérisées par une activité d'élevage du mouton associée à une abondance de chiens. Parmi les régions les plus atteintes figure le Moyen Atlas, avec une forte prévalence d'infection de 91,7% chez les moutons adultes, et une prévalence de 1,9% chez l'homme (Chebli et al., 2017).

Depuis quelques années, l'incidence de l'hydatidose au Moyen Atlas n'a pas diminué mais au contraire elle ne fait que progresser. Le programme de lutte national entrepris depuis 2005 avait comme objectif général de réduire de 50% l'incidence chez l'homme. Trois axes ont été développés, à savoir (1) l'interruption du cycle biologique en ciblant l'infection des hôtes intermédiaires et définitifs et en sensibilisant l'homme aux risques de transmission ; (2) le dépistage et prise en charge plus précoce des patients humains infectés et (3) le développement d'un arsenal législatif et règlementaire permettant la mise en œuvre des actions liées aux axes 1 et 2.

Dans les zones très endémiques telles que le Moyen Atlas, les principales raisons d'échec de ce programme semblent attribuables à l'impossibilité d'implémenter l'axe 1. D'une part, la gestion sanitaire et les infrastructures dans les tueries et abattoirs ne permettent pas d'éviter l'infection des chiens par des kystes hydatiques présents dans les organes saisis. D'autre part, l'abondance des chiens porteurs de vers d'*E. granulosus*, qu'ils soient errants ou appartenant à des propriétaires, favorise la dissémination des œufs dans l'environnement. Si la contamination de l'homme est plus vraisemblable par le chien à propriétaire vivant au contact de l'homme, celle du cheptel semble dépendre à la fois des chiens errants sans propriétaire et des chiens à propriétaire.

Dans ce contexte, cette recherche doctorale poursuit deux objectifs :

1) L'évaluation de l'efficacité d'un traitement anthelminthique du chien sur l'incidence d'infection en fonction du type de chien (errant ou à propriétaire) et de l'intervalle entre traitements.

Etude 1 : Cette étude de terrain, réalisée dans 3 localités au Moyen Atlas, visera à comparer le risque de ré-infection par *E. granulosus* des chiens à propriétaire et des chiens errants. 3

intervalles de traitement anthelminthique à base de praziquantel seront comparés, à savoir 2, 3 et 4 mois. Cette étude permettra d'estimer le risque de contamination que présentent ces deux catégories de chiens et d'estimer l'impact de la fréquence d'administration d'antiparasitaire sur le risque de leur ré-infection.

2) L'évaluation de l'efficacité d'une vaccination du mouton dès son jeune âge sur le développement de kystes hydatiques.
Cette approche vise à évaluer si une vaccination régulière du mouton dès son jeune âge au moyen du vaccin EG95 permet de protéger le mouton contre le développement de kystes hydatiques hépatiques.

Etude 2 : Afin de pouvoir évaluer l'efficacité vaccinale in vivo et sur site (en ferme), la validité de l'échographie hépatique comme outil de diagnostic des kystes hydatiques hépatiques a été évaluée au moyen d'une investigation ante-mortem et post-mortem à l'abattoir où le nombre et la nature des kystes hydatiques hépatiques détectés à l'échographie ont été comparés à ceux détectés lors d'un examen macroscopique post-mortem. Le risque d'un diagnostic faussement négatif dû à la présence exclusive de kystes pulmonaires non détectables à l'échographie a été estimé en comparant le nombre et la nature de kystes hydatiques hépatiques et pulmonaires chez des animaux examinés à l'abattoir.

Etude 3 : 797 moutons, sélectionnés dès leur jeune âge dans 32 élevages situés dans 4 sites au Moyen Atlas ont servi de témoin non vacciné ou ont été vaccinés pendant 4 années consécutives. Dans un des sites, l'infection par *E. granulosus* chez les chiens à propriétaire présents sur site a été suivie et les chiens ont subi un traitement anthelminthique quadrimestriel. Au terme des 4 années, la prévalence de kystes hydatiques hépatiques ainsi que leur nature ont été déterminés par échographie ou en post-mortem chez les moutons témoins non vaccinés et chez les moutons vaccinés dans les 4 sites d'étude. L'impact de la chimioprévention mise en place chez les chiens sur la prévalence et la nature des kystes a été estimé en considérant le site où l'infection des chiens a été contrôlée.

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

2.1 Critères et choix des régions de l'étude

L'ensemble des études réalisées dans le cadre de cette recherche a été entrepris au Moyen Atlas qui est une zone d'élevage de moutons par excellence, avec trois millions de têtes de la race Timahdit (ANOC, 2019) (figure 12). Le Moyen Atlas est constitué de deux structures géologiques très distinctes : plateau ou surface plane et plissements traversés par des rivières, Oum-Rabiâa et Oued Guigou. La chaîne du Moyen Atlas est constituée de sommets montagneux dont le Tichoukt (2700 m), le Jbel Fazaz, le Bou Iblane et le Bou Nasser (plus de 3000 m) qui surplombent la plaine de la Moulouya au sud. Ces régions montagneuses sont caractérisées par un climat méditerranéen continental de montagne, froid et pluvieux en hiver, chaud et sec en été. Les précipitations annuelles varient entre 350 (sud-ouest) et 1100 mm (nord-est). Les chutes de neige se produisent de décembre à avril avec une accumulation variable allant de 20 à 60 cm. Les différents sites d'études partagent en commun des critères importantes qui nous permis de bien faire le choix. Ces critères concernent la présence d'une importante population canine, de nombreux abattoirs ruraux et les marchés hebdomadaires (souk). En plus, ce sont des régions, connues par l'élevage, notamment ovin avec une prédominance de la race Timahdit. L'élevage ovin est la principale activité des agriculteurs de ces régions. Une étude sur la prévalence du kyste hydatique dans les abattoirs de ces régions, a montré que 30 % des bovins, 13 % des ovins 2 % des caprins sont porteurs d'un ou plusieurs kystes hydatiques dans le foie et les poumons, ce qui suggère une forte infection par *E. granulosus* chez le chien (Amarir, Comunication orale 2017). La région de Had Oued Ifrane a été choisi pour l'évaluation de la lutte chez l'hôte définitif (le chien) par le traitement anthelminthique (Etude 1). Le choix de cette région était lié aux facteurs logistiques et l'engagement de la population pour faciliter le travail sur le terrain. La région de M'Rirt a été choisie pour l'étude de l'évaluation de l'échographie chez les moutons au niveau d'un abattoir (Etude 2). Comme cet abattoir réalise l'abattage des moutons de différents âges et qu'il est situé à côté d'un souk, le nombre d'animaux abattus par jour est important. L'évaluation de la vaccination (Etude 3) a été réalisée dans 4 sites des régions montagneuses : El Kbab (site 4) et Ait Ishaq (site 3) (environ 1100 m d'altitude) dans la province de Khenifra et Ain Leuh (Ain Leuh 1 (site 1) à 1300 m d'altitude et Ain Leuh 2 (site 2) à 1650 m d'altitude) dans la province d'Ifrane. Le choix de ces régions a été basé sur l'endémicité de l'échinococcose kystique (Tahiri et al., 2019) et sur l'abondance de moutons, estimée à 240 000 et 65 000 animaux dans les régions d'Aïn Leuh et d'El Kbab/Ait Ishaq, respectivement (ONSSA, 2015). La population humaine est d'environ 9600 à Aïn Leuh

et 35000 dans le site d'El Kbab et d'Ait Ishaq (HCP, 2014) avec une incidence annuelle d'échinococcose kystique dans la population humaine de 16 et 7,24 cas/100 000 habitants, respectivement (Ministère de la Santé du Maroc, 2015). Sur la base de ces données et celles issues de la prévalence d'infection chez les chiens dans notre première étude, on s'attendait à ce qu'environ 50 % des brebis témoins non vaccinées présentent une infection détectable à l'échographie ou à l'autopsie après quatre ans d'exposition naturelle.

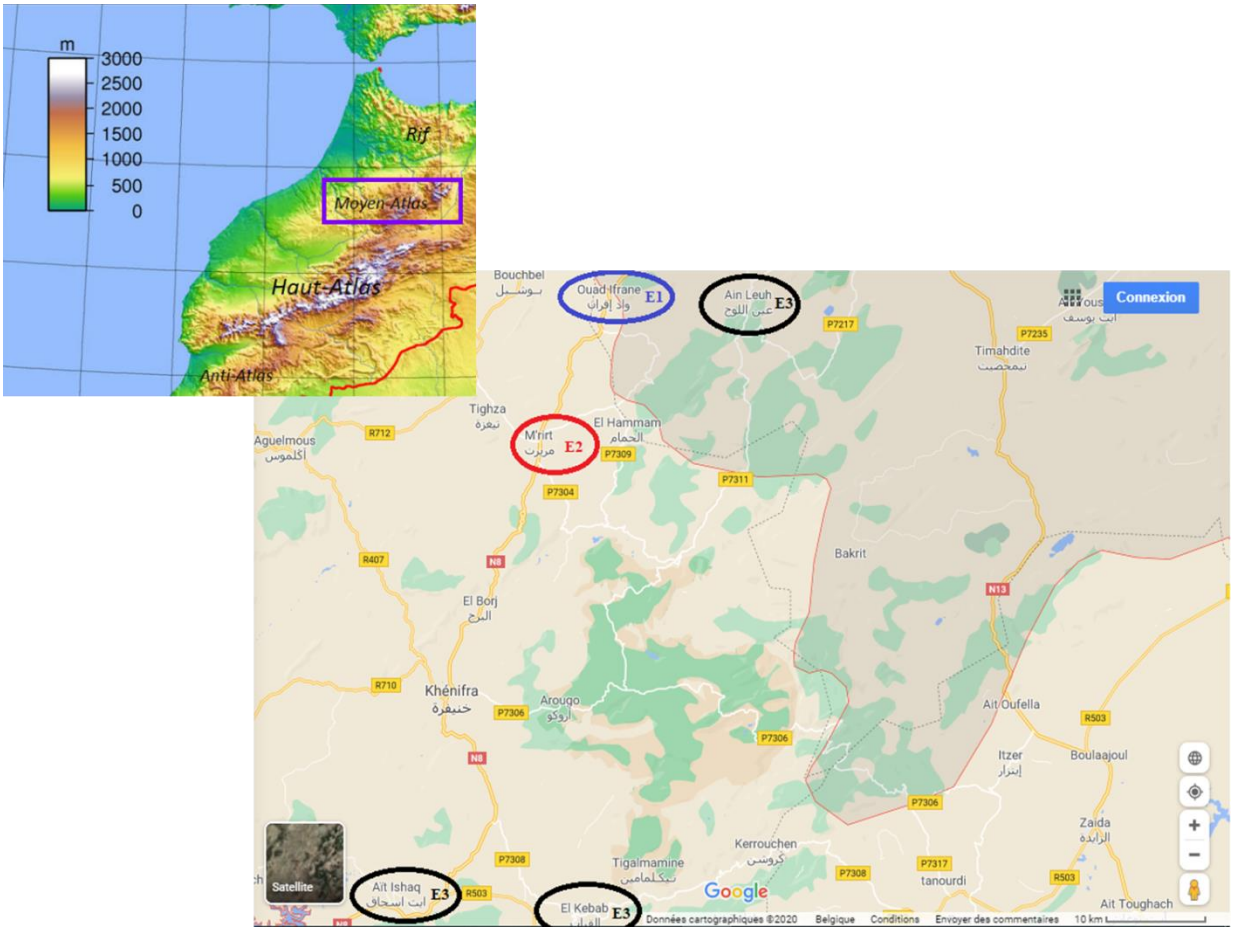


Figure 12. Régions où les études ont été menées (**E1 :** évaluation du traitement chez le chien, **E2 :** évaluation de l'échographie, **E3 :** évaluation de la vaccination des moutons)

2.2 Schémas expérimentaux des trois études

2.2.1 Etude 1 : Évaluation de l'infection du chien

- *Prélèvement des matières fécales*

Les chiens ont été identifiés (Les chiens à propriétaires ont été identifiés et reconnus avec l'aide de leur propriétaire tandis que les chiens errants ont été identifiés et reconnus sur la base de photos). Les propriétaires des chiens, ont été sensibilisés à l'objectif du travail et à la problématique de l'hydatidose en leurs expliquant d'une manière très simplifié le cycle de vie du parasite et sa transmission à l'Homme via le chien, en leurs montrant des prélèvements de

matières fécales de chien contenant les vers d'*E.granulosus* et aussi des photos d'organes contaminés par le kyste hydatique, en leur expliquant que l'Homme se contamine de la même façon que l'hôte intermédiaire par les œufs du parasite et qu'il présente aussi les mêmes lésions kystiques au niveau de ses organes et donc d'où l'importance du traitement du chien. Tous les éleveurs ont montré leur volonté d'adhérer à ce travail et coopérer et ils ont proposé leurs aides à tous les niveaux. Après la sensibilisation des propriétaires, les chiens, ont reçu une administration d'hydrobromide d'arécoline (4 mg/kg de poids corporel) permettant d'accélérer le transit intestinal et induire une défécation rapide avec expulsion des vers parasites avec le mucus intestinal. Chez les chiens errants et peureux, la lévomépromazine (25 mg par voie orale) a été utilisée pour la sédation avant l'administration de l'arécoline. Les prélèvements ont été ensuite placés au congélateur à -80°C pendant 2 semaines (Naidich et al., 2006) avant de les manipuler pour atténuer la pathogénicité des œufs du parasite.

L'aire de défécation après le prélèvement a été exposée à une chaleur élevée avec de l'alcool pendant au moins 5 minutes.

- *Coprologie*

Les matières fécales et le mucus prélevés ont été vérifiés sous une loupe binoculaire à la recherche du vers parasites sur une plaque sombre, en diluant les matières fécales avec de l'eau.

Pour chercher les œufs, la technique de flottaison a été réalisée, en mélangeant la matière fécale (5 grammes) avec une solution de sulfate de zinc saturée à 33%, puis filtration du mélange avec un tamis pour éliminer les gros débris. Ensuite la solution filtrée a été récupérée dans des tubes fins jusqu'à l'obtention d'un ménisque convergent. Après un repos de 15 à 20 minutes, un prélèvement de surface posé entre lame et lamelle a été réalisé et observé au microscope optique au GX 10 pour vérifier au début toute la lame et ensuite au GX 40 pour identifier l'œuf du parasite.

D'autres espèces de parasites ont été observées lors d'analyses microscopiques d'échantillons fécaux, comme *Taenia hydatigena* et / ou *Taenia pisiformis* et *Dipylidium caninum, Toxocara canis, Toxascaris leonina, Trichuris Vulpis, Uncinaria stenocephala, Spirocerca Lupi, Giardia, Coccidie*. Mais, l'investigation s'est surtout focalisée sur *E.granulosus*.

- *Copro-PCR (Bart* et al. *2006)*

Les échantillons positifs au test coprologique ont été analysés par PCR. Un lavage des œufs et vers du parasite avec le tampon phosphate salin (PBS) est réalisé pour éviter l'effet inhibiteur de certaines substances contenues dans les matières fécales sur la PCR. Ensuite, on procède à l'extraction de l'ADN en utilisant le Kit Bioline, ce dernier fournit une méthode simple et efficace, basée sur des colonnes, pour l'isolation de l'ADN génomique à partir d'une grande variété de matériaux, sans avoir besoin de réactifs dangereux tels que le phénol. L'ADN extrait est amplifié en utilisant les amorces mitochondriales EgCOI 1/ EgCOI 2 et EgNDI 1/EgNDI 2. La PCR a été programmée sur 35 cycles avec, pour chaque cycle, une étape de dénaturation (15 s à 95°C), une étape d'hybridation (15 s à 50°C pour EgCOI 1/2 et 52°C pour EgNDI 1/2), et une étape d'élongation (10 s à 72°C). La révélation des résultats de la PCR, caractérisé par la détection d'une seule bande de poids moléculaire de 366 pb pour le COI et de 471 pb pour le NDI, par électrophorèse sur gel d'agarose (1 g) a été réalisée à 120 volts et 100 mA pendant 34 minutes.

- *Traitement des chiens*

Administration par voie orale du Praziquantel (5 mg/Kg) à trois reprises (T0, T1, T2) à des chiens à propriétaires et à des chiens errants de plus d'un an (poids des chiens a été estimé), à des intervalles entre traitement de 2, 3 ou 4 mois pour les groupes A, B et C, respectivement. Le comprimé est mis dans des boulettes de viandes hachée ou introduit directement dans la bouche du chien (Figure 13, 14 et 15).

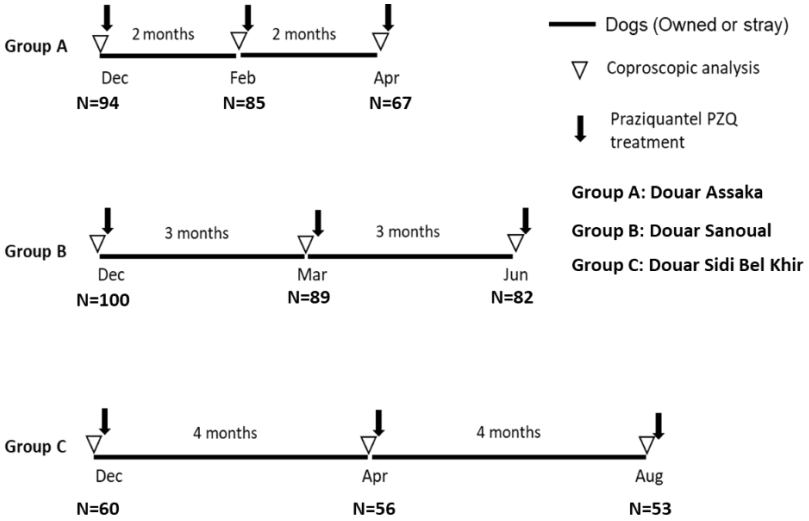


Figure 13. Schéma de l'étude. Trois douars ou Groupe (Groupe A, B et C) présentants des chiens à propriétaire et chiens errants qui ont été traités et prélevés tous les deux mois, trois mois et quatre mois à deux reprises.

Figure 14. Traitement des chiens au Praziquantel, **a.** Praziquantel comprimé (Droncit), **b.** Chiens errants **c.** Chien errant dans un marché hebdomadaire « Souk », **d.** Chiens à propriétaires **e.** Administration par voie orale du comprimé du Praziquantel

Figure 15. Purgation des chiens par l'arécoline, **a.** Bromhydrate d'arécoline, **b,c.** administration de l'arécoline directement par voie orale ou dans une boulette de viande hachée, **e.** prélèvement des échantillons du mucus et matières fécales **d.** désinfection à l'alcool et incinération du reste des matières fécales

- *Analyse des prélèvements au laboratoire : test coprologique et copro-PCR*

2.2.2 Etude 2 : Détectabilité des kystes hydatiques grâce à l'échographie

Des moutons destinés à l'abattage, âgés d'un an ou plus ont été préparés pour l'échographie en tondant leur laine du côté droit entre les 7e et 12e espaces intercostaux et distalement à l'arc costal à ce niveau. La tête de la sonde de 3,5 MHz a été pointée vers l'épaule contralatérale (sous la pointe de l'épaule) (Scott and Sargison, 2010; Dore et al., 2014; Hussein and Elrashidy, 2014) en utilisant un appareil à ultrasons mobile (TITAN ultrasound System ref P08830-02 SonoSite) (Figures 16).

Figure 16. Échographie des moutons, **a.** la tonte de l'animal côté droit, **c.** application du gel pour faciliter le contact entre la peau et la sonde et **b.** observation à l'échographe.

Le foie est visible sous la forme de nombreux échos faibles répartis de manière homogène avec ses vaisseaux sanguins. Toutes les parties du foie ont été visibles (Dore et al., 2014). La présence ou l'absence de kystes hydatiques, le nombre et la nature (kyste viable avec présence du liquide hydatique contenant des protoscolex vivants ou kyste calcifié, mort sans protoscolex) du kyste ont été déterminés. Les kystes hydatiques sont des structures rondes et uniloculaires. La membrane laminaire d'un kyste viable ou fertile est très bien définie et anéchogène tandis que l'intérieur du kyste est échogène en raison du liquide hydatique qu'il contient (Figure 17 a). Par contre, les kystes calcifiés (sans liquide hydatique et non fertiles) présentent une paroi et une cavité hyperéchogènes avec ombrage acoustique (Figure 17 b).

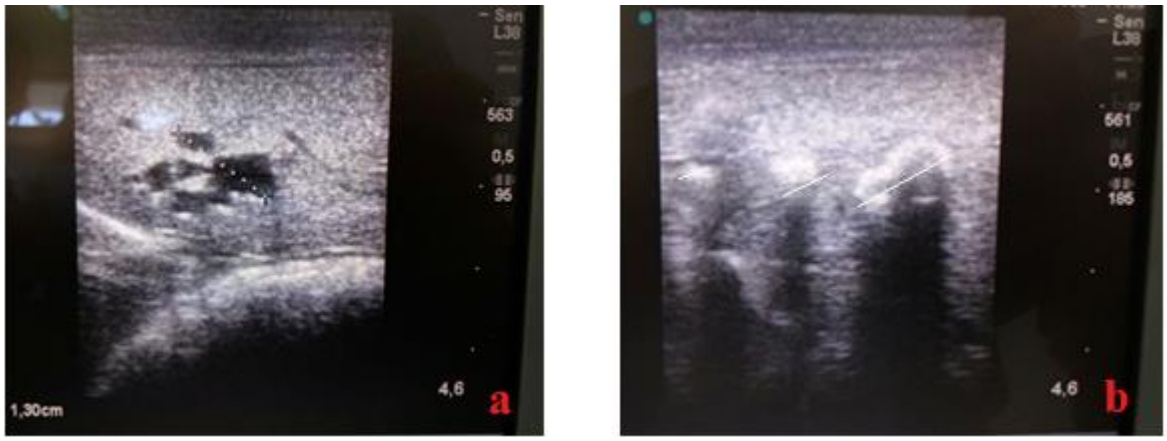


Figure 17. Apparence des kystes observés à l'échographie **a.** Kystes hydatiques viable (présence de liquide hydatique, protoscolex et crochets du parasite), **b.** Kystes calcifiés (absence de luquide hydatique et de protoscolex, kyste mort).

Tous les animaux examinés par échographie ont été abattus et les foies ont été soigneusement examinés par inspection visuelle suivie d'incisions pour détecter les kystes profonds. La nature du kyste hydatique (kyste viable avec présence de protoscolex) observé à l'abattage a été notée (Figure 18).

Figure 18. Inspection des carcasses de brebis infectées et abattues, **a.** carcasses des brebis avec organes, **b.** inspection des saisies d'organes infectés.

Dénombrement des kystes : vivants, morts in vivo et post mortem

- *Dénombrement des kystes in vivo*

In vivo, l'échographie permet une bonne visualisation des kystes vivants et morts, au comptage, et afin de ne pas recompter le même kyste, l'image de chaque kyste trouvé a été enregistré et vu que les kystes diffèrent les uns des autres par la localisation, la forme et la taille, les kystes sont comptés facilement. On s'est intéressés surtout aux kystes vivants car ils représentent la forme infectante du parasite *E. granulosus* pour le chien.

- *Dénombrement des kystes en post mortem et PCR sur les lésions*

A l'abattage, le foie et tous les autres organes ont été minutieusement inspectés. D'abord, par inspection visuelle de l'organe pour la détection des kystes externes puis par incision de l'organe en plusieurs petits morceaux pour la détection des kystes profonds (Figure 19). Les kystes hydatiques ont été confirmé par PCR.

Figure 19. Inspection des organes et identification des kystes viables et calcifiés

2.2.3 Etude 3 : Étude vaccinale

Au total, 32 éleveurs ont été recrutés dans cette étude et ont été sensibilisés à l'importance de ces investigations. Parmi ces éleveurs qui ont adhéré à ce projet, 10 éleveurs à El kbab (site n°4), deux éleveurs à Ait Ishak (site n°3), 12 éleveurs à Ain Leuh 1 (site n°1) et huit éleveurs à Ain Leuh 2 (site n°2). La moyenne de l'effectif total des moutons par élevage chez ces éleveurs est estimée à 200 têtes.

Des jeunes agnelles de différentes exploitations, ont été recrutées à l'âge d'une semaine et ont été identifiées par des boucles et tatouage au niveau des oreilles (N = 797). Un groupe de ces agnelles ont reçu à l'âge de 1 mois une injection sous cutanée du vaccin EG 95 (vaccin lyophilisé préparé avant administration par hydratation à l'eau pure) (N = 402) et un autre groupe a été servi comme témoins sans vaccination (N = 395). Dans la même ferme, on trouve

le groupe des animaux vaccinés et le groupe des animaux témoins. Ce groupe des vaccinées et témoins ont été recrutés aléatoirement.

Le groupe des animaux vaccinés a reçu un rappel de vaccin 1 mois après la primo vaccination et un rappel tous les ans pendant 4 ans.

Un certain groupe de brebis vaccinées et témoins se trouve dans une région où tous les chiens à propriétaire ont été traités au Praziquantel (N = 500 à 700) et suivis pendant 4 ans. Ces chiens ont été traités et suivi 4 fois par an pendant les quatres années d'étude.

A la fin de l'étude, le statut infectieux des moutons a ensuite été évalué par l'échographie en antemortem (N = 183) ou par dissection en post-mortem (N = 221), pour une éventuelle présence de kystes hydatiques.

La figure suivante illustre le schéma de l'étude :

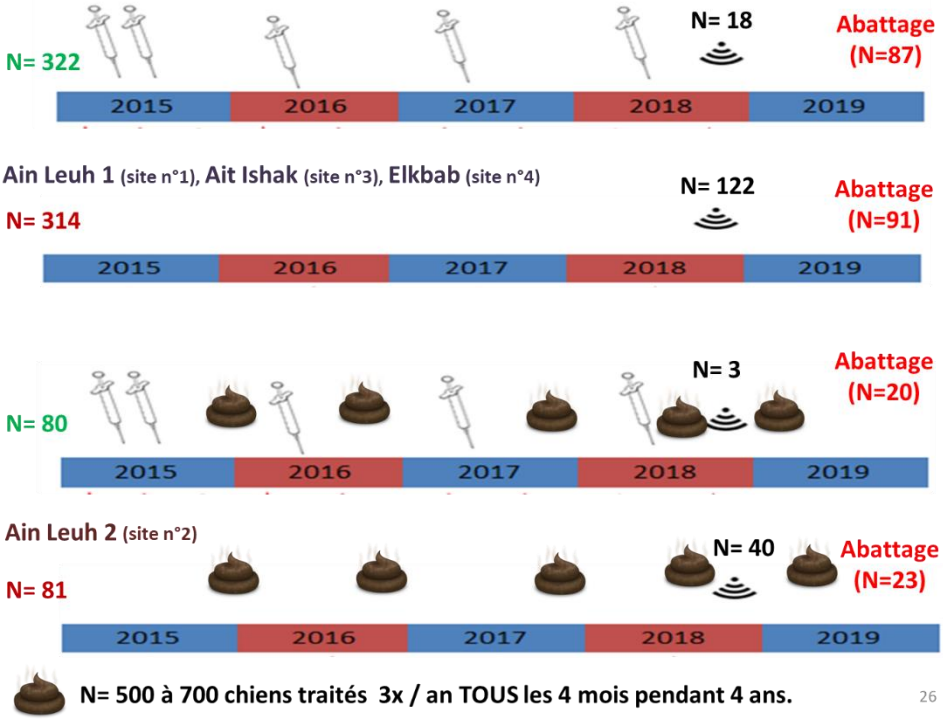


Figure 20. Schéma de l'étude réalisé dans quatre sites au Moyen Atlas, Maroc. Trois sites (Site n°1, 3 et 4) où les brebis vaccinées et témoins vivent avec des chiens à propriétaire non traités et un site (site n° 2) où les brebis vaccinées et témoins vivent avec des chiens à propriétaire traités trois fois par an tous les quatre mois pendant 4 ans.

2.3 Analyses et traitement des données statistiques

La saisie des données a été réalisée à l'aide d'Excel et toutes les données ont été analysées par le logiciel Stata 11 (Stata Corp) pour les différents modèles statistiques utilisés pour chaque étude (voir articles pour plus de détails).

TROISIÈME PARTIE : PRESENTATION DES ETUDES

ETUDE 1 : Estimation de l'incidence d'infection par *E. granulosus* chez les chiens errants et à propriétaires au Moyen Atlas au Maroc

Cette étude est présentée sous forme d'article publié dans le journal Vector-Borne And Zoonotic Diseases : ***Cystic Echinococcosis in Three Locations in the Middle Atlas, Morocco: Estimation of the Infection Rate in the Dog Reservoir***, Jun;20(6):*, 2020, DOI: 10.1089/vbz.2019.2538*) by Amarir, FE., Saadi, A., Marcotty, T., Rhalem, A., Oukessou, M., Sahibi, H., Obtel, M., Bouslikhane, M., Sadak, A., Kirschvink, N.

Présentation synoptique de l'étude

L'interruption du cycle biologique d'*E. granulosus* est possible en ciblant le chien en tant qu'hôte définitif du parasite. Si l'administration par voie orale du praziquantel se révèle très efficace comme agent antiparasitaire, son administration à intervalles réguliers aux animaux cibles est moins facile à mettre en œuvre dans les zones du Moyen Atlas au Maroc. En effet, la population canine dans cette région est composée d'une part de chiens dit à propriétaire dont le suivi est assez aisé et d'autre part de chiens errants et vivant en totale liberté à proximité des espaces leur permettant de se nourrir. Bien qu'il semble justifié d'inclure les chiens errants dans un programme de traitement antiparasitaire ciblant la population canine, l'administration par voie orale d'un traitement antiparasitaire chez ces chiens s'avère plus difficile.

L'objectif de cette première étude était (1) de déterminer la prévalence d'infection par *E. granulosus* des chiens à propriétaire et des chiens errants dans 3 sites connus pour leur endémicité de l'hydatidose au Moyen Atlas ; et (2) d'estimer le taux de ré-infection des chiens à propriétaire et des chiens errants si le traitement antiparasitaire était administré tous les 2, 3 ou 4 mois.

255 chiens (chiens errants et à propriétaires) issus de trois localités à Had Oued Ifrane du Moyen Atlas ont été investigués à trois reprises (T0, T1, T2) entre décembre 2017 et août 2018. Un prélèvement de matières fécales en vue d'une analyse coproscopique afin d'y détecter des œufs d'*E. granulosus* suivi d'une administration de praziquantel ont été réalisés à intervalle de 2 mois (groupe 1, localité 1), 3 mois (groupe 2, localité 2) et 4 mois (groupe 3, localité 3). La souche d'*E. granulosus* a été déterminée par PCR dans les échantillons fécaux positifs à l'analyse coproscopique.

Les analyses coproscopiques réalisées à T0 ont montré une forte prévalence d'infection allant de 23,5 % à 38,8 % chez les chiens à propriétaire et de 51,3 % à 68,5 % chez les chiens errants, de même qu'une différence entre les localités. Les résultats de la PCR ont révélé la présence exclusive de la souche G1 dans les échantillons positifs, confirmant que la souche G1 semble être largement prédominante dans la région.

Un modèle de régression logistique a montré que les chiens errants présentaient un risque d'infection significativement plus élevé (OR = 14 ; IC à 95 % : 6-30 ; $p<0,001$) par rapport aux chiens à propriétaires. L'incidence mensuelle d'infection a été calculée pour chaque localité/fréquence de traitement antiparasitaire et type de chien : il apparaît que celle-ci varie

selon la localité et augmente si l'intervalle entre deux traitements diminue, tout en étant à tout moment et tout endroit significativement plus élevé pour le chien errant. La durée d'investigation variable entre les localités (localité 1 : 2x2 mois ; localité 2 : 2x3 mois, localité 3 : 2x4 mois) apparaît comme une faiblesse dans le protocole expérimental : l'incidence mensuelle d'infection entre T2 et T3 dans les localités 2 et 3 tendent à être plus faibles qu'entre T1 et T2. Si cette tendance peut s'expliquer par un éventuel changement de stratégie alimentaire des chiens à propriétaire (sensibilisés à la problématique), un risque moindre de contamination des chiens errants semble survenir pendant la période estivale.

Cette 1ère étude a permis de mettre en évidence une forte différence du niveau d'infection par *E. granulosus* entre des chiens à propriétaire et les chiens errants et de montrer que le risque d'infection du chien errant est 14 fois plus élevé que celui du chien à propriétaire. Le risque mensuel d'infection en fonction de l'intervalle entre deux traitements diminue si l'intervalle entre traitements diminue. Il reste cependant significativement plus élevé pour le chien errant.

VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES
Volume XX, Number XX, 2020
ª Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/vbz.2019.2538

Cystic Echinococcosis in Three Locations in the Middle Atlas, Morocco: Estimation of the Infection Rate in the Dog Reservoir

Fatima Ezzahra Amarir,[1,2,6] Aouatif Saadi,[1,3] Tanguy Marcotty,[2] Abdelkbir Rhalem,[1] Mohamed Oukessou,[4] Hamid Sahibi,[1] Majdouline Obtel,[5] Mohammed Bouslikhane,[1] Abderrahim Sadak,[6] and Nathalie Kirschvink[2]

Downloaded by Imperial College School Of Med from www.liebertpub.com at 02/23/20. For personal use only.

Abstract

A longitudinal study was carried out in Middle atlas, Morocco (locality of Had Oued Ifrane) in a population of 255 dogs from three localities, including two categories of dogs (owned and stray dogs). The dogs were investigated three times over a period ranging from 4 to 8 months between December and August. At each investigation, dogs were treated with arecoline, inducing defecation and allowing feces collection. Dogs were further treated with praziquantel to clear them from *Echinococcus granulosus*. Microscopic examination of feces was performed to assess the infection status of dogs at each investigation, and positive samples underwent copro-PCR to determine the circulating strain of *E. granulosus*. A high prevalence of infestation ranging from 23.5% to 38.8% and from 51.3% to 68.5% was, respectively, found in owned and in stray dogs. The PCR results revealed the presence of G1 strain in all positive samples. A logistic regression model was used to determine the incidence of infestation and showed that stray dogs underwent a significantly higher risk of infection (odds ratio = 14; 95% confidence interval: 6–30; $p < 0.001$) compared with owned dogs. Only anthelmintic treatment intervals of 2 months efficiently prevented egg shedding in owned and stray dogs. The seasonal effect was also significant, with the highest risk of reinfestation in winter and the lowest risk in summer. This study confirms that stray dogs undergo an increased risk of infestation by *E. granulosus* and indicate that infective pressure is influenced by season.

Keywords: *Echinococcus granulosus*, dog, incidence, Morocco

Introduction

ECHINOCOCCUS GRANULOSUS IS a cestode belonging to the family Taenidae. This tapeworm is an intestinal parasite that usually infects canines, especially dogs as a definitive host. Eggs of this parasite are eliminated with the feces and transmitted to a wide range of intermediate hosts, including sheep and humans, causing hydatid cysts (larval stage of the parasite). Dogs acquire infection by ingesting infected organs of intermediate hosts (Thompson and McManus 2001).

Cystic echinococcosis (CE) is a highly endemic zoonosis in Morocco. The abundance of stray dogs and slaughter practices allowing dogs to have access to condemned offal, especially in rural areas, contribute to its persistence. This disease represents a serious public health problem and has a substantial socioeconomic impact. In 2015, 1627 human

[1]Laboratory of Parasitology, Department of Pathology and Veterinary Public Health, Hassan II Agronomy and Veterinary Institute (IAV), Rabat, Morocco.
[2]Integrated Veterinary Research Unit, Department of Veterinary Medicine, Namur Research Institute for Life Sciences (NARILIS), University of Namur, Belgium.
[3]Fundamental and Applied Research for Animals and Health (FARAH), University of Liège, Liège, Belgium.
[4]Unit of Physiology and Therapeutics, Department of Veterinary Biological and Pharmaceutical Sciences, Hassan II Agronomic and Veterinary Institute, Rabat, Morocco.
[5]Laboratory of Community Health, Preventive Medicine and Hygiene; Laboratory of Epidemiology and Clinical Research, Department of Public Health, Faculty of Medicine and Pharmacy, University Mohammed V, Rabat, Morocco.
[6]Laboratory of Zoology and General Biology, Parasitological and Ecological Unit, Faculty of Sciences, Mohammed V University, Rabat, Morocco.

Downloaded by Imperial College School Of Med from www.liebertpub.com at 02/23/20. For personal use only.

surgical cases (5.2 cases per 100,000 inhabitants) were recorded for the whole country (Chebli et al. 2017). Surgeries need to be repeated in 3% of cases, and a mortality of 3% was reported (Ministry of Health of Morocco 2012). The treatment costs were estimated to be approximately US$ 1700 and US$ 3200 for simple and repeat cases, respectively, and present an important financial burden to the health sector (Andersen 1997). Indirect costs due to recurrence and reexamination, reduced quality of life after surgery, morbidity due to undiagnosed CE, and loss of income in fatal cases were not considered in these burden calculations and would further increase this estimate (Ministry of Health of Morocco 2012).

In Morocco, current evidence indicates that the transmission cycle of *E. granulosus* relies primarily on a domestic cycle involving dogs and livestock species (sheep, cattle, camels, goats, and equines) (Azlaf and Dakkak 2006). Stray dogs in urban areas and free or roaming dogs in rural areas are the main definitive host and are pivotal in transmission in this context (Azlaf and Dakkak 2006, Azlaf et al. 2007, El Berbri et al. 2015a). A study conducted by Azlaf and Dakkak (2006) in several regions of Morocco revealed prevalence rates of 10.58% in sheep, 1.88% in goats, 22.98% in cattle, 12.03% in camels, and 17.8% in equines. The study conducted by El Berbri et al. (2015b) in the region of Sidi Kacem revealed a prevalence of 42.9% in cattle, 11% in sheep, and 1.5% in goats. In the slaughterhouses, organ refusal due to hydatidosis generates losses estimated at US$ 100,000 per year at the national level (Azlaf and Kadiri 2012). In dogs, the tapeworm prevalence varies between 22% and 68.2% across regions (Ouhelli and Kachani 1997). Consequently, this high prevalence leads to a very high contamination of the environment with eggs (Gemmell et al. 2001), and hence the risk of transmission to farm animals and humans is expected to be very high. For these reasons, and in line with WHO/OIE (2001), detection of infection in dogs is an essential component of epidemiological studies and implementation of CE control programs (Dakkak et al. 2016).

In rural regions of Morocco, owned dogs and free roaming or stray dogs are the definitive hosts of *E. granulosus*. Owned dogs are kept as house and livestock guards and are in tight contact with their owners, thereby increasing the risk of contamination of humans, especially women and children (Kachani et al. 1997). On the other hand, their role as shepherd strongly increases the risk of infestation of pastures, thereby leading to infestation of cattle, sheep, goats etc. Infected organs such as liver and lungs from home-slaughtered animals appear as a source of infection of owned dogs. Stray dogs are likely to be infested when roaming freely around slaughterhouses and weekly markets (souks) where animals are killed without any access restriction and no appropriate destruction of infected organs (Kachani et al. 1997).

Among the pharmacological options aiming at the reduction of the infective pressure for intermediate hosts and humans figure the vaccination of domestic herbivores against *E. granulosus* (Gauci et al. 2005) as well as the regular deworming of dogs (Larrieu and Zanini 2012). Indeed, a vaccine against de G1 strain of *E. granulosus* tested in Argentina prevented cyst development in sheep (Larrieu et al. 2013). Vaccination is, therefore, considered as a promising option if satisfying parasite control in dogs cannot be achieved. Indeed, effective chimioprevention in dogs can only be achieved if owned and stray dogs undergo deworming at regular intervals (Cabrera et al. 1996). Given the logistic difficulties of deworming campaigns in rural zones, the risk of infection in function of dog type (owned vs. stray dog) and in function of the parasite egg survival in the environment (winter vs. summer) appear as important points for the set-up of an efficient deworming strategy. Accordingly, this study aimed at identifying the circulating strain of *E. granulosus* in owned and stray dogs in Middle Atlas of Morocco and at assessing infection risk over time in both dog categories.

Materials and Methods

Description of the study area

The study was implemented in Had Oued Ifrane, located in the Middle Atlas, which extends from the southwest to the northeast for about 450 km and covers a total area of 27,550 km^2, corresponding to 15% of Morocco's mountain area (Fig. 1). It is an agro-pastoral zone where agriculture and livestock are the main sources of income for the entire rural population. It is a mountainous area where altitude ranges from 800 to 3500 meters. The climate of the region is the mountainous continental Mediterranean type of mountain: cold, rainy, and snowy in winter; hot and dry in summer. Had Oued Ifrane was chosen as a case study site, due to the presence of a large canine population, many rural slaughterhouses, and a weekly ephemeral fairground market (souk). It is a region known for breeding, particularly sheep farming with a predominance of the Timahdit breed. Livestock production is the main activity for farmers in this region. A study on the prevalence of hydatid cyst in abattoirs in the same region showed that 30% of cattle, 13% of sheep, and 2% of goats carry one or more hydatid cysts in the liver and lungs, suggesting a strong *E. granulosus* infestation in dogs (Amarir, personal communication 2017).

Study design

Two populations of dogs were targeted: owned dogs and stray dogs. At Had Oued Ifrane, three douars (villages) distant about 20–30 km from each other were selected. They were located near a weekly souk and a slaughterhouse. Their inhabitants were sheep and cattle breeders of similar herd size and with an average of two to three dogs per household.

Each douar was assigned to a dog treatment group (Group A: Douar Assaka, with a 2-month treatment interval, Group B: Douar Sanoual with a 3-month treatment interval, Group C: Douar Sidi Bel Khir with a 4-month treatment interval) and was composed by similar proportions of owned (60–75%) and stray dogs (25–40%). Praziquantel (5 mg/kg) was administrated on three occasions (T0, T1, T2) to owned and stray dogs older than 1 year at intervals of 2, 3, or 4 months to groups A, B, and C, respectively (Table 1 and Fig. 2). The choice to assess the risk of infestation in dogs at different treatment intervals was initially based on site accessibility and lack of knowledge of incidence. Long exposure time is, indeed, required to compare owned and stray dogs if incidence is low whereas shorter exposure time is indicated to compare higher incidences. All groups were tested for the first time in December 2016. Dogs missing a sampling session were no more investigated. Owned dogs were identified and recognized with the help of their owner, whereas stray dogs were identified and recognized on the basis of pictures.

Downloaded by Imperial College School Of Med from www.liebertpub.com at 02/23/20. For personal use only.

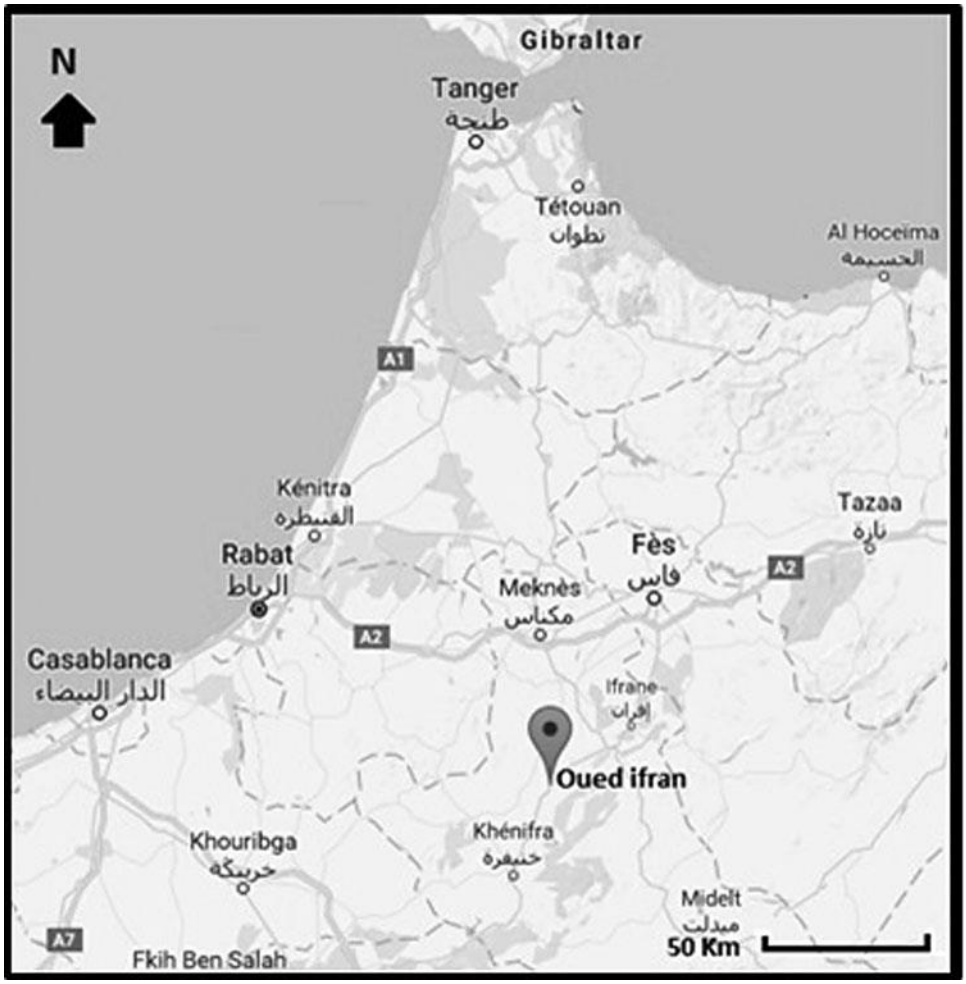


FIG. 1. Geographical localization of study site Had Ouad Ifrane. Ref: www.google.com/maps/place/Ouad+Ifrane.

Fecal sample collection and analysis

To induce defecation and expulsion of eggs and worms, dogs received meat balls containing arecoline hydrobromide (approximate dose of 4 mg/kg BW). In case of defecation failure, a second dose of 2 mg/kg BW was administrated (Cabrera et al. 1995). After sample collection, remaining feces and defecation area were disinfected with alcohol for at least 5 min and burned (Dakkak et al. 2016). To collect feces from fearful stray dogs, levomepromazine (25 mg orally) was used for sedation before arecoline administration (according to the protocol described by OIE 2012).

The coprological flotation technique described by Riche and Jorgensen (1971) was applied on fecal samples for microscopic examination. Worms and eggs were identified according to Soulsby (1982).

Only samples positive at coprology were washed with PBS, and DNA extraction was performed according to Mathis et al. (2006) and Abbassi et al. (2003). The DNA was extracted by using the Bioline Kit (Bart et al. 2006). The DNA extracted from worms and eggs underwent a PCR amplification by use of the mitochondrial primers EgCOI 1/EgCOI 2 and EgNDI 1/EgNDI 2 according to the protocol described by Bart et al. (2006). Copro-PCR was reported to

TABLE 1. PROPORTION OF INFECTED OWNED AND STRAY DOGS AT DIFFERENT SAMPLING TIMES IN THE THREE GROUPS

	December	*February*	*March*	*April*	*June*	*August*
Group A						
Owned dogs	0.24 (15/62)	0 (0/57)	—	0 (0/45)	—	—
Stray dogs	0.5 (16/32)	0.11 (3/28)	—	0.05 (1/22)	—	—
Group B						
Owned dogs	0.40 (30/76)	—	0.06 (4/69)	—	0 (0/65)	—
Stray dogs	0.63 (15/24)	—	0.30 (6/20)	—	0.18 (3/17)	—
Group C						
Owned dogs	0.35 (15/43)	—	—	0.23 (9/39)	—	0.05 (2/39)
Stray dogs	0.76 (13/17)	—	—	0.76 (13/17)	—	0.50 (7/14)

Missing dogs were excluded for the rest of the study.

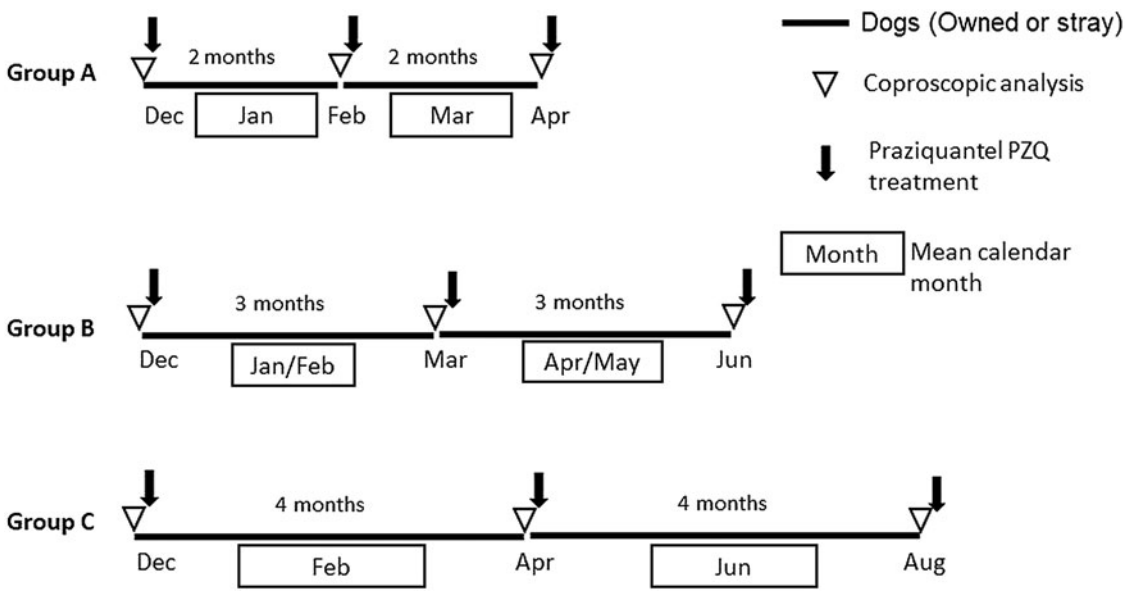


FIG. 2. Study design.

be highly sensitive to detect eggs and worms per animal and to identify species of the family Taeniidae (Mathis et al. 2006). The PCR program was made of 35 cycles with, for each cycle, a denaturation step (15 s at 95°C), a hybridization step (15 s at 50°C for EgCOI 1/2 and 52°C for EgNDI 1/2), and an elongation step (10 s at 72°C).

Other species of taeniid cestodes were observed during microscopic analyses of fecal samples, such as *Taenia hydatigena* and *Dipylidium caninum*.

Statistical analysis

Logistic regressions were used to analyze the infection status of dogs both before and after treatment. At T0, dog type, the location, and the interaction between them were used as discrete explanatory variables. T1 and T2 data were analyzed by using dog type (discrete), location (discrete), and mean calendar time of the exposure period (continuous from January to June; Fig. 2) as explanatory variables. First-level interactions were tested and ignored if $p > 0.05$. Linear estimates and the corresponding probabilities (i) were calculated with their 95% confidence intervals (CIs). Since exposure periods (e) ranged from 2 to 4 months, estimates were further transformed in monthly risks (r) assuming a prepatent period (p) of 1 month.

$$r = 1 - (1 - i)^{1/(e - p)}$$

Results

Strain identification by coproPCR

The analysis of the PCR product of 104 positive fecal samples revealed the presence of a single genotype of *E. granulosus*, the G1 that belongs to the sheep strain, characterized by the presence of a single band of molecular weight of 366 bp for COI and 471 bp for NDI (Fig. 3a, b).

Prevalence of dog infections

Results regarding *E. granulosus* infestation of dogs are shown in function of site (A–C), dog type (owned vs. stray dogs), and time (Table 1). At the beginning of the study, the prevalence was significantly higher in stray dogs than in owned dogs (odds ratio [OR] = 14; 95% CI: 6–30; $p < 0.001$).

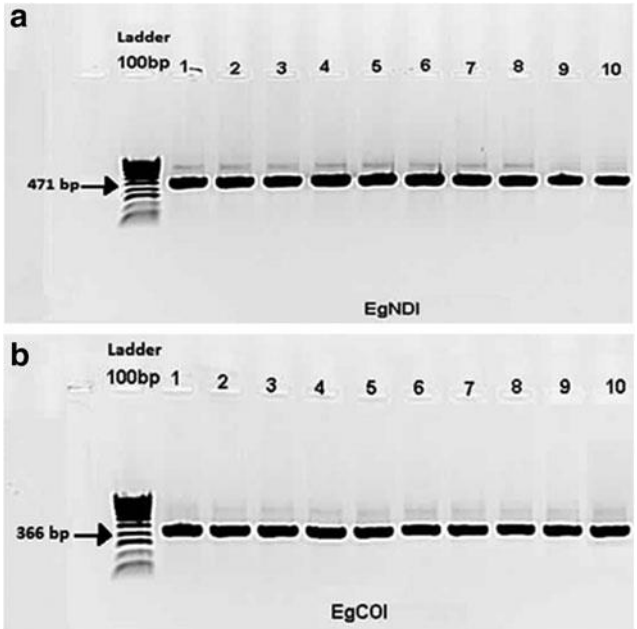


FIG. 3. (a) PCR electrophoresis (pair of NadI primer) on 1% agarose gel for nine feces samples positive for *Echinococcus granulosus* G1 strain represented by band 1 to band 9, with band 10 representing the positive control of G1. (b) PCR electrophoresis (COI primer) on 1% agarose gel for nine feces samples positive for *E. granulosus* G1 strain represented by band 1 to band 9, with band 10 representing the positive control of G1.

Downloaded by Imperial College School Of Med from www.liebertpub.com at 02/23/20. For personal use only.

Dogs of group A were less infected than dogs of group B ($p = 0.03$) and group C ($p = 0.04$). Interactions between sites and dog types were not significant (likelihood ratio test: $p = 0.48$) (Fig. 4).

Risk of dog infections

Modeling the monthly incidence of infection in owned and stray dogs revealed that stray dogs had a significantly higher risk of infection than owned dogs (OR = 14; 95% CI: 6–30; $p < 0.001$). The site effect (including effects caused by different locations and exposure times) was also significant. In addition, in the multivariable model, calendar time also had a significant effect ($p < 0.001$), indicating that the risk of infection was significantly higher in winter than in spring and summer (Fig. 5). The interaction between site and dog type could not be evaluated since no owned dog was found to be positive in site A at T1 and T2. Interactions between time and dog type and between time and site were not significant ($p = 0.9$ in likelihood ratio test between models with and without first-level interactions), indicating that the effect of time was the same in all sites and categories.

To allow the comparison of incidence between the sites, the model predictions and CIs were transformed in monthly risks. Assuming a constant risk during each exposure period and a prepatent period of 30 days, the monthly risk was lower in site A compared with sites B and C. The monthly incidence in site C appeared much higher than in sites A and B (Fig. 5).

Discussion

This is the first article on *E. granulosus* in dogs in Had Oued Ifrane region of the Middle Atlas, Morocco. Our study revealed the presence of the G1 strain in both owned and stray dogs, which is in line with previous studies (Azlaf et al. 2007, El Berbri et al. 2015a) and which confirms the major involvement of dogs in this strain transmission. Moreover, this study is, to our knowledge, the first to determine the prevalence and the incidence of infection with *E. granulosus* in function of the dog type (stray vs. owned dogs) and in function of exposure time. As reported by Dakkak et al. (2016),

FIG. 4. Initial prevalence of *E. granulosus* infection in owned and stray dogs in three study sites (A–C) and confidence intervals are shown. Prevalence in stray dogs is significantly higher than in owned dogs, $p < 0.01$.

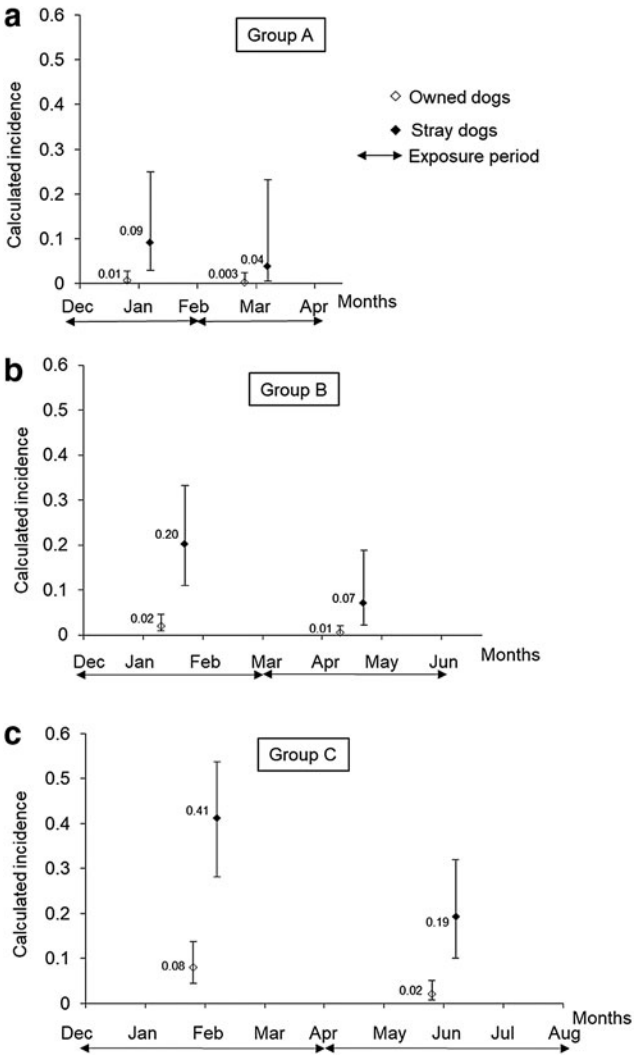


FIG. 5. Modeling of the monthly incidence of infestation with confidence interval (95%) (a–c). Monthly incidence and confidence interval (95%) within each group and each exposure period are shown. Incidence is significantly higher in stray dogs than in owned dogs, $p < 0.05$.

determining such indices is believed to be the best indicator regarding the risk of *E. granulosus* transmission in a region.

Our three work sites were carefully selected and were similar regarding climatic and socio-environmental conditions.

The prevalence of dog infestation by *E. granulosus* was expected to be similar between sites A, B, and C. As a first drawback of this field study, a significantly lower prevalence in dogs of site A (Fig. 4) has to be mentioned. Second, the different anthelmintic treatment intervals of 2, 3, and 4 months leading to different exposure times should ideally have been applied in all sites. However, given that treatment of stray dogs was complex, the investigators preferred a setting where all dogs of a same site underwent a same treatment schedule.

Moreover, treatment of owned dogs strongly depended on owner compliance, which could have been reduced if treatment schedules differed between dogs of the same owner or of a neighbor. Consequently, differences of the baseline (T0) values somewhat weaken the comparisons of absolute prevalence and incidence values in owned and stray dogs.

Downloaded by Imperial College School Of Med from www.liebertpub.com at 02/23/20. For personal use only.

TABLE 2. MULTIVARIABLE LOGISTIC REGRESSION OF INFECTION RISK; GROUP A AND OWNED DOGS ARE THE BASES OF THE SITE AND DOG TYPE DISCRETE EXPLANATORY VARIABLES, RESPECTIVELY; TIME IS EXPRESSED IN MONTHS FROM JANUARY (1) TO JUNE (6)

Variables	*OR*	*95% CI*	p
Group B/A	6.79	2.01–22.94	0.002
Group C/A	61.07	16.82–221.66	<0.001
Stray/owned dogs	13.94	6.27–30.96	<0.001
Time	0.68	0.54–0.85	0.001

CI, confidence interval; OR, odds ratio.

A last weakness of the design of this field study is the variable length of investigation: Indeed, the number of investigations per site was identical, but the total time span varied from 4 to 8 months, thereby introducing a supplementary variable, is climatic conditions that might influence infectious pressure by increasing or decreasing hydatic cyst survival in the environment. Ideally, the number of investigations should have been adapted to achieve an identical length of observation in all sites. On the other hand, contrary to studies where the effect of long-term anthelminthic treatment at different intervals aimed at reducing the development of hydatic cysts in the intermediate host (Cabrera et al. 2002, Zhang et al. 2009), our study assessed the impact of the time of exposure on infective material of the definite host to estimate the risk of reinfection after dogs' treatment. Considering that egg excretion by dogs is the source of infection of humans, especially in the case of owned dogs living nearby to their owners, valuable information regarding anthelmintic treatment intervals is crucial.

Regarding the sample analyses, an underestimation of infestation by *E. granulosus* cannot be excluded because only coproscopically positive samples underwent PCR analysis. Indeed, Lahmar et al. (2007) revealed that coproscopic control was highly specific but less sensitive (64%) than PCR (almost 100%). It might, nevertheless, be mentioned that all coproscopically positive samples were confirmed by PCR.

Before any treatment, the prevalence was high in both the stray and owned dogs (ranging from 23.5% to 51.3%; Fig. 4), and this difference was present in all sites. In a study carried out in Lybia, Buishi et al. (2005) reported slightly lower prevalences of 21.6% and 25.8% in stray and owned dogs, respectively. In Tunis, Lahmar et al. (2001) reported a prevalence of 21.0% in stray dogs. The high prevalence in stray dogs in our study can be explained by an increased infectious pressure due to free access to harvested and infested organs around slaughterhouses and weekly souks.

As shown in Fig. 5, the calculated incidence of reinfection varied in function of dog type and site. Independent of study site, risk of reinfection was significantly higher in stray dogs than in owned dogs, which can be related to an increased access to infected organs by stray dogs. Interestingly, the time span of 2 or 3 months between two anthelmintic treatments in owned dogs poorly changed the risk of reinfection of owned dogs and a decrease of reinfection was observed after the second treatment (Table 2). These results indicate that a treatment interval of 2 or 3 months efficiently controls *E. granulosus* egg shedding in owned dogs. Provided the investigation of owned dogs was strongly dependent on owner compliance, it might be hypothesized that owner awareness for this zoonosis increased over time, thereby changing the feeding strategy of their dogs. Indeed, Marcotty et al. (2012) have shown that the population's perception and knowledge of the disease appears as a determining factor for the success of control measures.

Regarding the risk of reinfection of stray dogs, even the short interval treatment did not completely prevent reinfection, but it considerably reduced its risk (Table 1 and Fig. 5). These results underline to which extent the exposure to infected organs appears to be high in stray dogs. Strik- ingly, a reduction of reinfection risk was observed in stray dogs between the second and third investigation, despite the absence of a changed feeding strategy as supposed for owned dogs. We hypothesize that this significant effect of time (Table 2) is due to climatic conditions. Indeed, the 4-month interval investigation started in December and ended in August, which means that the second exposure period took place under dry and warm conditions. Accordingly, hydatid cysts survival in the environment might have been reduced during this period. If the impact of temperature and humidity is well known with regard to *E. granulosus* egg survival, knowledge is reduced regarding cyst survival in the environment (Atkinson et al. 2012). It might further- more be assumed that the environmental load is highest in late autumn and during winter, because the proportion of slaughtered and potentially infested animals increases at this time point (Thevenet et al. 2005).

In conclusion, this study confirmed by molecular typing the presence of the G1 *E. granulosus* strain in owned and stray dogs in the Middle Atlas of Morocco. Prevalence and incidence of *E. granulosus* was significantly higher in stray dogs. Dogs' reinfestation rate increased when treatment intervals increased. Only interval treatments of 2 months appeared to efficiently control egg shedding in owned and stray dogs. A significantly higher calculated incidence of infestation was found in owned and stray dogs during winter periods than during spring/summer periods, suggesting a seasonal change of infective pressure. Accordingly, for an effective control strategy in this endemic region of Morocco, those factors must be taken into account.

Acknowledgments

The authors thank Pierre Dorny of the Institute of Tropical Medicine in Antwerp, Belgium, for providing the positive control of *E. granulosus* G1 strain; Luc Duchateau of the Biometrics Research Group, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Belgium, for his assistance in statistical data analysis; and Intissar Boukhari of the parasitology laboratory at the Agronomy and Veterinary Institute Hassan II, Rabat, Morocco, for his precious assistance in the field and in the laboratory.

Author Disclosure Statement

No conflicting financial interests exist.

Statement of Animal Rights

This work has been authorized by the animal welfare and ethics committee in Rabat, Morocco, in 2015. The protocol

Downloaded by Imperial College School Of Med from www.liebertpub.com at 02/23/20. For personal use only.

was applied according to the international standards cited in many scientific references and in the 2012 OIE Manual titled ''Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals.''

Funding Information

This study received funding from the Academy of Research and Higher Education (ARES) of Belgium and University of Namur, Belgium, and Institute of Agronomic and Veterinary Hassan II, Rabat Morocco.

References

Abbasi I, Branzburg A, Campos-Ponce M, Abdel-Hafez SK, et al. Coprodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection in dogs by amplification of a newly identified repeated DNA sequence. Am J Trop Med Hyg 2003; 69:324–330.

Andersen FL. Introduction to cystic echinococcosis and description of cooperative research project in Morocco. In: Andersen FL, Ouhelli H, Kachani M, eds. *Compendium on Cystic Echinococcosis*. Provo, Utah, Brigham Young University Press, 1997:1–17.

Atkinson JAM, Gray DJ, Clements ACA, Barnes TS, et al. Environmental changes impacting *Echinococcus* transmission: Research to support predictive surveillance and control. Global Change Biol 2012; 19:677–688.

Azlaf R, Dakkak A. Epidemiological study of the cystic echinococcosis in Morocco. Vet Parasitol 2006; 137:83–93.

Azlaf R, Dakkak A, Chentoufi A, El Berrahmani M. Modeling the transmission of *Echinococcus granulosus* in dogs in the northwest and in the Southwest of Morocco. Vet Parasitol 2007; 145:297–303.

Azlaf R, Kadiri A. Epidemiological profile of hydatidosis in Morocco from 1980 to 2008. Ann Biol Clin 2012; 70:457–461.

Bart JM, Morariu S, Knapp J, Ilie MS, et al. Genetic typing of *Echinococcus granulosus* in Romania. Parasitol Res 2006; 98:130–137.

Buishi I, Walters T, Guildea Z, Craig P et al. Re-emergence of canine *Echinococcus granulosus* infection, Wales. Emerg Infect Dis 2005; 11:568–571.

Cabrera PA, Haran G, Benavidez U, Valledor S, et al. Transmission Dynamics of *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena* and *Taenia ovis* in sheep in Uruguay. Int J Parasitol 1995; 25:807–813.

Cabrera PA, Lloyd S, Haran G, Pineyro L, et al. Control of *Echinococcus granulosus* in Uruguay: Evaluation of different treatment intervals for dogs. Vet Parasitol 2002; 103:333–340.

Cabrera PA, Parietti S, Haran G, Benavidez U, et al. Rates of reinfection with *Echinococcus granulosus*, Taenia hydatigena, *Taenia ovis* and other cestodes in a rural dog population in Uruguay. Int J Parasitol 1996; 26:79–83.

Chebli H, Laamrani El Idrissi A, Benazzouz M, Lmimouni BE, et al. Human cystic echinococcosis in Morocco: Ul- trasound screening in the Mid Atlas through an Italian- Moroccan partnership. PLoS Negl Trop Dis 2017; 11: e0005384.

Dakkak A, El Berbri I, Petavy A, Boue´ F, et al. *Echinococcus granulosus* infection in dogs in Sidi Kacem Province (North-West Morocco). Acta Tropica 2016; 3985:7.

El Berbri I, Ducrotoy MJ, Petavy AF, Fassifihri O, et al. Knowledge, attitudes and practices with regard to the presence, transmission, impact, and control of cystic echinococcosis in Sidi Kacem Province, Morocco. Infect Dis Poverty 2015a; 4:48.

El Berbri I, Petavy AF, Umhang G, Bouslikhane M, et al. Epidemiological investigations on cystic Echinococcosis in North-West (Sidi Kacem Province) Morocco: Infection in ruminants. Adv Epidemiol 2015b; 104025:9.

Gauci C, Heath D, Chow C, Lightowlers MW. Hydatid disease: Vaccinology and development of the EG95 recombinant vaccine. Expert Rev Vaccines 2005; 4:103–112.

Gemmell MA, Roberts MG, Beard TC, Campano Diaz S, et al. Chapter 6: Control of *Echinococcus granulosus*. In: Eckert J, Gemmell MA, Meslin F-X, Pawłowski ZS, eds. *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern*. Paris: World Organisation for Animal Health (OIE) and World Health Organization (WHO), 2001:195–203.

Kachani M, Ouhelli H, Kadiri A, El Hasnaoui M. Prevalence of hydatid cysts in livestock in Morocco and potential role of these intermediate hosts in transmission of cystic echinococcosis. In: Andersen FL, Ouhelli H, Kachani M, eds. *Compendium of Cystic Echinococcosis in Africa and in Middle Eastern Countries with special Reference to Morocco*. Provo: Brigham Young University, 1997: 156–168.

Lahmar S, Kilani M, Torgeson PR. Frequency distributions of *Echinococcus granulosus* and other helminths in stray dogs in Tunisia. Ann Trop Med Parasitol 2001; 95:69–76.

Lahmar Se, Lahmar Sa, Boufana B, Bradshaw H, et al. Screening for *Echinococcus granulosus* in dogs: Comparison between arecoline purgation, coproELISA and coproPCR with necropsy in pre-patent infections. Vet Parasitol 2007; 144:287–292.

Larrieu E, Herreroa E, Mujicaa G, Labanchia GL, et al. Pilot field trial of the EG95 vaccine against ovine cystic echinococcosis in Rio Negro, Argentina: Early impact and preliminary data. Acta Tropica 2013; 127:143–151.

Larrieu E, Zanini F. Critical analysis of cystic echinococcosis control programs and praziquantel use in South America, 1974–2010. Rev Panam Salud Públ 2012; 31:81–87.

Marcotty T, Thys E, Conrad P, Godfroid J, et al. Intersectoral collaboration between the medical and veterinary professions in low-resource societies: The role of research and training institutions. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2012. DOI: 10.1016/j.cimid.2012.10.009

Mathis A, Deplazes Pet al. Copro-DNA tests for diagnosis of animal taeniid cestodes. Parasitol Int 2006; 55:887–890.

Ministry of Health of Morocco. Epidemiological Situation of Parasitic Diseases. Directorate of Epidemiology and Dis- ease Control. Parasitic Diseases Service, Rabat, Morocco, 2012.

OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. In: Chapter 2.9.5.-Cysticercosis, 7th ed., vol. 2. OIE Biological Standards Commission, World Assembly of Delegates of the OIE. Paris, France, 2012.

Ouhelli H, Kachani M. *Compendium on Cystic Echinococcosis in Africa and in Middle Eastern Countries with Special Reference to Morocco*. Provo, UT: Brigham Young University, Print Services, 1997:72–84.

Riche PD, Jorgensen RJ. *Echinococcosis (hydatidosis) and Its Control. Near East Animal Health Institutes (NEAHI) Handbook N° 6*. Beirut: Food and Agriculture Organization, 1971:39–50.

Downloaded by Imperial College School Of Med from www.liebertpub.com at 02/23/20. For personal use only.

Soulsby EJL. *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals*, 7th ed. London: Bailliere Tindall, Book Review Volume 78, Issue 3, p 329, 809 pp., illus. 1982 ISBN 0-7020-0820-6. DOI: https://doi.org/10.1016/0035-9203(84)90110-X

Thevenet PS, Jensen O, Drut R, Cerrone GE, et al. Viability and infectiousness of eggs of *Echinococcus granulosus* aged under natural conditions of inferior arid climate. Vet Parasitol 2005; 133:71–77.

Thompson PR, McManus D. Aetiology parasites and lifecycles. In: Eckert JGM, Meslin FX, Pawlowski ZS, eds. *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern*. Paris: Office International des Épizooties, 2001:1–17.

WHO/OIE. In: Eckert J, Gemmell MA, Meslin F-X, Pawłowski ZS, eds. *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern*. Paris: Office International des Épizooties, Chapter 6, 2001:200.

Zhang W, Zhang Z, Yimit T, Shi B, et al. A pilot study for control of hyperendemic cystic hydatid disease in China. PLoS Negl Trop Dis 2009; 3:e534.

Address correspondence to:
Fatima Ezzahra Amarir
Laboratory of Parasitology
Department of Pathology and Veterinary Public Health
Hassan II Agronomy and Veterinary Institute (IAV)
B.P. 6202 Madinat Al Irfane
Rabat 1010
Morocco
E-mail: amarir.f@gmail.com

Downloaded by Imperial College School Of Med from www.liebertpub.com at 02/23/20. For personal use only.

ETUDE 2 : Détection des kystes hydatiques par échographie hépatique chez les moutons : impact de l'abondance, de la viabilité et de la localisation des kystes

Cette étude est présentée sous forme de projet d’article.

Présentation de l'étude

Le 2e objectif de cette recherche doctorale visait à évaluer si le cycle biologique d'*E. granulosus* peut être efficacement interrompu au niveau de l'hôte intermédiaire en considérant la présence, le nombre et le types de kystes présents chez des moutons témoins et des moutons vaccinés depuis leur jeune âge. Si la méthode de référence pour quantifier et qualifier les kystes hydatiques reste l'examen macroscopique post-mortem des principaux organes hébergeant des kystes, à savoir le foie et les poumons, cette approche impliquant la mise à mort de l'animal n'est pas applicable à grande échelle, ni à toutes les catégories d'animaux. Dès lors, l'échographie hépatique, approche peu invasive et applicable sur le terrain, apparaît comme un outil complémentaire intéressant à mettre en œuvre.

Afin de pouvoir inclure l'échographie hépatique comme outil de détection de kystes hydatiques, une validation de la technique dans le contexte épidémiologique du Moyen Atlas était nécessaire. Dès lors, cette 2e étude visait (1) à évaluer chez 126 moutons âgés entre 1 et 6 ans dans quelle mesure l'échographie permettait de détecter, de quantifier et de qualifier des kystes hépatiques confirmés par autopsie ; et (2) d'estimer au moyen d'une analyse des kystes présents au niveau hépatique et pulmonaire chez 97 moutons abattus quelle proportion d'animaux présentait exclusivement des kystes pulmonaires non détectables à l'échographie.

Le premier volet de cette étude technique a montré une excellente sensibilité de l'échographie hépatique étant donné que 98% des animaux porteurs de kystes ont pu être détectés. Parmi les 126 animaux investigués, 108 présentaient des kystes hépatiques à l'autopsie. Le nombre de kystes augmentant avec l'âge, la capacité de détection atteignait les 100% chez les animaux âgés de 3 ans ou plus. La différenciation par échographie entre kystes viables et kystes calcifiés a été aisée et apparaît comme fiable. Des contraintes logistiques ayant rendu une investigation pulmonaire de ces animaux impossible, le 2e volet de cette étude a été réalisée sur des blocs foie-poumons de 97 moutons abattus et présentant des kystes hépatiques et/ou pulmonaires. Après analyse de la présence et du nombre de kystes hydatiques viables identifiés au niveau hépatique et pulmonaire, 22% des animaux présentaient uniquement des kystes pulmonaires. Chez ces animaux, le nombre moyen de kystes était plus faible (2,6) par rapport à ceux présentant des kystes hépatiques et pulmonaires (13,3 en moyenne).

Cette investigation technique a permis de valider l'échographie comme outil de détection de kystes hydatiques chez le mouton dans notre région d'étude. Bien que plus de 20% des individus porteurs de kystes ne sont pas détectables en raison d'une localisation exclusivement

pulmonaire de ces derniers, la sensibilité pour détecter des kystes hépatiques atteint les 100% chez les animaux âgés de plus de 3 ans.

Hydatic cyst detection by liver ultrasonography in sheep: impact of cyst abundance, viability and location

Fatima Ezzahra Amarir [1,2,3], Abdelkbir Rhalem [1], Tanguy Marcotty [2], Btissam Asri[1], Abderrahim Sadak [3], Rahma Azrib [4], and Nathalie Kirschvink [2]

Author's affiliation

1 Laboratory of Parasitology, Department of Pathology and Veterinary Public Health, Hassan II Agronomy and Veterinary Institute (IAV), Rabat, Morocco.

2 Integrated Veterinary Research Unit, Department of Veterinary Medicine, Namur Research Institute for Life Sciences (NARILIS), University of Namur, Belgium.

3 Laboratory of Zoology and General Biology, Parasitological and Ecological Unit, Faculty of Sciences, Mohammed V University, Rabat, Morocco.

4 Department of Medicine, Surgery, and Reproduction, Hassan II Agronomy and Veterinary Institute (IAV), Rabat, Morocco.

5 Unit of Physiology and Therapeutics, Department of Veterinary Biological and Pharmaceutical Sciences, Hassan II Agronomic and Veterinary Institute, Rabat, Morocco.

Abstract

The objectives of this study, performed in sheep of different ages in the Middle Atlas in Morocco, were (1) to compare hydatid cyst (HC) detection, HC count and cysts classification into viable and calcified by ante-mortem hepatic US scanning and post-mortem macroscopic hepatic inspection (part 1) and (2) to asses by a comparative post mortem liver and lung inspection in as far hepatic US scanning would fail to detect sheep with exclusive location of HC in the lungs (part 2).

Part 1 of this study enrolled 126 sheep available for slaughter. Ante-mortem liver US was performed, followed by macroscopic post-mortem inspection of the liver. Presence or absence of cysts, cyst count and distinction between viable and calcified cysts was performed by US and post-mortem inspection. Part 2 was performed on sheep carcasses (n=97) of which the liver and lungs had been harvested at slaughter because of the presence of HC.

Among 126 examined sheep, 106 were considered as infected by HC by US scanning, whereas 108 animals were detected at necropsy. Whatever the diagnostic method used; the total number of cysts increased significantly in function of age ($p<0.001$). Capacity of differentiation between viable and calcified cysts was similar for US scanning and necropsy. Sheep considered as negative by US scanning (n=32) were confirmed negative by necropsy, leading to a

specificity of US scanning of 100% (95% CI: 90-100%). Sensitivity of US scanning equaled 98% (IC: 92-99%).

Part 2 of the study evidenced that among 97 infected sheep, 78% (IC 95%: 72-83%) of the infected animals presented hepatics cysts. 56% (IC 95%: 54-59%) of cysts were located in the liver. Animals showing exclusively pulmonary cysts (22%) were slightly infected (mean of 2.6 cysts/animal; IC 95%: 2.1-3.3) in comparison to sheep with liver or with liver and pulmonary cysts (mean of 13.3 cysts/animal; IC 95%: 12.9-13.8).

In the present study, performed in the Middle Atlas of Morocco, hepatic ultrasound scanning in adult Timahdite sheep was shown to detect 98% of animals with liver cysts. Considering that 22% of infected sheep did not show liver cysts, a detection capacity by US scanning of ~76.4 % could be expected.

Introduction

Cystic echinococcosis (CE) is one of the most important anthropozoonoses in Mediterranean areas (Lahmar et al., 2007). It is caused by the metacestode larval stage, hydatid cyst (HC) of the tapeworm *Echinococcus granulosus* (*E. granulosus*). In humans and domestic livestock, especially sheep, larval infection is characterized by long-term growth of HC that contain brood capsules and protoscoleces (Zhang et al., 2006b). The adult stage of the parasite *E. granulosus* lives in the small intestine of canids and more particularly in dogs as definitive host. An increase in CE in farmed animals has been observed in correlation with an increase in the prevalence of infections in the canine population and especially in stray dogs (Dalimi et al., 2017; Yong et al., 2019). In rural zones of Morocco, stray dogs are abundant and have a significant higher risk of infection compared to owned dogs (Amarir et al., 2020). Livestock (intermediate host) like sheep in Middle Atlas are strongly infected by HC, leading to economic losses due to organ seizures (mainly liver and lungs) estimated to US $ 100 000 per year (Derfoufi et al., 2012). Humans are accidental host, and an annual incidence of 7.04 per 100,000 inhabitants is recorded in endemic areas of Morocco (Tahiri et al., 2019). The diagnosis of cystic hydatidosis in men is based on ultrasound (US) and is recognized as the most effective method for hepatic hydatid cyst detection. Indeed, viable HC appear at ultrasound with a circular, anechogenic outer membrane surrounding a hyperechogenic liquid content. The interior of the cyst may contain particulate or rounded material corresponding to hydatidic gallstones or daughter vesicles (Guarnera et al., 2001). US is a non-traumatic method, without

any adverse effects, very easy to carry out and providing indications on the state of development and nature of the cysts (viable or dead calcified cyst).

The implementation of any hydatidosis control program in domestic livestock will require prior knowledge of the epidemiological situation in the area of interest. This implies detection of HC in hosts' organs, especially the liver, as well as the distinction between viable (containing hydatic fluid with alive protoscoleces) and calcified cysts. Indeed, calcified cysts might be present in an organ, but do not allow to contribute to dogs' infestation (Dore et al., 2014). Post-mortem inspection is essentially performed in slaughterhouses, which limits the investigation to animals that are not representative of the livestock population an whose composition might vary throughout the year. Moreover, in regions such as the Middle Atlas Mountains in Morocco known to be strongly affected by hydatidosis in sheep (Tahiri et al., 2019), long distances might separate farms from slaughterhouses, thereby reducing the ability to locate herds with high or low prevalence of hydatidosis. As farm slaughtering is poorly acceptable and unpracticable at a large scale, a non-invasive in vivo method is necessary to assess outcome of HC control programs, especially if they are very locally implemented. In such cases, on-farm US scanning of the liver of a representative number of livestock animals appears as the most appropriate option.

Indeed, it has been shown in Kenya that the prevalence of infestation recorded in sheep diagnosed by ultrasound and followed by post-mortem examination was 15.3% (Maxson et al., 1996; Sage et al., 1998). Other authors confirm that US can be used as an effective tool for a mass screening approach and may also represent a method of choice for the diagnosis of cystic hydatidosis in live sheep (Guarnera et al., 2001; Lahmar et al., 2007).

The objectives of this study, performed in sheep of different ages in the Middle Atlas in Morocco, were (1) to compare HC detection, HC count and cysts classification into viable and calcified by ante-mortem hepatic US scanning and post-mortem macroscopic hepatic inspection (part 1) and (2) to asses by a comparative post mortem liver and lung inspection in as far hepatic US scanning would fail to detect sheep with exclusive location of HC in the lungs (part 2).

Materiels and methods

Study area

Part 1 of this study was conducted in a slaughterhouse of M'Rirt in the Middle Atlas of Morocco. This region is the second municipality in the province of Khenifra and is located at

an altitude of 1,113 m, at 30 km north from Khenifra city. The Middle Atlas is a mountainous massif, stretched over about 350 km, from the South-West to the North-East of Morocco, located between the Rif and the High Atlas, and covering a total area of 2.3 million hectares. Pastoralism is the primary economic resource of this region and relies on more than three million Timahdit breed sheep. The population of M'Rirt city is about 45 000 inhabitants of Amazigh origin from the Aït Sgougou Tribe. The animals slaughtered in M'rirt originated from the different areas of the Middle Atlas, known for its high endemicity of hydatidosis (Azlaf & Dakkak, 2006). Carcasses for part 2 were harvested in several slaughterhouses located in the same region.

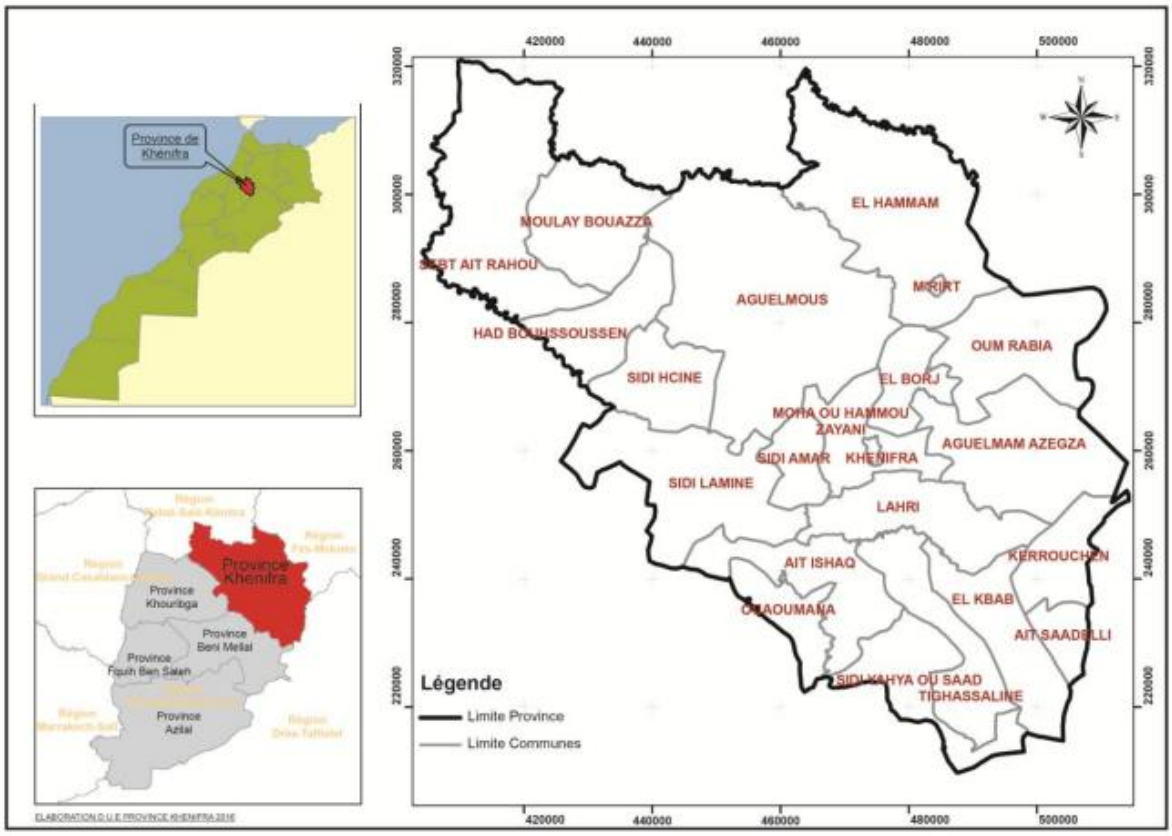


Figure 1: Location of the study area (Ref:https://siredd.environnement.gov.ma/BeniMellalKhenifra/Content/images/documents/Lies/monographie%20environnemental%20khenifra_finale.pdf)

Study design

Part 1 of this study was performed between March and April 2018 and enrolled 126 sheep available for slaughter. Ante-mortem liver US was performed, followed by macroscopic post-mortem inspection of the liver. Presence or absence of cysts, cyst count and distinction between viable and calcified cysts was performed by US and post-mortem inspection. Part 2 was

performed between June and July 2019 on sheep carcasses (n=97) of which the liver and lungs had been harvested at slaughter because of the presence of HC.

Animals

126 ewes of the Timahdite breed, originating from different regions of the province of Khenifra (Elkebab, Ait Ishak, Oum RabiA, El Borj, Aguelmous, El Hammam and others), and available for slaughtering at M'Rirt abattoir were enrolled for part 1 of the study. Investigators were present during 30 days at the slaughterhouse and enrolled all available sheep. Animals' age was estimated by teeth inspection.

For part 2, 97 Timahdite ewes slaughtered in several abattoirs of the region and showing HC in liver and or lungs were investigated. All infected carcasses available during 60 days of investigation were included.

Antemortem hepatic ultrasound examination

Sheep of part 1 were sheared between the 6th and 13th right ribs and below the right costal arch. Gel was applied to the shaved skin in order to improve probe-skin contact. US examination was performed using a mobile ultrasound machine (TITAN ultrasound System ref P08830-02 SonoSite, 3,5 MHz sector probe). Systematic scanning was performed below a horizontal line passing through the scapula-humeral joint and from the 7th to the 12th intercostal space by directing the probe towards the scapula-humeral joint of the left shoulder (Dore et al., 2014; Hussein & Elrashidy, 2014; Scott & Sargison, 2010), thereby allowing scanning of the totality of the liver (Dore et al., 2014) (Figure 2).

Figure 2: Scanning sheep for hydatid cyst detection

If present, cysts were scanned in detail in order to qualify them as viable and fertile or unviable and calcified. Anechogenic content due to hydatic liquid and a well delimited circular border were observed in case of a viable cyst (Figure 3a), whereas echogenic content and poorly defined external borders were considered as a calcified cyst (Figure 3b).

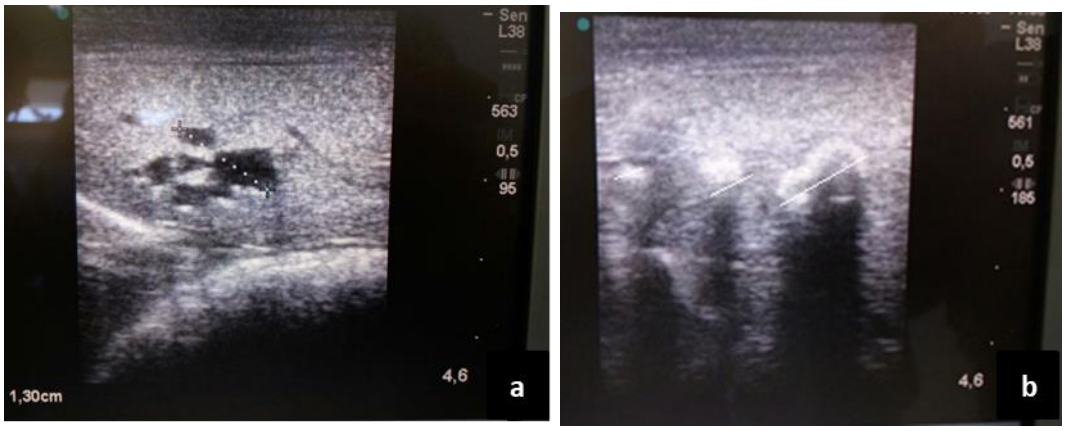


Figure 3: Ultrasound inspection of sheep liver; (a) viable hydatic cyst; (b) calcified hydatic cyst

Post-mortem macroscopic examination

All sheep of part 1 examined by ultrasound were slaughtered and their liver was carefully examined by visual inspection followed by systematic incisions to detect deep cysts. Cysts were counted and recorded as viable when they were well delimited and liquid-filled and as calcified when their outer membrane was irregular and if content was at least partially solid. Given working conditions of the slaughterhouse, combined examination of liver and lungs was not realized.

Part 2 of the study did only enroll liver and lungs of sheep presenting HC in at least one of the inspected organs. Only viable cysts were taken into consideration: their localization (liver or lungs) and number was recorded for each liver-lung complex.

Statistical analysis

Part 1: A negative binomial regression of the abundance of viable cysts was used with age as continuous explanatory variable. US sensitivity was evaluated in a logistic regression of US scan binary outcome of necropsy infected animals only, without explanatory variables. Specificity was calculated using necropsy negative animals as reference. Confidence intervals were calculated using the exact method when 100% of the samples were positive or negative. Finally, the abundance of cysts detected by US was compared to the number of cysts in the liver

at necropsy in a Poisson regression using the US outcome as response and the number of cysts in the liver as exposure, only for animals that had at least one cyst in the liver at autopsy.

Part 2: The proportion of liver positive animals among infected animals (with cysts either in the lung or the liver) was analyzed in a robust logistic regression (using place as primary sampling unit). Similarly, a negative binomial regression was used to evaluate the abundance of cysts in the liver using the total number of cysts (lungs + liver) as exposure. Finally, we evaluated the number of cysts in lungs when the liver was negative and the number of cysts in liver and lungs when the liver was infected using negative binomial regressions.

Results

Among 126 examined sheep, 106 were considered infected with HC by US scanning, whereas 108 animals were detected infected at necropsy. Whatever the diagnostic method used, the total number of cysts increased significantly in function of age ($p<0.001$) (Figure 4). Capacity of differentiation between viable and calcified cysts was similar for US scanning and necropsy (Table 1). Sheep considered as negative by US scanning (n=32) were confirmed negative by necropsy, leading to a specificity of US scanning of 100% (95% CI: 90-100%). Sensitivity of US scanning equaled 98% (IC: 92-99%).

Table 1. Detection and characterization of hepatic hydatic cysts in function of age by ultrasound and necropsy

			Estimated age (years)					
		Total	1	2	3	4	5	6 and more
Number of examinated sheep		**126**	15	19	16	30	26	20
Ultrasound examination	Number of positive sheep	**106**	0	15	15	30	26	20
	% of positive sheep	**84**	0	79	94	100	100	100
	Number of cysts (total)	**766**	0	34	55	148	248	281
	Number of viable cysts	**627**	0	24	39	111	221	232
	Number of calcified cysts	**139**	0	10	16	37	27	49
	% of viable cysts	**82**	0	71	71	75	89	83
Necropsy	Number of positive sheep	**108**	0	16	16	30	26	20
	% of positive sheep	**86**	0	84	100	100	100	100
	Number of cysts (total)	**787**	0	35	56	148	252	296
	Number of viable cysts	**648**	0	25	40	111	226	246

	Number of calcified cysts	**139**	0	10	16	37	26	50
	% of viable cysts	**82**	0	71	71	75	90	83

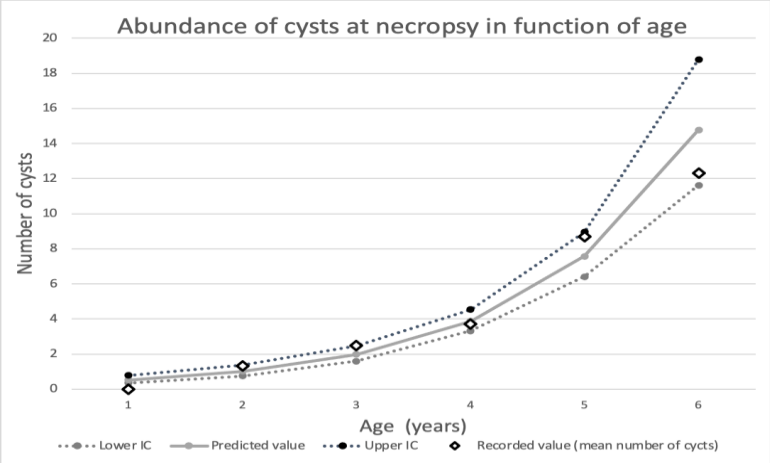


Figure 4: Abundance of cysts at necropsy in function of age

Part 2 of the study evidenced that among 97 infected sheep, 53 showed HC in the liver and the lungs, 23 showed exclusively hepatic cysts and 21 exclusively pulmonary cysts. 566 hepatic and 503 pulmonary viable cysts were recorded. According to the logistic regression, 78% (IC 95%: 72-83%) of the infected animals presented hepatics cysts. By considering results of negative binomial regression on the abundance of cysts in the liver in relation to the total number of cysts counted in the animal, 56% (IC 95%: 54-59%) of cysts were located in the liver. Animals showing exclusively pulmonary cysts were poorly infected (mean of 2.6 cysts/animal; IC 95%: 2.1-3.3) in comparison to sheep with liver or with liver and pulmonary cysts (mean of 13.3 cysts/animal; IC 95%: 12.9-13.8).

Discussion

The aim of this study was to assess the diagnostic performance of hepatic US scanning for HC in sheep in the Middle Atlas of Morocco, a region well known for its endemicity of *E. granulosus* (Tahiri et al., 2019). The first part of this study compared US scanning findings with necropsy findings after slaughtering in 126 Timahdite sheep aged between 1 and 6 years and raised in a highly endemic region. The ability to differentiate by US scanning between viable and calcified cysts was further evaluated. The second part of this study investigated the cyst location in liver-lung blocks of infected Timahdite sheep of the same region their cyst location. Thereby, the probability of non-detection of hydatidosis by considering the liver as the sole diagnostic target was evaluated.

Although both parts of this investigation contributed to our objective, a combined approach allowing calculation of specificity, sensitivity and positive predictive value in animals belonging to different age and thereby risk groups, would have been preferable. Technical and logistical constraints encountered for part 1 lead to the stepwise design adopted in this study.

Regarding the US scanning and necropsy comparison, our results indicate a surprisingly high sensitivity of US. Although our results are in line with previous studies which reported sensitivity and specificity of 80% and 100%, respectively (Hussein & Elrashidy, 2014), the excellent sensitivity of hepatic US was unexpected. Several factors favoring cysts detection by US scanning might be considered. Our results indicate that cyst abundance strongly increased with age (Figure 4), which was in line with earlier studies. Indeed, Guarnera reported a high number of hydatid cysts in the liver in sheep over 1 year of age (Guarnera et al., 2001). Among animals aged between 1 and 14 years, from three regions in Tunisia, the highest prevalence was determined in animals over 8 years of age (40.4%) (Lahmar et al., 2007). Similarly, Lahmar et al. (1999) reported that 98% of slaughtered sheep in Tunisia aged 5 years and more were positive. Finally, a study conducted by El Berbri in Morocco reported that the prevalence of hydatid cyst infestation showed a significant correlation with age in sheep over 3 years of age that are highly infected with prevalence of 64.0% (El Berbri et al., 2015b). The impact of age on the increased development of hydatid cysts could be mainly related to a higher reinfestation caused by the exposure of animals to risk in an environment heavily contaminated by *E. granulosus* eggs. Also, low immunity in very young animals favors the appearance of cysts in adulthood since it takes 4 to 13 months for a cyst to reach a detectable size (McConnell and Green, 1979). Given that 73% of the investigated sheep in our study were at least 3 years old and were all infected with at least 2-3 hepatic cysts, the probability of detection was optimal in a large proportion of the investigated animals. Moreover, sheep of the Timahdite breed are rather tall and small-sized, with relatively poor muscle development and poor fat deposits, thereby facilitating US inspection. Indeed, careful hepatic US allows detailed visualization of almost all liver structures in small ruminants (Dore et al., 2014). The excellent differentiation capacity between viable and calcified cysts by using US (Table 1) was another interesting result of potential interest. Indeed, according to Dore et al., (2014), the diagnostic performance of US reached a sensitivity of 100% when only viable cysts were taken into account.

It is known that HC are mainly located in the liver of intermediate hosts. Indeed, Mao et al., (2017) quantified HC by CT scan in 53 Chinese sheep presenting hepatic cysts. Among those, 42 sheep also presented lung cysts. In addition, among 1054 cysts identified, 840 (80 %)

were located in the liver and 214 (20%) in the lungs. The average number of cysts in the liver was significantly higher than in the lungs (15.85 *versus* 5.10). Our results are partially in line with these findings. Indeed, it appeared that a similar amount of viable cysts were located in the liver (566) and the lungs (503). Such differences could be age-related as it can be expected that hepatic daughter cysts might enhance the development of pulmonary cysts. Given that the first target of parasite larvae absorbed through the intestines of the intermediate host is the liver, this almost equal distribution of cysts might appear surprising. Pulmonary location would suggest that parasite larvae migrate through the lymphatic system. It is nevertheless reassuring that animals showing exclusively pulmonary cysts appeared as almost 5 times less infected when considering the mean number of cysts per animal.

Reliable diagnosis HC by US scanning in sheep is of interest when control programs have to be implemented. In most studies evaluating the impact of a control measure on development of HC in the intermediate host, presence, nature (viable or calcified) and number of cysts at necropsy are considered at quantifiable endpoints (Dore et al., 2014). The disadvantage of this approach based on necropsy as the "gold standard" is the need for euthanasia or slaughtering, which strongly limits data collection. Indeed, ethical, economical, zootechnical and logistical considerations render post-mortem measurements difficult. In this context, in vivo US scanning might be of benefit, either as single or as complementary diagnostic tool. Due to its poorly invasive character, the rapidity of the procedure and the possibility to use it in farms, US scanning appears as a valuable alternative. The qualification of the investigator concerning his ability to perform the examination of the whole liver and to interpret the results appropriately are however important (Guarnera et al., 2001). Moreover, sensitivity of US scanning needs to be known in the given epidemiological context and the risk of non-detection of cysts, located either in the liver or in the lungs, must be taken into account. In the present study, performed in the Middle Atlas of Morocco with a prevalence of 45% of HC in adult Timahdite sheep (Azlaf & Dakkak, 2006), hepatic ultrasound scanning was shown to detect 98% of animals with liver cysts. Considering that 22% of infected sheep did not show liver cysts, a detection capacity by US scanning of ~76.4 % could be expected.

References

Amarir, F. E., Saadi, A., Marcotty, T., Rhalem, A., Oukessou, M., Sahibi, H., Obtel, M., Bouslikhane, M., Sadak, A., & Kirschvink, N. (2020). Cystic echinococcosis in three locations in the Middle Atlas, Morocco: Estimation of the infection rate in the dog

reservoir. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 20(6), 436–443. https://doi.org/10.1089/vbz.2019.2538

Azlaf, R., & Dakkak, A. (2006). Epidemiological study of the cystic echinococcosis in Morocco. Veterinary Parasitology, 137(1–2), 83–93. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.003

Dalimi, A., Shamsi, M., Khosravi, A., & Ghaf-Farifar, F. (2017). Genotyping *Echinococcus granulosus* from canine isolates in ilam province, west of Iran. Iranian Journal of Parasitology, 12(4), 614–621.

Derfoufi, O., Akwa, E. N., Elmaataoui, A., Miss, E., Esselmani, H., Lyagoubi, M., & Aoufi, S. (2012). Profil épidémiologique de l'hydatidose au Maroc de 1980 à 2008. Annales de Biologie Clinique, 70(4), 457–461. https://doi.org/10.1684/abc.2012.0727

Dore, F., Varcasia, A., Pipia, A. P., Sanna, G., Pinna Parpaglia, M. L., Corda, A., Romig, T., & Scala, A. (2014). Ultrasound as a monitoring tool for cystic echinococcosis in sheep. Veterinary Parasitology, 203(1–2), 59–64. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.016

El Berbri, I., Petavy, A. F., Umhang, G., Bouslikhane, M., Fassi Fihri, O., Boué, F., & Dakkak, A. (2015). Epidemiological Investigations on Cystic Echinococcosis in North-West (Sidi Kacem Province) Morocco: Infection in Ruminants. Advances in Epidemiology, 2015, 1–9. https://doi.org/10.1155/2015/104025

Guarnera, E. A., Zanzottera, E. M., Pereyra, H., & Franco, A. J. (2001). Ultrasonographic diagnosis of ovine cystic echinococcosis. Veterinary Radiology and Ultrasound, 42(4), 352–354. https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2001.tb00953.x

Hussein, H. A., & Elrashidy, M. (2014). Ultrasonographic features of the liver with cystic echinococcosis in sheep. Veterinary Record Open, 1(1), e000004. https://doi.org/10.1136/vropen-2013-000004

J. D. McConnell and R. J. Green. (1979). The control of hydatid disease in Tasmania. Australian Veterinary Journal, 55.

Lahmar, S., Chéhida, F. Ben, Pétavy, A. F., Hammou, A., Lahmar, J., Ghannay, A., Gharbi, H. A., & Sarciron, M. E. (2007). Ultrasonographic screening for cystic echinococcosis in

sheep in Tunisia. Veterinary Parasitology, 143(1), 42–49. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.001

Lahmar, S., Kilani, M., Torgerson, P. R., & Gemmell, M. A. (1999). *Echinococcus granulosus* larvae in the livers of sheep in Tunisia: The effects of host age. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 93(1), 75–81. https://doi.org/10.1080/00034989958825

Lahmar, Selma, Lahmar, S., Boufana, B., Bradshaw, H., & Craig, P. S. (2007). Screening for *Echinococcus granulosus* in dogs: Comparison between arecoline purgation, coproELISA and coproPCR with necropsy in pre-patent infections. Veterinary Parasitology, 144(3–4), 287–292. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.10.016

Mao, R., Qi, H., Pei, L., Hao, J., Dong, J., Jiang, T., Ainiwaer, A., Shang, G., Xu, L., Shou, X., Zhang, S., Wu, G., Lu, P., Bao, Y., & Li, H. (2017). CT Scanning in Identification of Sheep Cystic Echinococcosis. BioMed Research International, 2017. https://doi.org/10.1155/2017/4639202

Maxson, A. D., Wachira, T. M., Zeyhle, E. E., Fine, A., Mwangi, T. W., & Smith, G. (1996). The use of ultrasound to study the prevalence of hydatid cysts in the right lung and liver of sheep and goats in Turkana, Kenya. International Journal for Parasitology, 26(11), 1335–1338. https://doi.org/10.1016/S0020-7519(96)00124-5

Sage, A. M., Wachira, T. M., Zeyhle, E. E., Weber, E. P., Njoroge, E., & Smith, G. (1998). Evaluation of diagnostic ultrasound as a mass screening technique for the detection of hydatid cysts in the liver and lung of sheep and goats. International Journal for Parasitology, 28(2), 349–353. https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00187-2

Scott, P. R., & Sargison, N. D. (2010). Ultrasonography as an adjunct to clinical examination in sheep. Small Ruminant Research, 92(1–3), 108–119. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.04.011

Tahiri, S., Naoui, H., Iken, M., Azelmat, S., Khallayoune, M., Bouchrik, M., & Lmimouni, B. E. (2019). Genotyping of human *Echinococcus granulosus* cyst in Morocco. Journal of Parasitic Diseases, 43(4), 560–565. https://doi.org/10.1007/s12639-019-01127-1

Yong, T. S., Lee, K. J., Shin, M. H., Yu, H. S., Suvonkulov, U., Sergeevich, T. B., Shamsiev, A., & Park, G. M. (2019). Prevalence of Intestinal Helminth Infections in Dogs and Two

Species of Wild Animals from Samarkand Region of Uzbekistan. Korean Journal of Parasitology, 57(5), 549–552. https://doi.org/10.3347/kjp.2019.57.5.549

Zhang, W., Zhang, Z., Shi, B., Li, J., You, H., Tulson, G., Dang, X., Song, Y., Yimiti, T., Wang, J., Jones, M. K., & McManus, D. P. (2006). Vaccination of dogs against *Echinococcus granulosus*, the cause of cystic hydatid disease in humans. Journal of Infectious Diseases, 194(7), 966–974. https://doi.org/10.1086/506622

ETUDE 3 : L'évaluation de l'efficacité du vaccin EG95NC⁻ sur le développement de kystes hydatiques chez le mouton

Cette étude est présentée sous forme d'article soumis au journal PLOS Neglected Tropical Diseases.

Présentation de l'étude

Cette étude longitudinale cas-témoin a consisté à évaluer dans 4 sites d'investigation situés au Moyen Atlas si le vaccin EG 95 NC- administré dès le jeune âge suivi par des rappels annuels à des moutons permet d'éviter le développement de kystes hydatiques. 402 agnelles ont été vaccinées dès l'âge de 2 mois et 395 agnelles ont servi de témoin non vacciné. Afin d'évaluer si un contrôle de l'infection par *E. granulosus* chez le chien permet de contribuer à la réduction de l'incidence du kyste hydatique chez le mouton, une chimioprévention des chiens à propriétaire a été mise en place dans le site d'investigation n°2. La présence de kystes hydatiques viables et calcifiés a été évaluée par échographie hépatique ou autopsie au terme de 4 années chez des moutons vaccinés et des moutons témoins dans les 4 sites d'investigation. La prévalence d'infection des chiens sous chimioprévention au site n°2 a été évaluée par coproscopie régulière chez environ 10% des chiens traités. Son impact sur l'incidence du kyste hydatique chez le mouton a été évaluée en comparant les résultats obtenus chez les moutons du site n°2 avec ceux du site n°1, présentant des caractéristiques similaires au site n°2.

L'analyse de proportion de moutons témoins infectés dans les sites n°1, 3 et 4 confirme le caractère endémique de l'hydatidose dans la région mais révèle des différences entre sites : entre 61% (46 - 74) et 78% (70 - 84) des animaux non vaccinés et investigués en fin d'étude (n=213) ont présenté des kystes hydatiques viables détectés à l'autopsie ou à l'échographie.

La chimioprévention pendant 4 années des chiens à propriétaire dans le site n°2 a permis de réduire le pourcentage de chiens infectés de 35% à 12%. En comparant l'incidence et l'abondance des kystes détectés chez les moutons entre les sites n°2 (avec chimioprévention des chiens) et n°1 (sans chimioprévention des chiens), une réduction non-significative a été mise en évidence au site n°2.

Quant à l'impact du vaccin, le pourcentage de moutons présentant des kystes hydatiques viables était significativement réduit chez les animaux vaccinés (9% versus 73%). Une plus grande proportion de moutons vaccinés présentait des kystes calcifiés, mais sans que cet effet ne soit significatif (45% versus 38%). Le risque d'infection des moutons vaccinés était de 3% par rapport à celui des animaux témoin.

Les résultats de cette 3e étude suggèrent que la vaccination des moutons par le EG95 a le potentiel de réduire le niveau de l'infection par l'échinococcose kystique. Dans les circonstances épidémiologiques existant dans la zone d'essai, un traitement quadrimestriel des

chiens à propriétaire avec du praziquantel était insuffisant pour obtenir un impact mesurable sur la transmission d'*E. granulosus* aux moutons.

Control of cystic echinococcosis in the Middle Atlas, Morocco: field evaluation of the EG95 vaccine in sheep and cesticide treatment in dogs

Fatimaezzahra Amarir [1,2,3], Abdelkbir Rhalem [1], Abderrahim Sadak [3], Marianne Raes [2], Mohamed Oukessou [5], Aouatif Saadi [1,4], Mohammed Bouslikhane [1], Charles G. Gauci [6], Marshall W. Lightowlers [6], Nathalie Kirschvink [2] and Tanguy Marcotty [2]

1 Laboratory of Parasitology, Department of Pathology and Veterinary Public Health, Hassan II Agronomy and Veterinary Institute (IAV), Rabat, Morocco.

2 Integrated Veterinary Research Unit, Department of Veterinary Medicine, Namur Research Institute for Life Sciences (NARILIS), University of Namur, Belgium.

3 Laboratory of Zoology and General Biology, Parasitological and Ecological Unit, Faculty of Sciences, Mohammed V University, Rabat, Morocco.

4 Fundamental and Applied Research for Animals and Health (FARAH), University of Liège, Liège, Belgium.

5 Unit of Physiology and Therapeutics, Department of Veterinary Biological and Pharmaceutical Sciences, Hassan II Agronomic and Veterinary Institute, Rabat, Morocco.

6 Faculty of Veterinary and Agricultural Sciences, University of Melbourne, Australia.

** Corresponding author:*

E-mail: amarir.f@gmail.com *(FEA)*

Abstract

Cystic echinococcosis (CE) is an important cause of human morbidity and mortality worldwide, particularly in Morocco and other North African countries. We investigated the potential of three strategies to reduce *Echinococcus granulosus* transmission: (1) 4-monthly treatment of dogs with praziquantel, (2) vaccination of sheep with the EG95 vaccine and (3) a combination of both measures. These measures were implemented during four consecutive years in different areas of the Middle Atlas Mountains in Morocco. The outcome of the interventions was assessed through hydatid cyst (viable and non-viable) counts in liver and lungs using necropsy or in vivo ultrasound examination of the liver. A total of 402 lambs were recruited for annual vaccination with the EG95 anti-*E. granulosus* vaccine and 395 similar lambs were selected as non-vaccinated controls. At approximately four years of age the relative risk (estimated as odds ratio) for vaccinated sheep to have viable hydatid cysts compared with non-vaccinated controls was 3% (9.37% of the vaccinated sheep were found infected while 72.82% of the controls were infected; p=0.002). The number of viable cysts in vaccinated animals was reduced by approximately 97% (mean counts were 0.28 and 9.18 respectively; p<0.001). An average of 595 owned dogs received 4-monthly treatment during the 44 months

trial, corresponding to 91% of the owned dog population. Approximately, 5% of them were examined for *E. granulosus* adult worms by arecoline purge or eggs in feces (confirmed by PCR). The proportion of infected dogs significantly decreased after treatment (12% versus 35%; $p<0.001$). Post-treatment incidence of re-infestation corresponded to a monthly risk of 4% (95% CI: 3-6%). Treatment of owned dogs on a 4-monthly basis did not reduce the level of transmission of *E. granulosus* to sheep, nor did it enhance the level of control generated by vaccination of sheep with EG95, possibly because of unowned dogs and wild canids were not treated. These data suggest that vaccination of sheep with EG95 has the potential to reduce the level of CE in Morocco and in other parts of the world with similar transmission dynamics. Under the epidemiological circumstances existing in the trial area, 4-monthly treatment of owned dogs with praziquantel was insufficient to have a major impact of *E. granulosus* transmission to sheep.

Keywords: Recombinant EG95 vaccine, cystic echinococcosis, sheep, dog, praziquantel, Morocco

Author summary

Cystic echinococcosis remains a major public health problem in Morocco. It is a major zoonosis affecting humans and animals caused by the larval stage of the cestode *Echinococcus granulosus*. The dog (final host), plays an essential role in the dissemination of eggs in the environment via its feces. The rural and poorest regions in the Middle Atlas that practice extensive sheep farming (intermediate host) are severely affected. Women and children are particularly affected by this zoonosis. Despite previous efforts done by the Moroccan authorities to reduce the incidence of infestation, these measures have been insufficient to control the disease. Through our study protocols in natural field conditions, we have shown that vaccination of the intermediate host is an effective control option in the Moroccan context, with an immune protection rate of 97%. Regular dog chemotherapy (4 months intervals) of owned dogs only proved to have little efficiency on incidence in sheep.

Introduction

Cystic echinococcosis is one of the most important zoonotic diseases prevailing in different parts of Morocco (El Berbri et al., 2015b; S. Tahiri et al., 2020), as well as in other countries of North Africa and the Middle East (Sadjjadi, 2006). Cystic echinococcosis is caused by the metacestode larval stage of the cestode *Echinococcus granulosus* (Rojas (a) et al., 2014)

in humans as accidental hosts and a range of herbivores as natural intermediate hosts (Rojas et al., 2013). Dogs act as the definitive hosts and play an essential role in the dissemination of parasite eggs into the environment via their feces and contaminated fur (Azlaf et al., 2007; Dakkak, 2010; Amarir et al., 2020). In Morocco, areas with extensive sheep farming are severely affected since sheep are a very common intermediate host. The parasite's cycle is poorly understood by the population, which severely affects compliance to the recommended hygiene measures aiming at reducing disease transmission (Thys et al., 2019). Battelli, advocated for the integration of social, political and economic factors and argued for better use of available resources and adaptation of control strategies to the regional context (Battelli, 2009).

Although a control strategy was formulated for Morocco in 2007 (Comité Interministériel de Lutte contre L'Hydatidose, 2007), inconsistent efforts were made to implement the strategy and little seems to have changed in the incidence of cystic echinococcosis in the country in the ensuing years. The strategy aimed to (i) break the biological cycle of the parasite using a cestocidal anthelmintic in dogs and reduce infection in ruminants and humans, (ii) detect and treat human cases early and (iii) elaborate an appropriate legislative and regulatory arsenal (Comité Interministériel de Lutte contre L'Hydatidose, 2007). In other parts of the world, some control strategies have been successful, particularly those undertaken on islands (Iceland, New Zealand, Tasmania, Islas Malvinas and Cyprus), as well as in a limited number of continental regions (Chile, Argentina, Uruguay) (Craig et al., 2017b). Successful control programs focused on the improved infastructure of slaughterhouses, the use of purgatives and cestocides in dogs and the regulation of sheep slaughter at home. A number of control programs had limited success (Craig et al., 2017b). The causes of failure to control cystic echinococcosis include: inadequate management of stray dogs, reliance on dog owners to implement dog treatments, inadequate public funding of control measures, inadequate baseline data collected to measure the progress of the program, the lack of qualified personnel and the premature termination of control program funding (Craig and Larrieu, 2006; Craig et al., 2017b).

A vaccine against *E. granulosus* was developed for use in sheep and other hosts. The vaccine, known as EG95 described originally by Lightowlers et al. (Lightowlers et al., 1996) consists of a recombinant protein (16.6 kDa) combined to glutathione-S-transferase (GST) and expressed in *Escherichia coli*. More recently a slight variant of the vaccine, being of 13.4kDa, was described and designated EG95NC^{-} (hereafter referred to as EG95), which has improved productivity in *E. coli* (Gauci, Jenkins and Lightowlers, 2011). This vaccine induces an immune

response which protects against a subsequent challenge infection with *E. granulosus* eggs (Lightowlers et al., 1996). The recombinant antigen is administered to animals together with Quil A or another suitable adjuvant. It typically induces >95% protection against infection while causing minimal injection site reactions or other side effects (Lightowlers et al., 1996; Heath, Jensen and Lightowlers, 2003; Gauci, Jenkins and Lightowlers, 2011). The vaccine was effective in reducing cystic echinococcosis in sheep in a field trial in Argentina (Larrieu et al., 2013) and has been adopted in China as part of the country's Nation Program for the Control of Echinococcosis (Ministry for Agriculture of the People's Republic of China, 2017).

Togerson and Heath (Torgerson and Heath, 2003a; Torgerson, 2006) used mathematical modelling to predict the impact of various options for control of cystic echinococcosis and recommended a combination of vaccination of intermediate hosts together with regular treatment of dogs with praziquantel (Torgerson and Heath, 2003a; Torgerson, 2006). These two components were predicted to break the live cycle of the parasite and their synergy predicted to decrease the time needed to achieve cystic echinococcosis control.

A high prevalence of *E. granulosus* infection has been recorded in animals and humans in the Atlas Mountains area of Morocco (Azlaf and Dakkak, 2006). This region is a hotspot of hydatid cyst infestation with an infestation prevalence of 91.7% in adult ewes (age > 4 years), and a prevalence of 1.9% in humans (Chebli et al., 2017). A large canid population is present in this area which includes owned dogs, stray dogs, jackals and foxes (Maghnouj, 1999). In 2019, the prevalence of *E. granulosus* reached 23 to 39% in owned dogs and 51% to 68% in stray dogs whereas the monthly incidence risk was 2 to 8% and 19 to 41% in owned and stray dogs respectively (Amarir et al., 2020). In order to evaluate the relevance of control strategies for cystic echinococcosis in Morocco, we carried out a field trial to assess the extent to which vaccination of sheep with the EG95 vaccine from an early age, with or without chemical treatment of *E. granulosus* infection in dogs (using praziquantel at four-month intervals) could reduce the occurrence of cystic echinococcosis in adult sheep. The study was carried out in the Atlas Mountains in Morocco.

Methods

Study area

Study sites were selected in the Middle Atlas Mountains, Morocco: El Kbab and Ait Ishaq (about 1100 m of altitude with surface area of 344 Km2 and 373 km2, respectively) in Khenifra province and Ain Leuh (Ain Leuh 1 at 1300m of altitude with surface area of 3.65 Km2 and Ain Leuh 2 at1650 m of altitude with surface area of 5.91 Km2) in Ifrane province (Fig 1). Sites are located between the Rif and the High Atlas, covering a total area of 2.3 million hectares. The Middle Atlas is a sheep breeding area with three million head of the Timahdit breed. The Middle Atlas comprises two very distinct geological structures: Table land and fold crossed by rivers, the Oum-Rabiâa and the Oued Guigou. The chain of the Middle Atlas consists of mountainous peaks including Tichoukt (2700 m), Jbel Fazaz, Bou Iblane and Bou Nasser (over 3000 m) which overlook the plain of Moulouya to the south. These mountainous regions are characterized by a continental Mediterranean mountain climate, cold and rainy in winter, hot and dry in summer. Annual precipitations vary between 350 (south-west) and 1100 mm (north-East). Snowfall occurs from December to April with variable accumulation ranging from 20 to 60 cm.

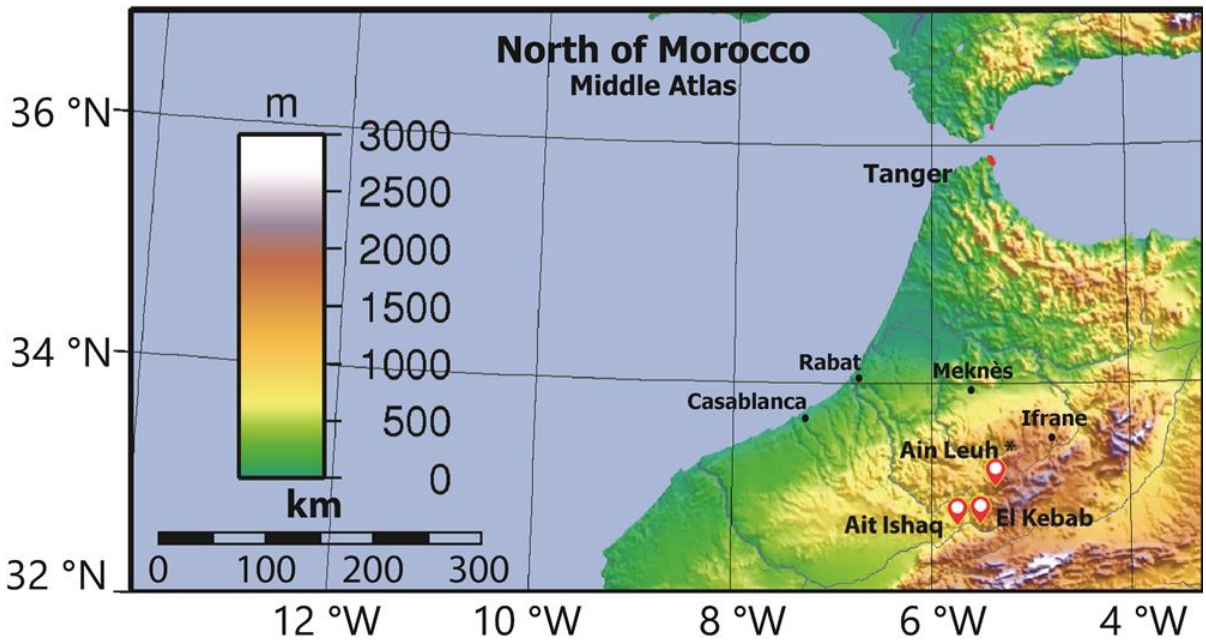


Fig 1. Location of the three study sites in the Middle Atlas, Morocco.

El Kbab, Ait Ishaq and Ain Leuh are rural areas, inhabited by Berbers, a Moroccan community speaking the Amazigh language. Their main source of income is based on farming Timahdit sheep. Farmers practice extensive and silvopastoral breeding. This breed is known for

the production of meat and wool. Farmers slaughter sheep for their own consumption on an ad hoc basis, but particularly on the feast of sacrifice (religious event) and during the sheep-shearing ceremony in the late spring. Males sheep tend to be slaughtered at an age of approximately one year while females, which are most frequently consumed in the rural regions, are slaughtered at an older age, up to six years. Farmers practice extensive and silvopastoral breeding. This practice begins in the morning and ends in the evening. Farmers are accompanied by their dogs, which help them to manage the movements of the sheep. Farmers are accustomed to feeding their dogs the viscera of sheep at slaughter, and those who do not feed it to dogs deliberately, generally do not destroy the infested offal, but discard it into the environment. Dogs are useful to protect the herds against wild predators such as jackals, which are abundant in these regions since their hunting is forbidden by law since 2012.

The choice of these regions for the study was based on the endemicity of cystic echinococcosis (Tahiri et al., 2019) and the importance and herd size of the sheep population, estimated to be 240 000 and 65000 animals in Aïn Leuh and El Kbab/Ait Ishaq regions, respectively (ONSSA, 2015). The human population is about 9600 in Ain Leuh and 35000 in the site of El Kbab and Ait Ishaq (HCP, 2014) with an annual incidence of cystic echinococcosis in the human population of 16 and 7.24 cases/100 000 inhabitants, respectively (Ministère de la Santé du Maroc, 2015). Based on the data published on *E. granulosus* prevalence in the region (Amarir et al., 2020), it was expected that about 50% of control sheep would present detectable infection after four years of natural exposure.

Study design

A total of 32 sheep breeders were recruited, including 10 in El kbab, 2 in Ait Ishak, 12 in Ain Leuh 1 and 8 in Ain Leuh 2. The field vaccination trial took place in two different settings: one where dogs were regularly treated with a cesticide (Ain Leuh 2) and the other where no treatment was given to dogs (Ain Leuh 1, Ait Ishaq, El Kbab). In each of these two settings, young female lambs were randomly selected at each breeder's farm were recruited and allocated randomly to either the vaccination or the control group. At each breeder the recruited lambs were divided into two groups: vaccinated and control. Only females were recruited for this study because males are usually not kept long enough by breeders. Male sheep were not recruited for the trial because they are rarely kept beyond 12 months of age and *E. granulosus* cysts have rarely been found to be fertile in sheep less than 2 years of age (Dueger & Gilman, 2001; Heath, 1973). Farmers were recruited based on their agreement to cooperate with the

requirements of the study. The animals belonged to local sheep breeders who were committed including permission to allow their animals to be vaccinated and monitored. The recruited sheep were followed for about a four years' time period during which a natural *E. granulosus* challenge was expected to occur. The infectious status of the sheep was then assessed through antemortem ultrasounds examination or post-mortem dissection, depending on the willingness of their owners. Sheep were slaughtered at the local abattoir with the owners' consent. The animals assessed for infection were determined by their being made available by the owners. The numbers of sheep recruited, allocated to the different groups and assessed in each site are shown in Table 1.

Table 1. Number of sheep recruited, vaccinated and assessed for *E. granulosus* infection by ultrasound (US) or after slaughter in each study site and the number of lost animals (drop outs); US and slaughter numbers are mutually exclusive.

Area	Dog chemotherapy	Sheep vaccination	Number recruited	Number of drop outs	Number dissected after 4 years of exposure
Ain Leuh 1	-	+	150	84	66
	-	-	149	11	68
Ain Leuh 2	+	+	80	57	20
	+	-	81	18	23
Ait Ishaq	-	+	90	62	10
	-	-	89	45	10
El Kbab	-	+	82	71	11
	-	-	76	45	13
Total			797	393	221

A total of 797 female lambs were recruited at the age of one week in October 2015. Among them, 402 lambs were selected for vaccination and 395 animals were used as unvaccinated controls. All animals were identified by ear tag and tattooed with numbers. An important number of animals (vaccinated and controls) were lost from the beginning of the study to the end (among 797 ewes recruited at the beginning of the study, 393 were lost at the end). This was mainly due to animals' sales as result of poor cooperation of some breeders, as well as to sheep mortality.

Ethics

This work has been authorized by the animal welfare and ethics committee in Rabat, Morocco, in 2015. The protocol was applied according to the international standards cited in many scientific references and in the 2012 OIE Manual titled “Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals”.

Immunization scheme

In December 2015, the vaccinated group received a primary EG95 vaccine immunization at about two months of age subcutaneously in the right neck region. The EG95 vaccine was prepared at the University of Melbourne, Australia, lyophilized together with the Quil A adjuvant and maintained refrigerated until use (Gauci, Jenkins and Lightowlers, 2011). Vaccine vials were rehydrated with sterile distilled water on the day they were to be used. The final dose was 1ml containing 50 µg antigen and 1mg adjuvant. A boost vaccine was administered one month later and subsequently annually during three years, in February 2016, 2017 and 2018. Only animals which became unavailable due to death or sale were lost to the study prior to its completion; all others received the full complement of vaccinations.

Cestocidal treatment of dogs and evaluation of *E. granulosus* infection in dogs

In the study site where dogs were treated, all owned dogs were attempted to be treated every four months with praziquantel (5 mg/kg), except puppies <2 months of age, from December 2015 to April 2019. The number of treated dogs (500 to 700 per treatment episode) fluctuated during the study due to mortality, births, transhumance, dog sales or losses (Table 4). The choice of the site (Ain Leuh 2) was based on the farmers' engagement to cooperate and authorization of treatment and monitoring of their dogs. Also, this site was distant enough from other regions to prevent dogs from one study site potentially interfering with *E. granulosus* transmission at other study sites (Ain Leuh 2 is 115 km from Ain Leuh 1). Additional sites were initially planned to carry out chemotherapy in dogs but were abandoned due to logistical problems. In the absence of repetitions, Ain Leuh 1 and Ain Leuh 2 were assumed comparable since they share a number of ecological and epidemiological characteristics: rural areas of the Ifrane province, characterized by the type of sheep breeding (silvopasture) and a large canine population. In Ain Leuh (1 and 2), 3382 owned dogs were enumerated (ONSSA, 2019) with 0.35 dogs per inhabitant, which is more than in other regions of the study. At each treatment, administrated by the investigators (A FE), faecal samples (non pooled) of 5 to 10% of the treated

dogs (all > 18 months of age) were screened for *E. granulosus* adult worms or eggs (including confirmation by PCR according to Amarir et al., 2020) after administration of arecoline hydrobromide (Tokyo Chemical Industry) 4 mg/kg body weight per os (Amarir et al., 2020).

Ultrasound screening of sheep

Ultrasound screening was performed at the end of the trial and used as an attempt to reduce the number of sheep slaughtered without affecting the statistical significance of the study. After 44 months of field exposure, 183 sheep were scanned with ultrasound, using a mobile ultrasound machine (TITAN ultrasound System ref P08830-02 SonoSite) with 3.5 MHz sectorial transducer. Sheep were prepared for ultrasound examination by shaving their wool on the right side of the body between the 7th and 12th intercostal spaces according to the protocol described by Hussein and Elrashidy (Hussein and Elrashidy, 2014). Only a part of the liver could be examined: the right lobe, around the gallbladder, the sus-hepatic vein and portal vein and only a small part of the left lobe. Lungs could not be scanned because of their echogenicity. The technique allowed the discrimination between liquid-filled and calcified liver cysts, considered viable and dead, respectively.

Necropsy of slaughtered sheep

In each region, animals to be slaughtered were identified by group and site and taken to the slaughterhouses of each region. At slaughter the liver, lung, spleen, heart and kidneys were examined for the presence of hydatid cysts. The kidneys and spleen were palpated to identify possible cysts, while the liver and lungs were cut into strips about 1cm thick, then further cut at about 4mm spacing using a scalpel blade, in search of cysts. Again, cysts were classified as viable (filled with liquid) and non-viable. Viable metacestodes of *Taenia hydatigena* were differentiated macroscopically. It was not possible to determine whether non-viable, calcified lesions were due to *E. granulosus*, *T. hydatigena* or some other cause. A total of 221 sheep were examined at post-mortem.

Statistical analysis

Different statistical models were developed in Stata 11 (Stata Corp) to:

- Evaluate the overall exposure (4 years) of control sheep in the different study sites and the corresponding annual incidence risk.

- Estimate prevalence and incidence risk of *E. granulosus* in dogs in Ain Leu 2 (area where dogs were treated).
- Compare the incidence in sheep in Ain Leu 1 and 2, where dogs were treated or not.
- Quantify the level of protection induced by the vaccine in sheep.

The *proportion* of non-vaccinated sheep detected with live *E. granulosus* cysts at necropsy and at necropsy or US scan in areas where dogs were not treated was analysed using logistic regressions (model 1 for necropsy data and model 3 for necropsy + US data). Sites and diagnostic tool (ultrasound or necropsy) were used as explanatory variables. Likelihood ratio tests were applied to compare nested models after removal of insignificant explanatory variables. Annual incidence risk was calculated assuming an exposure of 4 years and a period of 1 year needed for the cyst to become detectable after infection:

$$I_a=1-(1-p2I_e)^{\wedge}(1/3)$$

I_a = annual incidence risk; I_e = incidence risk for the four years exposure period

Similarly, abundance of cysts at necropsy was analyzed in a negative binomial regression (model 2) using sites as explanatory variable (US scanning did not allow accurate quantification of cysts since only part of the liver was screened).

The proportion of infected dogs in Aïn Leu 2 was analyzed using a logistic regression and time as categorical explanatory variable (model 4). This model was compared using a likelihood ratio test to a logistic regression using before or after the first treatment as single binary explanatory variable. Monthly incidence risk was calculated assuming an exposure of four months and a one month period needed to detect the infection(Amarir et al., 2020) and considering that all tested dogs had been treated four months before:

$$I_m = 1-(1-I_e)^{\wedge}(1/3)$$

I_m = monthly incidence risk; I_e = incidence risk for the 4-month exposure period

The absence of seasonal effect on incidence in dogs was verified using a likelihood ratio test comparing the latter model with a model including season (April, August or December) as categorical explanatory variable.

Cyst prevalence and abundance in sheep were compared in Ain Leuh 1 and 2 to evaluate the effect of dog therapy. Logistic (model 5 for necropsy data and model 7 for necropsy + US data) and negative binomial (model 6) regressions were applied as above on binary and count

data, respectively, using sheep vaccination, dog therapy and diagnosis as binary explanatory variables. Diagnosis was dropped as explanatory variable if $p<0.05$ in likelihood ratio test.

Finally, prevalence and abundance of viable and dead cysts were compared in vaccinated and control sheep using robust logistic and negative binomial regressions, respectively. Viable and dead cysts were used as responses in separate models (models 8-13, Table 2). Sheep vaccination and diagnostic method were used as binary explanatory variables. The latter was to drop if not significant ($p<0.05$ in likelihood ratio tests of non-robust regressions). Sites were used as random clusters.

Odds ratios (OR) were obtained from logistic regressions and used as proxy of relative risks whereas incidence rate ratios (IRR) generated by negative binomial regressions are indicative of relative abundance.

Table 2: Statistical models used to evaluate the effect of sheep vaccination on the occurrence and abundance of live and dead cysts detected in sheep at necropsy and ultrasounds in different sites.

Model	**Regression**	**Response**
8	Logistic	Binary: sheep with live cysts at necropsy
9	Logistic	Binary: sheep with dead cysts at necropsy
10	Negative binomial	Count: number of live cysts in sheep at necropsy
11	Negative binomial	Count: number of dead cysts in sheep at necropsy
12	Logistic	Binary: sheep with live cysts at necropsy or US
13	Logistic	Binary: sheep with dead cysts at necropsy or US

Results

E. granulosus incidence in sheep in the absence of dog therapy and sheep vaccination

The proportion of infected sheep and mean number of viable cysts found in non-vaccinated sheep from areas where dogs did not receive chemotherapy are summarized in Table 3. The prevalence recorded at necropsy was significantly higher in Ain Leuh than in Ait Ishaq and El Kbab ($p=0.001$ for both). This difference is significant between Ain Leuh 1 and Ait Ishaq ($p=0.03$) when including ultrasound data although there was no significant effect of the diagnostic method ($p=0.74$). No variations were detected in cyst abundance at necropsy across sites (likelihood ratio test: $p=0.3$).

Table 3. Proportion of non-vaccinated sheep detected as having viable *E. granulosus* cysts at necropsy alone or by either necropsy or ultrasound examination, calculated annual incidence risk, and mean number of viable cysts detected per animal with 95% confidence intervals.

Place	Viable cysts detected at necropsy				Viable cysts detected by necropsy or ultrasound		
	Number of observations	Proportion of infected sheep (model 1)	Annual risk (derived from model 1)	Mean number of viable cysts per infected animal (model 2)	Number of observations	Proportion of infected sheep (model 3)	Annual risk (derived from model 3)
Ain Leuh 1	68	0.88 (0.78-0.94)	0.51 (0.39-0.6)	10.35 (7.5- 14.28)	138	0.78 (0.7-0.84)	0.39 (0.33-0.46)
Ait Ishaq	10	0.4 (0.17-0.7)	0.15 (0.05-0.33)	4.2 (1.75- 10.03)	44	0.61 (0.46-0.74)	0.27 (0.18-0.36)
El Kbab	13	0.46 (0.22-0.71)	0.18 (0.08-0.34)	8.3 (3.95- 17.43)	31	0.74 (0.56-0.86)	0.36 (0.24-0.48)

The effect of dog therapy on *E. granulosus* prevalence in dogs

Details about the number of dogs treated with praziquantel at 4-month intervals and results of diagnostic tests in dogs are shown in Table 4. Over the duration of the trial, 6545 dog cestocidal treatments were delivered, ranging between 556 and 661 treatments at each treatment time. Arecoline purge assessments were undertaken on a total of 387 dogs, ranging between 27 and 63 at each assessment time. Most samples that were recorded positive for *E. granulosus* contained an abundance of worms, with only five samples positive for taeniid eggs without adult worms being found in the purge.

Table 4. Number of owned dogs treated and tested for *E. granulosus* infection in Ain Leuh 2 where dogs were treated at 4-month intervals with praziquantel. Initial assessments were undertaken in 2015 and the last assessments in 2019. Testing of praziquantel treated dogs was undertaken at the time of, but prior to, treatment

Date (month/year)	*12/15*	4/16	8/16	12/16	4/17	8/17	12/17	4/18	8/18	12/18	4/19
N. treated dogs (a)	*601*	556	660	661	535	582	614	572	630	584	550
N. tested dogs (b)	*63*	29	34	37	27	30	37	32	35	31	32
% tested dog (100*b/a)	*10*	5	5	6	5	5	6	6	6	5	6
N. dogs with adult worms (c)	*19*	5	2	5	5	3	4	5	2	4	3
N. dogs positive at PCR* (d)	*3*	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
N. positive dogs (c+d)	*22*	5	2	5	6	3	4	6	2	4	3
% positive dogs (100*(c+d)/b))	*35*	17	6	14	22	10	11	19	6	13	9
Consolidated % positive dogs before and after first treatment	*35*						12.7				

* Dogs without worms but with taeniid eggs which were confirmed as positive for *E. granulosus* by PCR. Data before first treatment is in italic.

The proportion of infected dogs was significantly lower after treatment (model 4: OR=0.26; p<0.001). The variability of the rate of infection observed during the period between the second (April 16) and the last treatment (April 19) was not significant (likelihood ratio test: p=0.58), nor was the seasonal effect (likelihood ratio test: p=0.89). At the start of the study (December 15), 35% of the dogs were infected (95% CI: 24-48%) whereas after treatment, 12% were infected (95% CI: 9-16%) on average. Given a treatment every 4 months and an assumed period of 1 month required for the infection to be detectable, this corresponds to a monthly incidence rate of 4% (95% CI: 3-6%).

The effect of dog therapy on *E. granulosus* incidence in sheep

Cyst incidence and abundance were compared between Ain Leuh 1 (without dog therapy) and Ain Leuh 2 (with dog therapy). Neither incidence nor abundance differed significantly among the two sites, though the effect of vaccination was significant, both on prevalence and abundance (Table 4). Diagnostic tools had no significant effect on the analysis (likelihood ratio test: p=0.2). Dog therapy OR and IRR present large confidence intervals as explanatory variable (Table 5), corresponding to rather imprecise estimations. Yet, the lower limits are larger than the corresponding vaccination OR and IRR denoting a weaker effect of dog therapy compared to vaccination.

Table 5. Effect of dog therapy on live cyst prevalence and abundance in sheep: odds ratios (for binary responses) or incidence rate ratios (for count response) and p values obtained for the two explanatory variables assessed in three models in Ain Leuh 1 and 2.

Model	Response	Explanatory variable	OR/IRR	P
5	Prevalence at necropsy	Vaccination*	0.01 (0.004-0.04)	<0.001
		Dog therapy	0.35 (0.12-1.01)	0.05
6	Abundance at necropsy	Vaccination*	0.02 (0.01-0.04)	<0.001
		Dog therapy	0.70 (0.39-1.26)	0.23
7	Prevalence at necropsy + US	Vaccination*	0.03 (0.01-0.06)	<0.001
		Dog therapy	0.65 (0.34-1.21)	0.18

* The effect of vaccination presented here should not be regarded as a result as such (because it is evaluated more accurately below in different sites) but as a reference to compare the effect of dog therapy.

The proportions of sheep infected with viable *E. granulosus* cysts and mean number of viable cysts in Ain Leuh 1 and 2 are summarized in Table 6.

Table 6. Ain Leuh 1 and 2: proportion of sheep with viable *E. granulosus* cysts at necropsy alone or either at necropsy or ultrasound examination and the mean number of viable cysts in vaccinated and control sheep in areas where dogs were treated or not (with 95% confidence intervals).

Place	Control procedures		Viable cysts detected at necropsy			Viable cysts detected by necropsy or US	
	Dog therapy	Sheep vaccination	Number of observations	Proportion infected sheep (model 5)	Mean number of viable cysts per animal (model 6)	Number of observations	Proportion infected sheep (model 7)
Ain Leuh 1	-	-	68	0.87 (0.77-0.93)	10.61 (7.65 – 14.72)	138	0.77 (0.70 - 0.83)
	-	+	66	0.08 (0.03 - 0.17)	0.22 (0.12 – 0.38)	66	0.08 (0.04 - 0.17)
Ain Leuh 2	+	-	23	0.71 (0.51 - 0.85)	7.40 (4.40 – 12.45)	63	0.69 (0.57 - 0.79)
	+	+	20	0.03 (0.008 - 0.09)	0.15 (0.07 – 0.32)	23	0.05 (0.02 - 0.13)

The effect of sheep vaccination on *E. granulosus* occurrence in sheep

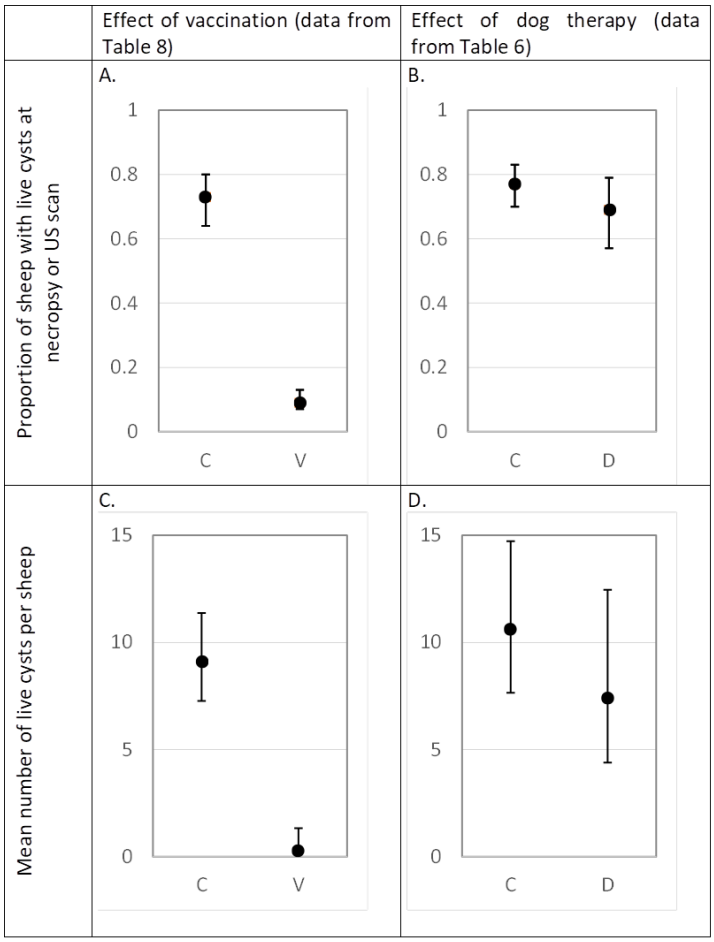
Vaccinated sheep had a relative risk of 3% to be infected with viable cysts compared to unvaccinated controls (OR= 0.03 and 0.038 at necropsy and necropsy + US, respectively) and the relative abundance of viable cysts was 3% (Table 7). The prevalence and abundance of dead cysts was higher in vaccinated sheep than non-vaccinated sheep. There was no significant difference in the prevalence and abundance of dead cysts in vaccinated sheep compared to non-vaccinated sheep. The mean proportions of vaccinated and control sheep infected with viable and dead cysts are presented in Table 8 with 95% confidence intervals. Mean abundances are also displayed in Table 8. Diagnosis methods had no significant effect. Confidence intervals were particularly wide for the proportion of animals with viable cysts at necropsy. This was associated to a rather large design effect (DEFT = 2.2; in a robust model, DEFT corresponds to the multiplication factor of the standard error of a non-robust model to account for intra-cluster correlation of the observations), indicating an important variability across sites. This problem was not observed when US data was added (DEFT = 1.01), which generated more precise estimates. Abundance of cysts in sheep were also estimated with a satisfactory level of precision (DEFT = 0.66 for the vaccination variable and 1.78 for the negative binomial distribution dispersion parameter) though only necropsy data were used to quantify cysts.

Table 7. Occurrence of viable and dead *E. granulosus* cysts in vaccinated and control sheep: odds ratios (for binary responses) or incidence rate ratios (for count response) and p values obtained for the two response variables (live or dead cyst) assessed in six models. Explanatory variable is vaccination (reference = control).

Model	Response	Cyst	OR/IRR (95% CI)	P
8	Necropsy incidence	Live	0.03 (0.002-0.52)	0.029
9		Dead	1.22 (0.70-2.13)	0.32
10	Necropsy abundance	Live	0.03 (0.017-0.052)	0.001
11		Dead	1.45 (1.01 – 2.05)	0.046
12	Necropsy + US incidence	Live	0.038 (0.01-0.11)	0.002
13		Dead	1.35 (1.17 -1.56)	0.07

Table 8. Prevalence and abundance of viable and dead *E. granulosus* cysts detected in vaccinated and control sheep at necropsy and combination of US and necropsy (with 95% CI).

Response: Type of cyst	Explanatory variable: Sheep group	Cysts detected at necropsy			Cysts detected at necropsy or US	
		Number of observations	Proportion of infected sheep (models 8 & 9)	Mean number of cysts per animal (models 10 & 11)	Number of observations	Proportion of infected sheep (models 12 & 13)
Viable	Control	114	0.75 (0.51 - 0.90)	9.10 (7.27 – 11.37)	276	0.73 (0.64 - 0.80)
	Vaccinated	107	0.10 (0.05 - 0.18)	0.28 (0.17 - 0.45)	128	0.09 (0.07 - 0.13)
Dead	Control	114	0.39 (0.33 - 0.47)	1.24 (1.17 - 1.33)	276	0.38 (0.34 - 0.42)
	Vaccinated	107	0.45 (0.40 - 0.50)	1.81 (1.55 - 2.12)	128	0.45 (0.41 - 0.49)



C = control animals or area; V = vaccinated animals; D = dog-treated area

Fig 2: Effect of vaccination and dog therapy on prevalence and abundance of live cysts in sheep exposed for 4 years to a natural *E. granulosus* challenge (data extracted from Tables 6 and 8). A: Prevalence of infection in vaccinated and control sheep, B: Prevalence of infection in control sheep with or without treatment of dogs, C: Mean number of live cysts per sheep in vaccinated and control sheep, D: Mean number of live cysts per control sheep with or without treatment of dogs

Discussion

A control trial to reduce *E. granulosus* transmission was carried out for the first time under field conditions in Morocco. The choice of the Middle Atlas region for the trial was made because of the importance of sheep breeding, presence of numerous dogs (1.08 dog/person) and high level of *E. granulosus* infection in dogs confirmed recently in the same region (Amarir et al., 2020). These conditions were considered favourable for field testing of cystic echinococcosis control measures such as sheep vaccination and dog chemotherapy. In our field trial the proportion of sheep in the control group (no vaccination, no treatment of dogs) that were found to be infected with viable hydatid cysts at necropsy after a 4-year exposure was very high, with a significantly higher prevalence observed in Ain Leuh (88%) than in other sites (Ait Ishaq and El Kbab, 40% and 46% respectively; Table 2; p=0.03). These values correspond

to annual incidences rate of 51% in Ain Leuh 1 (95% Cl: 0.39 - 0.6), 17% in Ait Ishaq (95 % Cl: 0.06 - 0.36) and 18% in El Kbab (95 % Cl: 0.08 - 0.34). Similar results were observed when animals assessed by ultrasound are added to the necropsies, with a high annual incidence rate recorded in Ain Leuh 1 (39 % Cl: 0.33 - 0.46) while there was no significant difference seen in the abundance of live cysts in animals, across the different sites (p=0.3). These results in control sheep confirmed that an exposure of 4 years was sufficient for many of the animals to become infected. It is considered that a minimum of six months is required for hydatid cysts to appear, but it can take more than a year for them to reach a size easily detectable at necropsy (McConnell and Green, 1979). Taking this into account, the annual incidence rate of infection was calculated on the basis of a 3-year period. A similarly high prevalence of cystic echinococcosis was described recently in the province of Sidi Kacem (64%) indicating that *E. granulosus* transmission is widespread in Morocco (El Berbri et al., 2015b).

Prior to the implementation of control measures we found a prevalence of *E. granulosus* infection of 35% in owned dogs (Table 3). Following treatment, the monthly infection incidence rate in dogs was estimated at 4% (95% CI: 3-6%), assuming a period of one month before a new infection could be detected. This was close to what was estimated in a close vicinity (Had Oued Ifrane) (Amarir et al., 2020). Our data on the levels of infection with *E. granulosus* found in sheep and in dogs correlated with the high incidence rate of cystic echinococcosis found in the human population in the Middle Atlas. A recent study found cystic echinococcosis infection levels to be as high as 2.6% in some communities when determined by screening patients using abdominal ultrasound (Chebli et al., 2017). Current estimations of the prevalence of *E. granulosus* infections in Morocco are higher than those published (Azlaf and Dakkak, 2006), suggesting that the disease has progressed gradually. This change may be associated with a prohibition on the hunting of jackals or killing of dogs that was enacted in Morocco in 2012.

The potential protective effect of sheep vaccination on cystic echinococcosis infections was evaluated in vaccinated and non-vaccinated control ewes where the proportion of animals with viable cysts was determined as well as the mean number of viable cysts per animal in those that were assessed at necropsy (Tables 7 and 8). The proportion of sheep with viable hydatid cysts at necropsy was lower in vaccinated sheep (10%) than in control sheep (75%; p = 0.032) representing a 97% (95% CI: 42 – 99.8%) reduction of the risk of infection among vaccinated ewes (1 – OR). This rather imprecise estimation was due to a relative low number of observations at necropsy (107 vaccinated and 114 control ewes) and the high variability across sites. Our investigations of *E. granulosus* infection levels in dogs in one of the trial sites indicate

that the lambs were born into a highly contaminated environment, providing opportunity for exposure to infection early in life. Including ultrasound data generated a more precise protection rate (96%; 95% CI: 89 – 99%) (Fig 2A). Ultrasound being less sensitive (lungs and parts of the liver cannot be screened) and increasing the number of observations may explain this difference. Indeed, a high level of protection of the animals was also evident from the average number of viable hydatid cysts found in infected sheep among the 221 animals that were evaluated for infection at necropsy. Vaccinated animals had an average burden of viable cysts of 0.28, while in control animals the average burden was 9.10 ($p<0.001$), representing a reduction in the average burden of 97%. This means that vaccinated animals present far less viable cysts and, consequently, are less likely to be found positive at US examination than at necropsy (Fig 2C).

Data is available from a small number of other field studies of the EG95 vaccine trial. Laurieu et al. published results of a control program undertaken in the Rio Negro province of Argentina lasting more than 8 years (Larrieu et al., 2013; Larrieu, Gavidia and Lightowlers, 2019). Difficulties with accesses to the control area prevented Larrieu and his colleagues from delivering the vaccination program to a high proportion of animals, nevertheless, a reduction in the occurrence of infection and the burden of cystic echinococcosis infection in sheep was achieved (from an initial prevalence before vaccination of 56.3% to 21.1% prevalence after vaccination). The benefits that we found from vaccination with EG95 in Morocco were greater than those reported in Argentina by Larrieu and colleagues; however, there were differences in the programs undertaken in the two areas. In our study the sheep received two immunizations as lambs followed by annual booster injections during 3 years. In Argentina the sheep received two immunizations as lambs but only a single booster vaccination at one year of age before being assessed for hydatid cysts at the age of five years, whereas we provided additional annual immunizations in our study. Larrieu and colleagues were able to deliver their full vaccination program to only about half the animals, but assessed infection levels in all animals, irrespective (Larrieu et al., 2013). In our study all animals received the full vaccination schedule. This seems likely to have been a major contributor to the difference seen in the outcomes between the trial in Argentina and ours in Morocco. Heath et al. reviewed an extensive vaccination program undertaken in China (Heath et al., 2003), however details of the project have not been fully published. In 2017 the Chinese government implemented compulsory vaccination of sheep as part of a national echinococcosis control program (Ministry for Agriculture of the People's

Republic of China, 2017), however an assessment of the impact of vaccination has yet to be published.

The proportion of sheep with non-viable hydatid cysts did not differ significantly between control (38 - 39%) and vaccinated sheep (45%). Vaccinated animals that were found to be infected had an average of 1.81 non-viable hydatid cysts whereas in the non-vaccinated animals there was an average of 1.24 non-viable cysts per animal with borderline statistical significance ($p=0.046$) (Tables 6 and 7). The reasons for the non-viable lesions found at necropsy in the livers (especially) and lungs remain unknown. There may be fibrotic and calcified lesions remaining after the death of *E. granulosus* parasites, however liver lesions may also be due to the death of migrating *T. hydatigena* metacestodes, or other causes. If caused by *E. granulosus*, their abundance (about 1.5 cysts/animal) was low compared to live cysts in control animals (9 cysts/animal) and, in any case, non-viable cysts do not play any role in the transmission of *E. granulosus* to dogs.

The EG95 vaccine targets a protein which is expressed in eggs and oncospheres but not in established cysts (Chow et al., 2004) suggesting that it may only affect the parasite early in its development. In most controlled experiments using the EG95 vaccine, vaccinated animals are not always totally protected against a challenge infection with eggs and those parasites that do survive in vaccinated animals are viable (Lightowlers, 2006). Hence the relatively small number of cysts, viable or not, found in a small proportion of vaccinated sheep in Morocco is consistent with the efficacy of the EG95 vaccine described in controlled experimental trials.

Our trial in Morocco evaluated the impact of 4-monthly chemotherapy in dogs with praziquantel, either as a stand-alone measure or in combination with vaccination of sheep. In the selected vicinity, we attempted to treat all owned dogs every 4 months with praziquantel, i.e. about 600. As indicated above, the dogs of the selected area were highly exposed presenting a prevalence before treatment of 35% and an estimated monthly incidence risk of 4%. Such an incidence causes a detactable prevalence in dogs 4 month after treatment of 12%, significantly lower than the initial prevalence of 35%. Although praziquantel is highly efficient against *E. granulosus*, the effects of the drug in dogs do not persist beyond the day of treatment because the drug is very rapidly eliminated from the circulation and tissues (Hong et al., 2003; Ozdemir et al., 2019). Consequently, it can reasonably be assumed that all treated dogs were clean after treatment, were exposed to a high incidence (4% per month), making an average prevalence of about 6% when treated every 4 months (roughly, 0% after treatment and 12% four months later

make a mean = (0+12)/2 = 6%). In the area where dogs received 4-monthly chemotherapy, the proportion of non-vaccinated animals found to have viable *E. granulosus* cysts at necropsy was 71% (Table 5). This was less than the proportion of non-vaccinated sheep from the selected control area where the dogs were untreated (87%; p=0.05; Table 5). The effect of dog therapy was less pronounced in terms of infection in sheep when cyst abundance was considered or when ultrasound data were included (Table 5 and Figs2B and 2D). These estimations lack precision and may lack accuracy. Indeed, evaluating the effect of dog therapy by comparing only two areas (Ain Leuh 1 and 2) that are a priori similar, but distinct, may generate a bias since the variability observed may be caused by confounding factors. This problem was anticipated but dog therapy and testing proved difficult to implement in all selected places due to lack of collaboration of dog owners. This also impacted the number of observations and, as a consequence, the precision of our estimations.

Among the group of vaccinated sheep from areas where dogs also received praziquantel treatment (Ain Leuh 2), the proportions of sheep infected with viable hydatid cysts were 3% in vaccinated animals compared with 71% in control sheep. The mean number of viable cysts detected per animal was higher in control sheep than in vaccinated animals (Tables 5 and 6). Statistical comparison of the impact of 4-monthly praziquantel treatment together with vaccination of sheep showed in our study area that there was no significant difference indicating that under the transmission conditions pertaining to the control area, 4-monthly praziquantel treatment in owned dogs did not enhance the effect of sheep vaccination over use of the vaccine alone.

Torgerson (2003) used mathematical modelling to simulate control options for cystic echinococcosis (Torgerson & Heath, 2003b). The model predicted that a combination of treatment of dogs and vaccination would synergize to improve the effectiveness of a control program resulting in a greater and faster reduction of cystic echinococcosis in sheep. Torgerson's modelling was based on 6-monthly treatment of 80% of dogs. In our trial we did not obtain a substantial effect on *E. granulosus* transmission of 4-monthly treatment of dogs with praziquantel, nor a synergistic effect of a combination of dog treatment with sheep vaccination. Although we achieved close to 100% treatment of owned dogs in our control area, the incidence rate could be too high or the treatment frequency too low so that a sufficient number of dogs are promptly reinfected and disseminate eggs in the environment. Unfortunately, incidence data in dogs from study sites where dogs are not treated are not available for evaluating the actual effect of chemotherapy on *E. granulosus* prevalence in dogs.

Due to logistical constraints, four-monthly dog chemotherapy was not repeated in other sites. Hence, our observations should be viewed cautiously as confounding factors were not controlled.

In addition, there were an unquantified number on non-owned dogs present in the trial region, which were not treated. A study conducted in the Middle Atlas region of Morocco found a very high prevalence of infestation in non-owned dogs, ranging from 51.3% to 68.5% and representing a significantly higher risk of infestation (OR = 14) than in owned dogs (Amarir et al., 2020). Furthermore, in the trial area and other parts of Morocco there are numerous wild canid species (Maghnouj, 1999) which are other uncontrolled definitive hosts for *E. granulosus* (Dalimi et al., 2017; Heidari et al., 2019; Yong et al., 2019).

Therefore, our observations do not contradict the model of Torgerson (2003) but illustrate how cumbersome comprehensive dog chemotherapy could be in the field and the level of control that would be required to be effective (frequency of treatment, coverage of owned, roaming and wild canids). Treating regularly pet dogs remains advisable to reduce the risk of transmission to humans. Indeed, deworming of the dog protects man against infestation through licking, caresses and contamination of the shared environment (Amarir et al., 2020).

In the rural conditions of Morocco in which we conducted our study and where *E. granulosus* transmission rates are high, vaccination of sheep proved to be a highly effective tool to assist in the fight against this zoonosis. However, reliance on vaccination alone would require an extensive coverage and a control program to be undertaken for many years until the total renewal of the susceptible livestock population (because sheep that are infected before they are vaccinated remain potentially carriers until they die). To maximize the vaccination coverage, the inclusion of the EG95 in the enterotoxemia vaccine would be promising. According to our field investigation, we estimate that between 60 and 85% of the farmers in the trial areas use an enterotoxemia vaccine each year in their lambs. Another complementary and valuable control option would be to equip each slaughterhouse, which represent a hotspot for dog infection through consumption of infected organs, with a baking system, allowing to inactivate viable cysts in infected organs by boiling before they are left to carnivore animals (Bouslikhane & Fassi-Fihri, 2016). According to Li et al. (2014), boiling livers and lungs, which contain most of the hydatid cysts, could be a simple, effective and inexpensive method in terms of time and energy, to destroy the infective material (Li et al., 2014).

In conclusion, we found that under the epidemiological conditions in the Middle Atlas Mountains vaccination of sheep with the EG95 vaccine was highly effective in reducing *E. granulosus* transmission to sheep, whereas 4-monthly treatment of owned dogs with praziquantel was relatively ineffective. We were unable to demonstrate a synergistic effect of vaccination plus 4-monthly dog treatments. This was the first field evaluation of sheep vaccination for the control of cystic echinococcosis in North Africa and will help to inform efforts to control the disease in the region. A bivalent vaccine combining the EG95 vaccine with the enterotoxaemia vaccine will have a definite impact as it remains reasonably cost-acceptable. On the other hand, a major effort to sensitize and communicate with breeders is necessary before implementation. There is an urgent need for enhanced efforts to reduce the transmission of *E. granulosus* in Morocco and other North African countries so as to reduce the burden of cystic echinococcosis in the human population.

Acknowledgments

The authors thank the Academy of Research and Higher Education (ARES) of Belgium, Namur Research Institute (NARILIS), University of Namur, Belgium and Institute of Agronomic and Veterinary Hassan II, Rabat Morocco for financial support of this work. Funding is also acknowledged from the Australian National Health and Medical Research Council grant GTN1105448 (MWL). Special thanks to Intissar Boukhari, Larbi, Said Suilahi and the entire team of the Department of Pathology and Veterinary Public Health, parasitology lab. Thanks also to all the farmers of the Middle Atlas who participated to this study as well as the local authorities, agents and technicians of the ONSSA and ANOC who brought their help in the field and without forgetting all the people of the Ministry of Health.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: Tanguy Marcotty, Abdelkbir Rhalem, Marshall W. Lightowlers.

Performed the experiments: Fatima Ezzahra Amarir, Abdelkbir Rhalem .

Analyzed the data: Tanguy Marcotty.

Contributed reagents/materials/analysis tools: Marshall W. Lightowlers , Charles G. Gauci , Nathalie Kirschvink.

Wrote the paper: Fatima Ezzahra Amarir, Tanguy Marcotty, Marshall W. Lightowlers, Abdelkbir Rhalem, Nathalie Kirschvink.

References

Tahiri S, Naoui H, Iken M, Azelmat S, Bouchrik M, Lmimouni BE. Seroprevalence of cystic echinococcosis in the provinces of Ifrane and El Hajeb in Morocco. Med Mal Infect. 2020. doi:10.1016/j.medmal.2019.12.007

El Berbri I, Petavy AF, Umhang G, Bouslikhane M, Fassi Fihri O, Boué F, et al. Epidemiological Investigations on cystic echinococcosis in North-West (Sidi Kacem Province) Morocco: Infection in Ruminants. Adv Epidemiol. 2015: 1–9. doi:10.1155/2015/104025

Sadjjadi SM. Present situation of echinococcosis in the Middle East and Arabic North Africa. Parasitol Int. 2006;55: 197–202. doi:10.1016/j.parint.2005.11.030

Alvarez Rojas (a) CA, Romig T, Lightowlers MW. Echinococcus granulosus sensu lato genotypes infecting humans - review of current knowledge. Int J Parasitol. 2014;44: 9–18. doi:10.1016/j.ijpara.2013.08.008

Alvarez Rojas CA, Gauci CG, Lightowlers MW. Antigenic differences between the EG95-related proteins from Echinococcus granulosus G1 and G6 genotypes: Implications for vaccination. Parasite Immunol. 2013;35: 99–102. doi:10.1111/pim.12009

Amarir FE, Saadi A, Marcotty T, Rhalem A, Oukessou M, Sahibi H, et al. Cystic echinococcosis in three locations in the Middle Atlas, Morocco: Estimation of the infection rate in the dog reservoir. Vector-Borne Zoonotic Dis. 2020;20: 436–443. doi:10.1089/vbz.2019.2538

Azlaf R, Dakkak A, Chentoufi A, El Berrahmani M. Modelling the transmission of Echinococcus granulosus in dogs in the northwest and in the southwest of Morocco. Vet Parasitol. 2007;145: 297–303. doi:10.1016/j.vetpar.2006.12.014

Dakkak A. Echinococcosis/hydatidosis: A severe threat in Mediterranean countries. Vet Parasitol. 2010;174: 2–11. doi:10.1016/j.vetpar.2010.08.009

Thys S, Sahibi H, Gabriël S, Rahali T, Lefèvre P, Rhalem A, et al. Community perception and knowledge of cystic echinococcosis in the High Atlas Mountains, Morocco. BMC Public Health. 2019;19: 1–15. doi:10.1186/s12889-018-6372-y

Battelli G. Echinococcosis: Costs, losses and social consequences of a neglected zoonosis. Vet Res Commun. 2009;33: 47–52. doi:10.1007/s11259-009-9247-y

Comité interministériel de lutte contre l'hydatidose. Lutte contre l'hydatidose/echinococcose Guide des activités de lutte. 2007.

Craig PS, Hegglin D, Lightowlers MW, Torgerson PR, Wang Q. Echinococcosis: Control and Prevention. Advances in Parasitology. Elsevier Ltd; 2017. doi:10.1016/bs.apar.2016.09.002

Craig PS, Larrieu E. Control of cysticechinococcosis/hydatidosis: 1863-2002. Adv Parasitol. 2006;61: 443–508. doi:10.1016/S0065-308X(05)61011-1

Lightowlers MW, Lawrence SB, Gauci CG, Young J, Ralston MJ, Maas D, et al. Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. Parasite Immunol. 1996;18: 457–462. doi:10.1111/j.1365-3024.1996.tb01029.x

Gauci C, Jenkins D, Lightowlers MW. Strategies for optimal expression of vaccine antigens from taeniid cestode parasites in escherichia coli. Mol Biotechnol. 2011;48: 277–289. doi:10.1007/s12033-010-9368-0

Heath DD, Jensen O, Lightowlers MW. Progress in control of hydatidosis using vaccination - A review of formulation and delivery of the vaccine and recommendations for practical use in control programmes. Acta Trop. 2003;85: 133–143. doi:10.1016/S0001-706X(02)00219-X

Larrieu E, Herrero E, Mujica G, Labanchi JL, Araya D, Grizmado C, et al. Pilot field trial of the EG95 vaccine against ovine cystic echinococcosis in Rio Negro, Argentina: Early impact and preliminary data. Acta Trop. 2013;127: 143–151. doi:10.1016/j.actatropica.2013.04.009

Ministry for Agriculture of the People's Republic of China. National Animal Disease Compulsory Immunization Program 2017 [cited 10 Jun 2020]. Available: http://jiuban.moa.gov.cn/zwllm/ghjh/201703/t20170320_5530358.htm

Torgerson PR. Mathematical models for the control of cystic echinococcosis. Parasitol Int. 2006;55: 253–258. doi:10.1016/j.parint.2005.11.037

Torgerson PR, Heath DD. Transmission dynamics and control options for Echinococcus granulosus. Parasitology. 2003;127. doi:10.1017/S0031182003003810

Azlaf R, Dakkak A. Epidemiological study of the cystic echinococcosis in Morocco. Vet Parasitol. 2006;137: 83–93. doi:10.1016/j.vetpar.2006.01.003

Chebli H, Laamrani El Idrissi A, Benazzouz M, Lmimouni BE, Nhammi H, Elabandouni M, et al. Human cystic echinococcosis in Morocco: Ultrasound screening in the Mid Atlas through an Italian-Moroccan partnership. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11: 1–20. doi:10.1371/journal.pntd.0005384

Maghnouj M. Quelques espèces de mammifères de la cédraie au Maroc : cas du singe magot. Forêt Méditerranéenne. 1999;20: 101–106.

Tahiri S, Naoui H, Iken M, Azelmat S, Khallayoune M, Bouchrik M, et al. Genotyping of human Echinococcus granulosus cyst in Morocco. J Parasit Dis. 2019;43: 560–565. doi:10.1007/s12639-019-01127-1

ONSSA NO of SS of FP. National Office of Sanitary Security of Food Products. 2015. Available: http://www.onssa.gov.ma

HCP HC for P. High Commission for Planning. 2014. Available: www.hcp.ma

Ministry of Health of Morocco 2015. Available: www.sante.gov.ma

Heath DD. The life cycle of Echinococcus granulosus. Recent Adv Hydatid Dis. Victoria; 1973.

Dueger EL, Gilman RH. Prevalence, intensity, and fertility of ovine cystic echinococcosis in the central Peruvian Andes. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001;95: 379–383. doi:10.1016/S0035-9203(01)90188-9

ONSSA NO of SS of FP. National Office of Sanitary Security of Food Products. 2019. Available: http://www.onssa.gov.ma

Hussein HA, Elrashidy M. Ultrasonographic features of the liver with cystic echinococcosis in sheep. Vet Rec Open. 2014;1: e000004. doi:10.1136/vropen-2013-000004

J. D. McConnell and R. J. Green. The control of hydatid disease in Tasmania. Aust Vet J. 1979;55.

Larrieu E, Gavidia CM, Lightowlers MW. Control of cystic echinococcosis: Background and prospects. Zoonoses Public Health. 2019;66: 889–899. doi:10.1111/zph.12649

Chow C, Gauci CG, Cowman AF, Lightowlers MW. Echinococcus granulosus: Oncosphere-specific transcription of genes encoding a host-protective antigen. Exp Parasitol. 2004;106: 183–186. doi:10.1016/j.exppara.2004.03.009

Lightowlers MW. Cestode vaccines: Origins, current status and future prospects. Parasitology. 2006;133. doi:10.1017/S003118200600179X

Hong ST, Lee SH, Lee SJ, Kho WG, Lee M, Li S, et al. Sustained-release praziquantel Tablet: Pharmacokinetics and the treatment of clonorchiasis in beagle dogs. Parasitol Res. 2003;91: 316–320. doi:10.1007/s00436-003-0958-7

Ozdemir Z, Faki HE, Uney K, Tras B. Investigation of pharmacokinetic interaction between ivermectin and praziquantel after oral administration in healthy dogs. J Vet Pharmacol Ther. 2019;42: 497–504. doi:10.1111/jvp.12769

Torgerson PR, Heath DD. Transmission dynamics and control options for Echinococcus granulosus. Parasitology. 2003. doi:10.1017/S0031182003003810

Dalimi A, Shamsi M, Khosravi A, Ghaf-Farifar F. Genotyping echinococcus granulosus from canine isolates in Ilam province, west of Iran. Iran J Parasitol. 2017;12: 614–621.

Heidari Z, Sharbatkhori M, Mobedi I, Mirhendi SH, Nikmanesh B, Sharifdini M, et al. Echinococcus multilocularis and Echinococcus granulosus in canines in North-Khorasan Province, northeastern Iran, identified using morphology and genetic characterization of mitochondrial DNA. Parasites and Vectors. 2019;12: 1–13. doi:10.1186/s13071-019-3859-z

Yong TS, Lee KJ, Shin MH, Yu HS, Suvonkulov U, Sergeevich TB, et al. Prevalence of intestinal helminth infections in dogs and two species of wild animals from Samarkand Region of Uzbekistan. Korean J Parasitol. 2019;57: 549–552. doi:10.3347/kjp.2019.57.5.549

Bouslikhane M, Ouafaa FF. Zoonotic encounters at the slaughterhouse : pathways and possibilities for the control of cystic echinococcosis in northern Morocco. 2016; 92–115. doi:10.1017/S0021932015000486

Li J, Wu C, Wang H, Liu H, Vuitton DA, Wen H, et al. Boiling sheep liver or lung for 30 minutes is necessary and sufficient to kill Echinococcus granulosus protoscoleces in hydatid cysts. Parasite. 2014;21. doi:10.1051/parasite/2014064

QUATRIÈME PARTIE : DISCUSION GÉNÉRALE

Au Maroc, le Moyen Atlas est une région montagneuse très connue par l'élevage du mouton, et par la présence d'une population canine importante surtout dans le milieu rural, et par un grand nombre d'abattoirs et Souk avec des infrastructures très rudimentaires. La population canine se compose de differentes catégories de chiens, les chiens ferraux qui sont des chiens sauvages et qui n'ont pas de contact avec l'Homme et généralement habitent dans les forêt et sortent souvent la nuit pour se nourrir, les chiens errants, qui sont généralement des chiens abondonnés sans maître ou des chiens nés dans le village et donc ce sont des chiens du village qui se déplacent librement entre les differents douars et se trouvent souvent à proximité des abattoirs, des souks et la décharge publique pour se nourrir (Bouaddi et al., 2018), et des chiens à propriétaires qui sont soit attachés ou libres, ces chiens ont la fonction de chiens de garde ou chiens de compagnie ou des chiens de chasse. Le propriétaire donne plus d'importance à son chien selon la fonction accomplie par ce chien. Par exemple, les chiens de chasse sont bien entretenus par leur propriétaire et toujours attachés alors que les autres chiens sont davantage en liberté : le chien de garde qui est souvent libre ou parfois attaché la journée et libre le nuit et chien de compagnie ou de berger qui est aussi libre et qui accompagne les moutons aux prairies et dans les paturages. Mais généralement la faible valeur accordée aux chiens à propriétaires en liberté est surtout liée à la pauvreté car ce sont des petits éleveurs et qui n'ont pas assez de moyens pour subvenir aux besoins alimentaires et médicaux de leurs chiens (Bouaddi et al., 2018). Dans certains cas, des fausses considérations religieuses qualifiant le chien d'impur sont à l'origine de ces pratiques. Il semble qu'elles prennent leur origine dans le conseil de ne pas partager le même plat de nourriture avec son chien pour éviter la transmission des maladies à l'Homme. Par, conséquence, le Moyen Atlas est une région très endémique à l'échinococcose kystique au Maroc (Kachani et al., 1997). D'ailleurs selon une enquête réalisée par Dakkak et Azlaf entre 2001 et 2004, il a été noté que le Moyen Atlas représente la prévalence d'infestation la plus élevée au Maroc chez les animaux d'élevage (Azlaf and Dakkak, 2006). Chez l'Homme, des données du ministère de la Santé du Maroc pour 2014 font état d'une incidence annuelle de l'échinococcose kystique humaine dans la région de Meknès Tafilalet de 7,04 pour 100 000 Habitants, les chiffres les plus élevés étant enregistrés dans deux régions du Moyen Atlas dans les provinces d'Ifrane (16,33 pour 100 000) et d'El Hajeb (12,90 pour 100 000) (Chebli et al., 2017). L'ensemble de ces données épidémiologiques ont orienté notre choix sur cette zone d'étude.

Le Moyen Atlas était classé parmi les régions ciblées par le programme national de lutte contre l'hydatidose au Maroc. Ce programme dont les objectifs n'ont pas pu être atteints et qui

a connu un échec à tous les niveaux, n'a pas permis de réduire l'incidence d'infestation par l'hydatidose, d'ailleurs, la situation épidémiologique au Moyen Atlas jusqu'à nos jours est toujours la même. Dans ce contexte, la présente thèse avait comme objectif d'évaluer l'efficacité d'une approche de lutte basée sur l'outil vaccinal et la chimioprévention.

Le moyen de lutte contre l'hydatidose le plus utilisé dans le monde et qui a témoigné d'un succès dans la réduction voire même l'éradication de l'infestation par *E. granulosus,* est le traitement des chiens (hôte définitif) par le praziquantel. Cette approche vise directement le stade adulte du parasite *E. granulosus.* Une approche alternative consiste dans la vaccination des moutons (hôte intermédiaire) par le vaccin EG 95, récemment mis au point vise directement le développement du stade larvaire chez l'hôte intermédiaire. Son utilisation dans des conditions contrôlées ont donné des résultats encourageants pour l'utiliser au niveau du terrain. Bien que confirmée dans des conditions contrôlées ou bien caractérisées, l'évaluation de l'efficacité sur le terrain de ces deux moyens de lutte visant à briser le cycle biologique du parasite doit intégrer plusieurs facteurs et paramètres épidémiologiques, tels que la présence d'une forte population canine caractérisée par un grand effectif de chiens errants mais aussi un important ratio chien / foyer pour les chiens à propriétaire, et la présence du chacal ou loup Africain, plus, un élevage important de mouton. Dès lors, les travaux menés dans le cadre de cette recherche doctorale visaient non seulement à confirmer l'efficacité de la chimioprévention chez le chien et la vaccination du mouton dans la région d'étude, mais également à générer les données nécessaires à la modélisation future de ces stratégies de lutte.

Le vaccin EG95 cible la souche ovine G1 du complexe *Echinococcus granulosus granulosus* (Lightowlers, 2006). L'identification moléculaire des souches au Moyen Atlas a révélé la circulation de la souche ovine G1 chez toutes les espèces animales et aussi chez l'Homme (Azlaf et al., 2007; El Berbri et al., 2015a). Des analyses de kystes hydatiques prélevés dans des foies de mouton abattus (Amarir, 2017) de même que les analyses PCR réalisés sur les excréments de chiens infectés par *E. granulosus* (Amarir et al., 2020) ont confirmé la présence quasi exclusive de la souche G1 dans la région d'étude.

Par conséquent, le chien apparaît comme vecteur principal de la souche G1, et semble responsable du maintien d'une incidence d'infection élevée dans la région de l'étude. Le fait que la souche ovine G1 soit hautement conservée au Maroc laisse supposer que le vaccin EG 95 incluant l'antigène de la souche G1 devrait avoir l'effet protecteur espéré.

ETUDE 1 : Estimation de l'incidence d'infection par *E. granulosus* chez les chiens errants et à propriétaires au Moyen Atlas au Maroc

L'originalité de cette étude réside dans la détermination de la prévalence et du taux de réinfection par *E. granulosus* au Moyen Atlas chez deux catégories de chiens : Les chiens errants représentent environ 1/3 de la population totale des chiens suivis ; il s'agit d'une population très active et donc difficile à identifier, à suivre et à traiter. Les chiens à propriétaire représentent quant à eux 2/3 de la population canine totale. Ils sont facilement identifiables et traitables avec l'aide des propriétaires.

Il a été observé qu'avant le traitement des chiens, la prévalence d'infection initiale été élevée chez tous les chiens mais beaucoup plus chez les chiens errants. La prévalence était différente entre les 3 sites, ce qui a représenté un premier inconvénient de notre étude. En plus, quelle que soit la fréquence du traitement, les chiens errants s'infestent plus rapidement que les chiens à propriétaires avec un risque d'infection 14 fois plus élevé. Ce résultat peut s'expliquer par une pression infectieuse accrue due au libre accès au niveau des abattoirs et souks aux saisies d'organes infectés par les kystes hydatiques.

Après le deuxième traitement des chiens, une diminution de l'incidence mensuelle d'infection chez tous les chiens a été remarquée. Cette réduction était maximale pour les chiens du Groupe 1 issus du site avec la prévalence initiale la plus faible et l'intervalle entre traitements le plus court (2 mois). Ceci laisse penser qu'un traitement antiparasitaire des chiens appliqué tous les 2 mois permet de contrôler efficacement l'excrétion des œufs du parasite chez les chiens à propriétaires et les chiens errants. Mais, ce programme reste lourd à appliquer, vu que la population des chiens est très variable, car une grande difficulté surtout pour traiter les chiens ferraux et errants et aussi les autres canidés sauvages comme le chacal qui est fort présent au Moyen Atlas. Il faut cependant noter que les durées d'expositions/intervalles de traitements différents auraient dû être appliquées à des sous-groupes de chiens dans tous les sites de manière à intégrer les différences entre sites. Vu la complexité logistique de cette étude, cette contrainte supplémentaire n'a pas pu être prise en considération.

L'incidence mensuelle calculée est plus élevée chez les chiens errants car ces derniers se nourrissent quasi exclusivement d'abats contaminés par les kystes hydatiques au niveau des abattoirs, mais elle diminue quand l'intervalle entre les traitements est réduit. De nouveau, ce résultat semble être très intéressant à prendre en compte si on veut implémenter un programme

de lutte basé sur le traitement régulier des chiens, dans ce cas, il sera opportun de réduire le temps d'exposition des chiens à l'infection entre chaque traitement.

Nos investigations à quatre mois d'intervalle entre traitements ont montré une diminution de l'incidence chez les chiens à propriétaires qui peut être liée à la sensibilisation des propriétaires (Marcotty et al., 2013). En effet, de par notre intervention régulière sur les chiens et les explications relatives à notre démarche, du moins certains propriétaires des chiens ont pu adapter leur façon de nourrir leurs animaux (par ex en leur interdisant l'accès à des abats). Si la même tendance s'observe chez les chiens errants, celle-ci est plus difficile à expliquer. Il semblerait qu'un effet « saison » pouvant influencer la survie des kystes hydatiques dans l'environnement et donc l'infection des chiens existe (Thevenet et al., 2005). En effet, une réduction du risque de réinfection a été observée chez les chiens errants entre la 2e et la 3e investigation après le traitement. Comme nos investigations à quatre mois d'intervalle ont commencé en décembre et se sont terminées en août, la 2e période d'exposition s'est déroulée dans des conditions sèches et chaudes. D'ailleurs, chez les chiens traités tous les 4 mois que ce soit dans l'étude 1 ou l'étude 3, nous avons remarqué une diminution de l'infection chez les chiens durant les saisons printemps et été. Sachant que le taux d'abattage des moutons augmente en été et en tenant compte de la période prépatente qui est de 30 jusqu'à 45 jours pour que les chiens commencent à excréter les œufs dans l'environnement, cette période coïncidera avec l'automne et l'hiver où le taux d'excrétion des œufs atteint son pic et avant de diminuer de nouveau vers le printemps et l'été. Cet effet devrait être plus marqué chez les chiens errants que les chiens à propriétaires, car les chiens errants sont plus libres pour chercher leur nourriture, notamment auprès des abattoirs et des souks. C'est pour cela, qu'il faut revoir l'infra structure des abattoirs qui représentent une source de contamination pour les chiens errants, et ceci, par l'établissement de clotures afin de bloqué l'accès facile de ces chiens à l'abattoir mais aussi, il faut revoir le système de destruction des abats contaminés, au lieu d'utilier le grésil qui ne fait que préservé les kystes le plus longtemps possible et n'ont pas accélérer leur dégradation, équiper les abattoirs par des incinérateurs ou bien par un système de cuisson pour faire bouillir les abats pendant 30 minutes pour tuer les protoscolex dans le kyste hydatique (Li et al., 2014).

D'après nos résultats, deux approches peuvent être considérées dans le cadre d'un programme de lutte basée sur la chimioprévention chez le chien : si le programme vise à protéger surtout l'Homme, il est important de traiter les chiens à propriétaire à intervalle régulier. Si le programme vise à protéger l'Homme et l'hôte intermédiaire, il faut inclure les chiens errants et tenir compte de la pression infectieuse de l'environnement pour adapter la

périodicité du traitement anthelminthique. En plus, il est important d'intégrer dans un programme de lutte, le contrôle de la population canine, comme il a été observé dans plusieurs programmes de lutte réussis : la stérilisation des chiènnes fait partie de ces approches, mais reste une solution lourde et couteuse ; l'obligation d'appliquer des traitements vermifuges réguliers et la limitation du vagabondage en sont d'autres. En outre, il est possible de combiner les vermifugations des chiens à propriétaires aux campagnes de vaccination contre la rage ou celle contre la leishmaniose. Mais ces campagnes seules restent insuffisantes.

Quant aux chiens sans propriétaire et errants, ils peuvent être rassemblés et mis à disposition pour une adoption par un propriétaire. L'alternative peut être l'euthanasie bien que cette option reste fortement déconseillée car elle est de moins en moins acceptée.

Il faut également prendre en compte l'existence du chacal au Moyen Atlas. Sa présence est confirmée, mais l'effectif de cette population reste inconnu (Moliner et al., 2016). Son rôle dans la transmission du parasite est vraisemblablement limité étant donné que l'accès à des abats infectés aura lieu via des animaux morts ou chassés (et qui seront plutôt des jeunes) et non pas via un accès à des organes saisis dans les abattoirs et tueries dans les souks.

ETUDE 2 : Validation de l'outil échographie comme moyen de diagnostic in vivo du kyste hydatique hépatique chez le mouton

Pour évaluer l'effet de la vaccination sur les moutons vaccinés et suivis pendant 4 ans (étude 3), le taux d'infection par les kystes hydatiques des animaux vaccinées comparés aux témoins a été déterminé par deux méthodes de diagnostic, l'autopsie par abattage des animaux et l'échographie pour les non abattus. L'autopsie donne un résultat sur la présence de la totalité des kystes hydatiques puisqu'on inspecte directement les organes. Par contre l'échographie qui est limitée au foie permet de visualiser uniquement les kystes au niveau de cet organe. Sachant que la localisation des kystes hydatiques chez les ovins est très élevée au niveau hépatique, l'échographie apparait comme une solution alternative à l'abattage des animaux chez les éleveurs ne voulant pas sacrifier leurs animaux.

Afin de vérifier la sensibilité de l'échographie hépatique pour détecter des kystes hydatiques in vivo, l'étude 2 a été réalisée.

Le premier volet de cette étude a permis de montrer que l'échographie dispose d'une spécificité de 100% et d'une sensibilité de 98% pour détecter des kystes hydatiques hépatiques chez des moutons de race Timahdite élevés et abattus dans la région d'étude. Ces résultats sont

conformes à des études antérieures décrivant une spécificité de 100% (Hussein and Elrashidy, 2014) et de 97,64% (Sage et al., 1998) dans des contextes épidémiologiques similaires. En plus, il a été montré que le nombre de kystes hydatiques viables augmente avec l'âge, facilitant leur détection dès que l'animal a atteint l'âge de 3 ans. La discrimination entre les kystes hydatiques viables et kystes hydatiques calcifiés a été possible. En effet, les kystes viables sont remplis de liquide hydatique, contenant des protoscolex vivants et vésicules filles et apparaissent à l'échographie sous forme d'une structure ronde et uniloculaire, avec une membrane laminaire bien définie et anéchogène tandis que l'intérieur du kyste est échogène en raison du liquide hydatique. Quant aux kystes hydatiques morts, ils se présentent à l'échographie avec une paroi et une cavité hyperéchogène générant un ombrage acoustique.

Le 2e volet de cette étude technique a permis d'estimer la proportion d'animaux porteurs de kystes exclusivement pulmonaires. Etant donné que l'approche échographique ne permet que de détecter les kystes hépatiques, un animal infesté uniquement au poumon ne serait pas détecté. L'analyse des données enregistrées sur animaux dont les kystes hydatiques hépatiques et pulmonaires ont été répertoriés montre que 22 % des animaux présentant des kystes pulmonaires n'en présentent pas au niveau hépatique. La détection des kystes par échographie hépatique risque dès lors de sous-estimer de 76,4 % le taux d'infection chez des animaux issus de notre zone d'étude.

Sur base de ces résultats, l'échographie hépatique a pu être incluse comme outil de détection in vivo de kystes hydatiques lors de l'étude 3. Et, avec sa sensibilité très élevée, l'échographie représente une très bonne alternative à l'autopsie dans notre contexte d'étude mais aussi un bon outil de surveillence épidémiologique lors du suivi d'un programme de lutte.

ETUDE 3 : L'évaluation de l'efficacité du vaccin EG95 sur le développement de kystes hydatiques chez le mouton

La 3e étude s'est déroulée dans quatre sites, trois sites (site n°1, site n°3 et site n°4) avec une approche vaccinale seule et un site (n°2) combinant vaccination du mouton et chimioprévention du chien.

Les données récoltées en fin d'étude ont été analysées de manière à déterminer (1) la proportion d'animaux témoins infectés par des kystes hydatiques au terme de 4 années d'exposition ; (2) si la chimioprévention des chiens à propriétaire (chiens de garde et de chasse souvent attachés) (mise en place dans le site n°2) réduit la proportion de moutons infectés par

des kystes hydatiques ; (3) si la vaccination réduit la proportion de moutons infectés par des kystes hydatiques.

La prévalence d'infection déterminée chez les animaux témoins (sans vaccination, ni traitement de chiens) à l'abattage et à l'échographie était élevée dans toutes les régions d'étude, avec une prévalence significativement plus élevée observée dans le site n° 1 (88%) que dans d'autres sites (site n° 3 et site n° 4, 40% et 46% respectivement). Cela confirme bien ce qui a été rapporté par Azlaf et Dakkak concernant la prévalence élevée notée dans ces régions (Azlaf and Dakkak, 2006). En outre, ces résultats ont confirmé qu'une exposition de 4 ans était suffisante pour que les kystes hydatiques développés chez les animaux infectés soient détectables. Au vu du nombre moyen de kystes détectés chez les animaux témoin, il est probable qu'une durée d'investigation plus courte permettrait déjà un développement suffisant de kystes. Pour rappel, la sensibilité de l'échographie est de l'ordre de 100% chez les animaux de 3 ans et plus (étude 2). En outre, la proportion de moutons témoins infectés par des kystes viables à l'âge de 4 ans était très élevée (73 % des moutons avec kystes viables par rapport à 38% des moutons présentant des kystes calcifiés). Cette différence de proportion entre ces deux types de kystes a été également observée dans l'étude 2. Ces résultats montrent bien que dans ces régions d'études, les moutons vivent dans un environnement très contaminé par les œufs d'*E. granulosus* et que les animaux non protégés (sans vaccination ni traitement des chiens) développent davantage des kystes viables.

La prévalence de l'infection par l'échinococcose chez les chiens à propriétaires avant le début du traitement quadrimestriel au Praziquantel était de 35%. Mais après le traitement, le taux d'incidence mensuel de l'infection chez les chiens était estimé à 4 % (IC à 95 % : 3-6 %) en considérant une période prépatente de 1 mois.

Dans le site n° 2 où les chiens à propriétaire ont été traités tous les 4 mois, la proportion d'animaux témoins présentant des kystes viables d'*E. granulosus* à l'autopsie était de 71 %. Cette proportion était inférieure à celle des moutons témoins du site n°1 où les chiens n'ont pas été traités (87 % ; p=0,05). L'effet du traitement des chiens était moins prononcé en termes d'infection chez les moutons lorsque l'abondance des kystes était prise en compte ou lorsque les données échographiques étaient incluses. Ces estimations manquent de précision et d'exactitude étant donné que l'évaluation de l'effet de la chimio prévention chez les chiens n'impliquait que deux sites (site n°1 et site n°2) similaires, mais malgré tout distincts. En effet, des différences en termes de pression infectieuse pesant sur les moutons peuvent être liées à la transhumance

très pratiquée en Moyen Atlas, à la présence du chacal et de chiens errants, au ratio chien/foyer. Ce problème avait été anticipé mais il était difficile à mettre en œuvre un protocole de chimioprévention dans tous les endroits de l'étude en raison du manque de collaboration des propriétaires de chiens et de la lourdeur logistique.

En plus, la comparaison statistique de l'impact du traitement du chien à propriétaire montre qu'il ne renforçait pas l'effet de la vaccination des moutons par rapport à l'utilisation du vaccin seul, contrairement à ce qu'un modèle élaboré par Torgerson laissait espérer (Torgerson & Heath, 2003a). D'une part, ce manque d'effet de renforcement de la vaccination peut être attribué à un effectif réduit d'animaux investigués au terme de 4 ans dans le site 2 (nombre de moutons vaccinés = 107 ; nombre de moutons témoins = 114). D'autre part, il convient de souligner que seulement les chiens à propriétaire, soit environ 2/3 de la population canine présente, ont été traités par des anthelminthiques pendant 4 ans. Etant donné que le chien errant et surtout les chiens à propritaires non attachés et qui errent souvent sont plus infectés (étude 1) et que la survie d'œufs d'*E. granulosus* excrétés dans le milieu peut atteindre 4 ans (Thevenet et al., 2005; Chaâbane-Banaoues et al., 2015), il est peu probable que le traitement des chiens à propriétaire à partir du moment où les moutons étaient vaccinés allait sensiblement réduire leur risque d'infection. Il est cependant important de souligner que les données récoltées dans cette étude ne permettent pas d'évaluer si le risque de contamination de l'Homme a pu être modulé.

Quant à l'impact de la vaccination des moutons pendant 4 ans, la proportion des moutons présentant des kystes hydatiques viables à l'autopsie était plus faible chez les moutons vaccinés (10 %) que chez les moutons témoins (75 % ; p = 0,032), ce qui représente une réduction de 97 % (IC à 95 % : 42 - 99,8 %) du risque d'infection chez les brebis vaccinées (1 - OR). Ce chiffre nécessite d'être pris avec précaution en raison du nombre d'observations relativement faible à l'autopsie (107 brebis vaccinées et 114 brebis témoins) et à la différence du taux d'infection entre les sites. Après combinaison aux données échographiques, un taux de protection plus précis (96 % ; 95 % IC : 89 - 99 %) a pu être calculé. En outre, les animaux vaccinés présentaient une charge moyenne de kystes viables de 0,28 tandis que chez les animaux témoins, la charge moyenne était de 9,10 ($p<0,001$), ce qui représente une réduction de 97 %. Cela signifie que les animaux vaccinés présentent beaucoup moins de kystes viables et, par conséquent, sont moins susceptibles d'être considérés faussement positifs à l'échographie ou à l'abattage. En plus, ils présentent un risque moindre en termes de transmission du parasite au chien.

Dans les conditions du terrain au Moyen Atlas, plusieurs facteurs épidémiologiques favorisent le maintien du taux d'infection élevé par l'échinococcose kystique (population canine importante et diversifiés, présence d'abattoir sans clôture et accès libre des chiens aux abats infectés plus, l'élevage important du mouton). Le contrôle de cette zoonose peut paraitre facile dans l'absolu, mais son application sur le terrain reste difficile. D'ailleur, selon Torgerson techniquement le traitement associé à la vaccination peut être efficace (Torgerson and Heath, 2003a) mais dans notre contexte épidémiologique (forte incidence) ce n'est pas le cas. En effet, les résultats de notre étude dévoilent déjà les différents paramètres qu'il faut considérer pour implémenter une stratégie de lutte.

Si la stratégie de lutte vise à réduire l'infection chez l'Homme, le traitement chez les chiens à propriétaire sera le plus approprié et ces chiens doivent être traités régulièrement à des intervalles très courts, et la sensibilisation des propriétaires à la problématique pourrait jouer un rôle important. Au vu de la cinétique du taux d'excrétion des œufs par les chiens, la chimioprévention semble plus importante en hiver et au printemps.

Si la stratégie de lutte vise à protéger l'Homme et le mouton/le ruminant, dans ce cas, en plus des chiens à propriétaires, les chiens errants pourraient également être ciblés par la chimioprévention, bien que les difficultés techniques et logistiques associées risquent de rendre cette approche impossible. Il apparaît dès lors très prometteur de renforcer l'approche de lutte par la vaccination des moutons mais dont l'effet ne sera visible qu'après deux à trois années de vaccination, en respectant le protocole (primo vaccination à un jeune âge suivie d'un rappel après un mois et des rappels annuels). Sinon, pour une prévention optimale, il peut être opportun d'associer la vaccination des moutons à la vaccination des chiens (Zhang et al., 2018) car ceci permettra d'accélérer l'atteinte de l'objectif et de pouvoir protéger toutes les espèces. Comme les résultats de l'étude 2 ont montré que la sensibilité de l'échographie est proche de 100% dès que des moutons infectés ont atteint l'âge de 3 ans, l'impact d'une stratégie de lutte dans notre zone d'étude pourrait être évalué chez des moutons au terme de 3 années

Les données générées sur la prévalence et l'incidence de l'infection chez les chiens errants et à propriétaires et chez les moutons vaccinés et témoins permettront par modélisation de prévoir le taux de transmission du parasite dans le temps en fonction des stratégies de chimioprévention chez le chien et/ou de vaccination des moutons. Au final, pour implémenter une stratégie de lutte efficace, il est nécessaire de tenir compte de tous les paramètres précédemment discutés.

Pour compléter l'approche, il faudra également tenir compte de la population des canidés sauvages comme le loup et le chacal qui peuvent aussi participer à la transmission du parasite.

Cependant, avant l'implémentation d'un programme de lutte basé sur la vaccination du mouton, il sera important d'évaluer l'acceptabilité de la vaccination par les éleveurs. Le prix de vente du vaccin est un premier facteur à prendre en compte et les possibilités de subvention ou prise en charge complète du coût par l'état doivent être évaluées. Un autre aspect concerne la régularité d'administration du vaccin, notamment les rappels annuels. L'utilisation d'un vaccin combinant une protection contre l'hydatidose et l'entérotoxémie pourrait être une solution étant donné que la vaccination contre l'entérotoxémie est largement acceptée par les éleveurs. Et au final, il ne faut pas négliger dans un programme de lutte d'intégrer un volet de sensibilisation de la population qui joue un rôle très important dans l'échec ou la réussite d'un programme.

Conclusion et perspectives

L'échinococcose kystique constitue toujours une zoonose parasitaire émergente et ré-émergente qui est très répandue dans de nombreux pays, particulièrement les pays du bassin méditerranéen, et qui pose un grand problème de santé publique. Sa forte prévalence observée chez les animaux d'élevage en particulier les ovins, entraine de grande perte économique qui dépasse les 2 milliards de dollars au niveau mondial. Toutefois, le risque sanitaire que l'hydatidose pose, en particulier chez la population rurale, reste très élevé et nécessite une mise en action d'un véritable programme de lutte.

Cette thèse avait pour objectifs d'évaluer deux approches de lutte dans l'une des régions les plus endémiques à l'échinococcose kystique, le Moyen Atlas au Maroc. Ces deux approches de lutte concernent la lutte chez le chien (hôte définitif) par la chimioprévention basée sur le traitement au Praziquantel et la lutte immunologique par l'essai du vaccin EG 95 utilisé pour la première fois au Maroc sur des moutons (hôte intermédiaire) exposés à l'infection au niveau des exploitations dans les conditions d'infection naturelles du terrain.

L'estimation de l'incidence d'infection par *E. granulosus* chez les chiens, a montré que, quelle que soit la durée et la fréquence du traitement 2 mois, 3 mois ou 4 mois, les chiens errants se ré-infestent rapidement par rapport aux chiens à propriétaires. Néanmoins, une réduction de l'incidence d'infection a été remarquée chez les deux catégories des chiens mais beaucoup plus chez les chiens à propriétaire (chiens errants qui représentent une probabilité d'infection 14 fois plus élevée que les chiens à propriétaires). Dès lors, il ne faut pas sous-estimer cette différence d'infection entre ces deux populations de chiens, sachant que le chien errant représente environ 1/3 de la population canine. En effet, si l'objectif d'un programme de lutte est de protéger l'Homme, dans ce cas le traitement des chiens à propriétaire (attachés et libres) sera prioritaire et à préconiser ; mais si le programme vise à protéger l'Homme et le mouton comme hôte intermédiaire, dans ce cas il faut traiter les deux catégories de chiens avec une focalisation de traitement sur les chiens errants et ferraux.

Le deuxième volet de cette thèse a permis de valider un outil d'investigation *in vivo* non invasif, facile à utiliser et surtout accepté par les éleveurs, pour évaluer la présence de kystes hydatiques chez le mouton dans les conditions épidémiologiques de notre région d'étude. Bien que l'échographie ne permette pas la détection des kystes pulmonaires, il a été montré que chez le mouton, 78% des animaux présentent des kystes hydatiques hépatiques et quasi 100% de ces animaux, pour autant qu'ils soient âgés de 3 ans ou plus, peuvent être détectés grâce à

l'échographie. Cette technique sera la meilleure méthode pratique à utiliser dans un contexte épidémiologique similaire lors d'un programme de lutte, pour une surveillance épidémiologique continue.

Puis, au final, la troisième recherche a montré que dans les circonstances épidémiologiques de la région d'étude une proportion importante (75%) de moutons à l'âge de 4 ans ont développé des kystes hydatiques. Le vaccin recombinant EG 95, administré dès le jeune âge aux animaux, s'avère efficace pour protéger le mouton même dans un environnement fortement infesté. Cependant, la combinaison des deux approches de lutte, la chimioprévention chez le chien à propriétaire et la vaccination chez le mouton n'a pas permis de montrer un effet synergique dans notre étude.

Par ailleurs, pour optimiser l'efficacité des différentes approches de lutte dans un programme de lutte basé sur la vaccination des moutons ou le traitement des chiens, il faudrait équiper les abattoirs et les décharges publiques par des clôtures pour interdire l'entrée des chiens et veiller à ce que les saisies contaminées au niveau des abattoirs soient complétement détruites. Sans oublier, de sensibiliser d'avantage la population sur la gravité de cette maladie et sur son mode de transmission.

En effet, pour déterminer l'impact de l'application de l'une de ces mesures de lutte, comme par exemple la pose de clôtures autour des abattoirs, le traitement des chiens, ou vaccination des moutons, il sera plus facile pour un suivi épidémiologique dans un programme de lutte, d'utiliser l'échographie comme moyen de dépistage de l'infection chez les moutons *in vivo*. Mais ceci est plus efficace quand on est placé dans un contexte épidémiologique similaire à notre zone d'étude, à prévalence élevée. Sinon dans un autre endroit où la contamination est faible, il faut échographier toutes les catégories d'âge mais surtout viser les jeunes animaux pour faire attention lors de l'abattage à ne pas exposer les organes contaminés aux chiens. Mais l'évolution de la transmission de cette zoonose pourrait aussi être suivie d'une manière encore plus précise que de suivre les chiens par des prélévements et analyses coproscopiques : en mesurant la pression infectueuse en termes de quantité d'œufs dans l'environement en fonction de la distance par rapport à la zone de l'étude et par rapport au temps, une estimation de la pression infectieuse à un endroit précis pourrait être envisageable. Cette mesure de la contamination au niveau de l'environnement serait un outil de surveillance applicable dans differents endroits (ménages, abattoirs, souks...etc), et donc une mesure importante pour visualiser l'efficacité d'un programme de lutte (Umhang et al., 2017).

De même, avant d'instaurer un programme de lutte surtout dans le contexte épidémiologique de nos régions d'étude, il faut d'abord évaluer l'acceptabilité par la population du moyen de lutte utilisé, tel que le coût de la vaccination par rapport au bénéfice sanitaire et/ou zootechnique.

Il faudra aussi prendre en considération l'infection par les autres taenia comme *Taenia hydatigena* et sa prévalence d'infection chez toutes les espèces d'animaux d'élevage et comparer cette prévalence à celle de l'infection par *E.granulosus*. Ceci, permettra de déterminer l'option de lutte adéquate et convenanble. Comme par exemple chez le chien, le traitement au praziquantel, permettra d'éliminer tous les cestodes et en fonction de la prévalence d'infection par l'une de ces *Taenia*, il sera possible d'orienter l'option de lutte vers une approche intégrée, visant plusieurs parasites à la fois et peut être combiner le traitement des chiens à la vaccination des moutons car des études ont montré que le vaccin anti-*E.granulosus* EG 95 protège aussi contre d'autres *Taenia spp* comme *T. hydatigena, T. ovis*, *E.multicularis* et récement contre *T. saginata* et *Taenia solium* (Lightowlers et al., 2003) et donc au final, la décision sera prise en fonction de l'ampleur de l'infection.

Afin de compléter les approches de contrôle, il sera important de determiner la contamination par *E.granulosus* chez les autres canidés non étudiés dans notre travail, notamment chez les canidés sauvages.

Un dernier objectif de cette recherche sera l'utilisation de l'ensemble des données épidémiologiques générées par cette recherche afin de modéliser et de prévoir l'impact du programme de lutte envisagé sur l'évolution de cette zoonose au cours du temps et en fonction de l'outil de lutte utilisé.

Références

Adidou, A. (2015) *Etude des principaux modèles de lutte contre l ' hydatidose kystique et suggestion d ' actions adaptées au contexte marocain*. Institut Agronomique et Vétérinaire HASSAN II.

Alvarez, J. H. (2005) 'Estimación de la prevalencia de equinococosis canina en la XII Región, Chile, 2002. Parasitol Latinoam.', (60), pp. 74–77.

Alvarez Rojas (a), C. A., Romig, T. and Lightowlers, M. W. (2014) 'Echinococcus granulosus sensu lato genotypes infecting humans - review of current knowledge', *International Journal for Parasitology*, 44(1), pp. 9–18. doi: 10.1016/j.ijpara.2013.08.008.

Alvarez Rojas, C. A., Gauci, C. G. and Lightowlers, M. W. (2013) 'Antigenic differences between the EG95-related proteins from Echinococcus granulosus G1 and G6 genotypes: Implications for vaccination', *Parasite Immunology*, 35(2), pp. 99–102. doi: 10.1111/pim.12009.

Amarir (2017) 'Communication personnelle 2017', *Communication orale au 27th World Congress of Echinococcosis 2017*.

Amarir, F. E. *et al.* (2020) 'Cystic echinococcosis in three locations in the Middle Atlas, Morocco: Estimation of the infection rate in the dog reservoir', *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 20(6), pp. 436–443. doi: 10.1089/vbz.2019.2538.

Andersen, F. L. *et al.* (1983) 'Evaluation of a program to control hydatid disease in central Utah. Great Basin Nat.', (43), pp. 65–72.

Andersen, F. L., Ouhelli, H. and Kachani, M. (1997) '(Eds.), Compendium on cystic echinococcosis in Africa and in Middle Eastern Countries with special reference to Morocco', *Brigham Young University, Print Services, Provo, UT 84602, USA*, pp. 245–277.

Anderson, F., Chain Jun, J. and Fneg, J. (1992) 'General introduction to cystic echinococcosis and description of cooperative research efforts in the Xjiang Autonomous region', pp. 3–15.

ANOC (2019) 'Association Nationale des éleveurs Ovins et Caprin', *Données, 2019*.

Arenas et al. (2019) 'Molecular detection of Bartonella , Ehrlichia and Mycoplasma in feral dogs of El Pedregal de San Angel Ecological Reserve in Mexico City', *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 2961, pp. 728–734.

Azlaf, R. *et al.* (2007) 'Modelling the transmission of Echinococcus granulosus in dogs in the northwest and in the southwest of Morocco', *Veterinary Parasitology*, 145(3–4), pp. 297–

303. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.12.014.

Azlaf, R. and Dakkak, A. (2006) 'Epidemiological study of the cystic echinococcosis in Morocco', *Veterinary Parasitology*, 137(1–2), pp. 83–93. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.01.003.

Battelli, G. (2004) 'Socio-economic impact of cystic echinococcosis and of its control: Some data and considerations', *Parassitologia*, 46(4), pp. 359–362.

Battelli, G. (2009) 'Echinococcosis: Costs, losses and social consequences of a neglected zoonosis', *Veterinary Research Communications*, 33(SUPPL. 1), pp. 47–52. doi: 10.1007/s11259-009-9247-y.

Beard, T. C. (1973) 'The elimination of echinococcosis from Iceland', *Bulletin of the World Health Organization*, 48(6), pp. 653–660.

Belamalem, S. *et al.* (2014) 'Épidémiologie de l'hydatidose dans la Région du Gharb (Chrarda Beni Hssen) Maroc', *Antropo*, (31), pp. 33–37.

Belkourati, I. (2010) 'Contribution à l'"étude épidémiologique de l'"hydatidose dans la province de sidi Kacem. Thèse Doct Vét, IAV Hassan II, Rabat, Maroc.'

Benito, A. and Carmena, D. (2005) 'Double-antibody sandwich ELISA using biotinylated antibodies for the detection of Echinococcus granulosus coproantigens in dogs', *Acta Tropica*, 95(1), pp. 9–15. doi: 10.1016/j.actatropica.2005.03.005.

El Berbri, I., Petavy, A. F., *et al.* (2015) 'Epidemiological Investigations on Cystic Echinococcosis in North-West (Sidi Kacem Province) Morocco: Infection in Ruminants', *Advances in Epidemiology*, 2015, pp. 1–9. doi: 10.1155/2015/104025.

El Berbri, I. (2015) *Epidémiologie de l'échinococcose hydatidose kystique dans la province de Sidi Kacem et évaluation d'actions de lutte conséquentes dans le cadre d'une approche intégrée associant la leishmaniose viscérale et la rage*. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II.

El Berbri, I., Ducrotoy, M. J., *et al.* (2015) 'Knowledge, attitudes and practices with regard to the presence, transmission, impact, and control of cystic echinococcosis in Sidi Kacem Province, Morocco', *Infectious Diseases of Poverty*, 4(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s40249-015-0082-9.

Bouaddi, K. *et al.* (2018) 'Socioecology of the canine population in the Province of El Jadida, Morocco', *Veterinary Medicine International*, 2018. doi: 10.1155/2018/4234791.

Boufana, B. *et al.* (2015) 'Canine echinococcosis: Genetic diversity of Echinococcus granulosus sensu stricto (s.s.) from definitive hosts', *Journal of Helminthology*, 89(6). doi: 10.1017/S0022149X15000395.

Boulanouar, B. and Paquay, R. (2008) 'Perspectives de la production ovine au Maroc', 47(78), pp. 39–47.

Bourdoiseau, P. G. (2017) 'Particularities and Limits of the Vaccines', (1), pp. 37–42.

Bourée, P. and Bisaro, F. (2007) 'Hydatidose : aspects épidémiologique et diagnostique', *Antibiotiques*, 9(4), pp. 237–245.

Bouslikhane, M. and Ouafaa, F. F. (2016) 'Z O O N O T I C E N C O U N T E R S AT THE SLAUGHTERHOUSE : PATHWAYS AND POSSIBILITIES FOR THE CONTROL OF CYSTIC ECHINOCOCCOSIS IN NORTHERN MOROCCO', pp. 92–115. doi: 10.1017/S0021932015000486.

Buishi, I. *et al.* (2005) 'Reemergence of canine Echinococcus granulosus infection, Wales', *Emerging Infectious Diseases*, 11(4), pp. 568–571. doi: 10.3201/eid1104.040178.

Burridge, M. J. and Schwabe, C. W. (1977) 'Epidemiological analysis of factors influencing rate of progress in Echinococcus granulosus control in New Zealand. J Hyg.', (78), pp. 151–163.

Cabrera, P. A. *et al.* (1996) 'Rates of reinfection with Echinococcus granulosus, Taenia hydatigena, Taenia ovis and other cestodes in a rural dog population in Uruguay', *International Journal for Parasitology*, 26(1), pp. 79–83. doi: 10.1016/0020-7519(95)00082-8.

Cabrera, P. A. *et al.* (2002) 'Control of Echinococcus granulosus in Uruguay: Evaluation of different treatment intervals for dogs', *Veterinary Parasitology*, 103(4), pp. 333–340. doi: 10.1016/S0304-4017(01)00603-3.

Capuano, F. *et al.* (2006) 'Cystic echinococcosis in water buffaloes: Epidemiological survey and molecular evidence of ovine (G1) and buffalo (G3) strains', *Veterinary Parasitology*, 137(3–4), pp. 262–268. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.01.016.

Cardona, G. A. and Carmena, D. (2013) 'A review of the global prevalence, molecular epidemiology and economics of cystic echinococcosis in production animals', *Veterinary Parasitology*, 192(1–3), pp. 10–32. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.09.027.

Castiglia, P. *et al.* (2004) 'Epidemiology of hydatidosis in the province of Sassari, Italy. Parassitologia.', (46), pp. 371–373.

Chaâbane-Banaoues, R. *et al.* (2015) 'Infection of dogs with Echinococcus granulosus: Causes and consequences in an hyperendemic area', *Parasites and Vectors*, 8(1), pp. 1–9. doi: 10.1186/s13071-015-0832-3.

Chandra, R. K. (1982) 'Immune Responses in Parasitic Diseases. Part B: Mechanisms', *Clinical Infectious Diseases*, 4(4), pp. 756–762. doi: 10.1093/4.4.756.

Chauve, C. M. (1990) 'Séminaire international sur l'hydatidose', in. Tlemcen.

Chebli, H. *et al.* (2017) 'Human cystic echinococcosis in Morocco: Ultrasound screening in the Mid Atlas through an Italian-Moroccan partnership', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(3), pp. 1–20. doi: 10.1371/journal.pntd.0005384.

Chow, C. *et al.* (2004) 'Echinococcus granulosus: Oncosphere-specific transcription of genes encoding a host-protective antigen', *Experimental Parasitology*, 106(3–4), pp. 183–186. doi: 10.1016/j.exppara.2004.03.009.

Christofi, G. *et al.* (2002) 'Screening of dogs for Echinococcus granulosus coproantigen in a low endemic situation in Cyprus', *Veterinary Parasitology*, 104(4), pp. 299–306. doi: 10.1016/S0304-4017(01)00637-9.

Comité interministériel de lutte contre L'Hydatidose (2007) 'Lutte contre l'hydatidose/echinococcose Guide des activités de lutte'.

Condie, S. J. *et al.* (1981) 'Participation in a community program to prevent hydatid disease. Public Health.', (95), pp. 28–35.

Craig, P. S. *et al.* (1995) 'Diagnosis of canine echinococcosis: comparison of coproantigen and serum antibody tests with arecoline purgation in Uruguay', *Veterinary Parasitology*, 56(4), pp. 293–301. doi: 10.1016/0304-4017(94)00680-B.

Craig, P. S. *et al.* (2017a) 'Echinococcosis: Control and Prevention', *Advances in Parasitology*, 96, pp. 55–158. doi: 10.1016/bs.apar.2016.09.002.

Craig, P. S. *et al.* (2017b) *Echinococcosis: Control and Prevention, Advances in Parasitology*. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/bs.apar.2016.09.002.

Craig, P. S. and Larrieu, E. (2006) 'Control of Cystic Echinococcosis/Hydatidosis: 1863-2002', *Advances in Parasitology*, 61(05), pp. 443–508. doi: 10.1016/S0065-308X(05)61011-1.

Dakkak, A. (2003) 'Le chien et la contamination de l'environnement par les oncospheres d'Echinococcus granulosus: Cas de 4 régions du Maroc', *Société Française de Parasitologie. Maisons Alfort, France, 16–18 Décembre*.

Dakkak, A. (2010) 'Echinococcosis/hydatidosis: A severe threat in Mediterranean countries', *Veterinary Parasitology*, 174(1–2), pp. 2–11. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.08.009.

Dakkak, A. *et al.* (2017) 'Echinococcus granulosus infection in dogs in Sidi Kacem Province (North-West Morocco)', *Acta Tropica*, 165, pp. 26–32. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.07.007.

DAKKAK, A. (1992) *Echinococcosis/hydatidosis in Noth Africa: Geographical distribution of species and strains and prevalence in man and animals, WHO Guidelines of Echinococcosis / Hydatidosis: Diagnosis and control. Vet. Public heath and*

communicable diseases Division, WHO, Genova Publications.

Dalimi, A. *et al.* (2017) 'Genotyping echinococcus granulosus from canine isolates in ilam province, west of Iran', *Iranian Journal of Parasitology*, 12(4), pp. 614–621.

Daniel Mwambete, K., Ponce-Gordo, F. and Cuesta-Bandera, C. (2004) 'Genetic identification and host range of the Spanish strains of Echinococcus granulosus', *Acta Tropica*, 91(2), pp. 87–93. doi: 10.1016/j.actatropica.2004.04.001.

Davidson, R. M. (2002) 'Control and eradication of animal diseases in New Zealand. New Zeal Vet J.', (50), pp. 6–12.

DELM (2008) *Direction de l'épidémiologie et de lutte contre les maladies, ministre de la santé Maroc*.

DELM (2015) *Direction de l'épidémiologie et de lutte contre les maladies, ministre de la santé Maroc, Bultein épidémiologique 2015*.

Deplazes, P. *et al.* (1994) 'Primary infection of dogs with Echinococcus granulosus: systemic and local (Peyer's patches) immune responses', *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 40(2), pp. 171–184. doi: 10.1016/0165-2427(94)90032-9.

Derfoufi, O. *et al.* (2012) 'Profil épidémiologique de l'hydatidose au Maroc de 1980 à 2008', *Annales de Biologie Clinique*, 70(4), pp. 457–461. doi: 10.1684/abc.2012.0727.

Develoux, M. (1996) 'L'hydatidose en Afrique en 1996', *Aspects épidémiologiques.Med.trop*, 56, pp. 177–183.

Díaz, A. *et al.* (2016) 'Parasite molecules and host responses in cystic echinococcosis', *Parasite Immunology*, 38(3), pp. 193–205. doi: 10.1111/pim.12282.

Díaz, A. *et al.* (1999) 'Control of host complement activation by the Echinococcus granulosus hydatid cyst', *Immunopharmacology*, 42(1–3), pp. 91–98. doi: 10.1016/S0162-3109(99)00023-5.

DMT/DELM (2007) 'Ministère de la Santé du Maroc', *Situation épidémiologique des maladies parasitaires, Direction de l'Epidémiologie et de la Lutte contre les maladies. Service des maladies parasitaires*.

Dore, F. *et al.* (2014) 'Ultrasound as a monitoring tool for cystic echinococcosis in sheep', *Veterinary Parasitology*, 203(1–2), pp. 59–64. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.03.016.

Dousti, M. *et al.* (2013) 'Genotyping of hydatid cyst isolated from human and domestic animals in Ilam Province, Western Iran using PCR-RFLP', *Iranian Journal of Parasitology*, 8(1), pp. 47–52.

Drif, K. (2017) *Etude de la prévalence, caractéristiques lésionnelles, fértilité, viabilité et localisation des kystes hydatiques chez les ruminants domestiques dans la province de*

Khénifra. Institut Agronomique et Vétérinaire HASSAN II.

Dueger, E. L. and Gilman, R. H. (2001) 'Prevalence, intensity, and fertility of ovine cystic echinococcosis in the central Peruvian Andes', *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(4), pp. 379–383. doi: 10.1016/S0035-9203(01)90188-9.

Dumon, H. and Quilici, M. (1978) 'La maladie hydatique / Parasitologie épidemiologie et prophylaxie', *Revue du praticien*, 28(37), pp. 2827–2834.

Eckert, J. *et al.* (2002) *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern*, *Veterinary Parasitology*. doi: 10.1016/s0304-4017(01)00631-8.

Eckert, J. and Deplazes, P. (2004) 'Biological, epidemiological, and clinical aspect of Echinococcus, a zoonosis of increasing concern. Clin', *Microbiol. Rev.*, 17(1), p. 107.

Eckert, J., Gemmell, M. A. and Meslin, F. X. (2001) *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern*.

Economides, P. and Christofi, G. (2000) 'Evaluation of control programmes for echinococcosis/hydatidosis in Cyprus', *OIE Revue Scientifique et Technique*, 19(3), pp. 784–792. doi: 10.20506/rst.19.3.1252.

Economides, P., Christofi, G. and Gemmell, M. A. (1998) 'Control of Echinococcus granulosus in Cyprus and comparison with other island models', *Veterinary Parasitology*, 79(2), pp. 151–163. doi: 10.1016/S0304-4017(98)00163-0.

Engler, A. *et al.* (2019) 'Simple liver cysts and cystoid lesions in hepatic alveolar echinococcosis: A retrospective cohort study with Hounsfield analysis', *Parasite*, 26. doi: 10.1051/parasite/2019057.

Esteves, A., Dallagiovanna, B. and Ricardo, E. (1993) 'A developmentally regulated gene of Echinococcus granulosus codes for a 15.5-kilodalton polypeptide related to fatty acid binding proteins', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 58(2), pp. 215–222.

Euzéby, J. (1971) *Les échinococcoses animales et leurs relations avec les échinococoses de l'homme*. Edited by Vigot.

Faouzi, M. and Rhimi, S. (2014) *Contribution à la lutte intégrée contre les zoonoses transmises par le chien dans la province de Sidi Kacem, dans le cadre du projet ICONZ*. Institut Agrnomique et Vétérinaire HASSAN II.

Farias, L. N. *et al.* (2004) 'Echinococcosis in Southern Brazil: Efforts toward implementation of a control program in Santana do Livramento, Rio Grande do Sul', *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 46(3), pp. 153–156. doi: 10.1590/s0036-

46652004000300006.

Garippa, G. (2006) 'Updates on Cystic Echinococcosis (CE) in Italy', *Parassitologia*, 48(1–2), pp. 57–59.

Gauci, C., Jenkins, D. and Lightowlers, M. W. (2011) 'Strategies for optimal expression of vaccine antigens from taeniid cestode parasites in escherichia coli', *Molecular Biotechnology*, 48(3), pp. 277–289. doi: 10.1007/s12033-010-9368-0.

Gemmell, M. A. (1985) 'Modern concepts on host/parasite relation ships in echinococcosis', *XIII congreso internacional de hidatidologia, Madrid*.

Gemmell, M. A. (1991) 'Convincing the legislature to support control, in: De Rosa F. (Ed), Archivos de la hydatidosis. XV Extrardinary Congress for the Celebration of the 50 Years of A.I.H. John Libbey CIC SRI., Rome, Italy', pp. 71–75.

Gemmell, M. A. *et al.* (2001) 'Chapiter 6: Control of Echinococcus granulosus, in: Eckert, J., Gemmell, M.A., Meslin, F-X., Pawłowski, Z.S. (Eds.), WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern', *World Organisation for Animal Health (OIE) and World Health Organization (WHO), Paris*, pp. 195–203.

Gharbi, H. A. *et al.* (1981) 'Ultrasound examination of the hydatic liver.', *Radiology*, 139, p. 2.

Gottstein, B. *et al.* (2017) 'Immunology of Alveolar and Cystic Echinococcosis (AE and CE)', *Advances in Parasitology*, 96, pp. 1–54. doi: 10.1016/bs.apar.2016.09.005.

Guarnera, E. A. *et al.* (2001) 'Ultrasonographic diagnosis of ovine cystic echinococcosis', *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 42(4), pp. 352–354. doi: 10.1111/j.1740-8261.2001.tb00953.x.

Guarnera, E. A. *et al.* (2004) 'Cystic echinococcosis in Argentina: evolution of metacestode and clinical expression in various Echinococcus granulosus strains', *Acta Tropica*, 92(2), pp. 153–159. doi: 10.1016/j.actatropica.2004.06.008.

HCP, H. C. for P. (2014) *High Commission for Planning*. Available at: www.hcp.ma.

Heath, D. D. (1973) *The life cycle of Echinococcus granulosus, Recent Advances in Hydatid Disease*. Victoria.

Heath, D. D. *et al.* (1981) 'Resistance to Echinococcus granulosus Infection in Lambs', *The Journal of Parasitology*, 67(6), p. 797. doi: 10.2307/3280702.

Heath, D. D., Holcman, B. and Shaw, R. J. (1994) 'Echinococcus granulosus: the mechanism of oncosphere lysis by sheep complement and antibody', *International Journal for Parasitology*, 24(7), pp. 929–935. doi: 10.1016/0020-7519(94)90156-2.

Heath, D. D., Jensen, O. and Lightowlers, M. W. (2003) 'Progress in control of hydatidosis

using vaccination - A review of formulation and delivery of the vaccine and recommendations for practical use in control programmes', *Acta Tropica*, 85(2), pp. 133–143. doi: 10.1016/S0001-706X(02)00219-X.

Heath, D. D. and Lawrence, S. B. (1996) 'Antigenic polypeptides of Echinococcus granulosus oncospheres and definition of protective molecules', *Parasite Immunology*, 18(7), pp. 347–357. doi: 10.1046/j.1365-3024.1996.d01-114.x.

Heidari, Z. *et al.* (2019) 'Echinococcus multilocularis and Echinococcus granulosus in canines in North-Khorasan Province, northeastern Iran, identified using morphology and genetic characterization of mitochondrial DNA', *Parasites and Vectors*, 12(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/s13071-019-3859-z.

Higuita, N. I. A., Brunetti, E. and McCloskey, C. (2016) 'Cystic Echinococcosis', *Journal of Clinical Microbiology*. doi: 10.1128/JCM.02420-15.

Hobbs, R. P., Lymbery, A. J. and Thompson, R. C. A. (1990) 'Rostellar hook morphology of Echinococcus granulosus (Batsch, 1786) from natural and experimental Australian hosts, and its implications for strain recognition', *Parasitology*, 101(2), pp. 273–281. doi: 10.1017/S0031182000063332.

Hong, S. T. *et al.* (2003) 'Sustained-release praziquantel tablet: Pharmacokinetics and the treatment of clonorchiasis in beagle dogs', *Parasitology Research*, 91(4), pp. 316–320. doi: 10.1007/s00436-003-0958-7.

Hussein, H. A. and Elrashidy, M. (2014) 'Ultrasonographic features of the liver with cystic echinococcosis in sheep', *Veterinary Record Open*, 1(1), p. e000004. doi: 10.1136/vropen-2013-000004.

J. D. McConnell and R. J. Green (1979) 'The control of hydatid disease in Tasmania', *Australian Veterinary Journal*, 55.

Jenkins, D. J. (2004) 'Cystic echinococcosis in Australia: the current situation. SE Asian J Trop Med Public Health.', (35), pp. 183–188.

Jimenez, S. *et al.* (2002) 'Progress in control of cystic echinococcosis in La Roja, Spain: decline in infection prevalences in human and animal hosts and economic costs and benefits. Acta Trop.', (83), pp. 213–221.

Kachani, F. (2000) 'Contribution à l'étude de l'impact socio-économique de l'hydatidose chez les ruminants dans la région de Khénifra. Thèse Doct Vét, IAV Hassan II, Rabat, Maroc'.

Kachani, M. *et al.* (1997) 'Prevalence of hydatid cysts in livestock in Morocco and potential role of these intermediate hosts in transmission of cystic echinococcosis. In: Andersen FL, Ouhelli H, Kachani M, eds', in *Compendium of Cystic Echinococcosis in Africa and*

in Middle Eastern Countries with special Reference to Morocco. Provo: Brigham Young University, pp. 156–168.

Kamenetzky, L. *et al.* (2002) 'Several strains of Echinococcus granulosus infect livestock and humans in Argentina', *Genet Evol*, 2, pp. 129–136.

Kandeel, A. E. *et al.* (2009) 'Anatomical and ultrasonographic study of the stomach and liver in sheep and goats', *Iraqui Journal of Veterinary Sciences*, 23(2), pp. 181–191.

Khayat, R. (2006) *Contribution au développement d'un modèle intégré de lutte contre l'hydatidose/échinococcose au Maroc*. Institut Agronomique et Vétérinaire HASSAN II.

Klotz, F. *et al.* (2000) 'Les kystes hydatiques du foie', in *Encycl Méd chir*, p. 16.

De La Rue, M. (2008) 'Cystic echinococcosis in southern Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo.', (50), pp. 53–56.

Lahmar, S. *et al.* (1999) 'Echinococcus granulosus larvae in the livers of sheep in Tunisia: The effects of host age', *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 93(1), pp. 75–81. doi: 10.1080/00034989958825.

Lahmar, S. *et al.* (2004) 'Transmission dynamics of the Echinococcus granulosus sheep dog strain (G1genotype) in camels in Tunisia', *Vet Parasitol*, 121, pp. 151–156.

Lahmar, S. *et al.* (2007) 'Ultrasonographic screening for cystic echinococcosis in sheep in Tunisia', *Veterinary Parasitology*, 143(1), pp. 42–49. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.08.001.

Lahmar, S., Kilani, M. and Torgerson, P. R. (2001) 'Frequency distributions of Echinococcus granulosus and other helminths in stray dogs in Tunisia', *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 95(1), pp. 69–76. doi: 10.1080/00034980020035933.

Lahmar, Selma *et al.* (2007) 'Screening for Echinococcus granulosus in dogs: Comparison between arecoline purgation, coproELISA and coproPCR with necropsy in pre-patent infections', *Veterinary Parasitology*, 144(3–4), pp. 287–292. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.10.016.

Larrieu, E. *et al.* (2000) 'Control program of hydatid disease in the Province of Río Negro, Argentina, 1980–1997. Bol Chilen Parasitol.', (55), pp. 49–53.

Larrieu, E. *et al.* (2013) 'Pilot field trial of the EG95 vaccine against ovine cystic echinococcosis in Rio Negro, Argentina: Early impact and preliminary data', *Acta Tropica*, 127(2), pp. 143–151. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.04.009.

Larrieu, E., Gavidia, C. M. and Lightowlers, M. W. (2019) 'Control of cystic echinococcosis: Background and prospects', *Zoonoses and Public Health*, 66(8), pp. 889–899. doi: 10.1111/zph.12649.

Larrieu, E. and Zanini, F. (2012) 'Critical analysis of cystic echinococcosis control programs

and praziquantel use in South America, 1974-2010', *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*, 31(1), pp. 81–87. doi: 10.1590/S1020-49892012000100012.

Lavikainen, A. *et al.* (2003) 'Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain', *a new genotypic group (G10) of Echinococcus granulosus. Parasitology*, 127, pp. 207–15.

Lawson, J. R. and Gemmell, M. A. (1983) 'Hydatidosis and cysticercosis: the dynamics of transmission.', *Adv Parasitol*, 22, pp. 262–308.

Li, J. *et al.* (2014) 'Boiling sheep liver or lung for 30 minutes is necessary and sufficient to kill Echinococcus granulosus protoscoleces in hydatid cysts', *Parasite*, 21. doi: 10.1051/parasite/2014064.

Lightowlers, M. W. (1990) 'Immunology and molecular biology of Echinococcus infections', *International Journal for Parasitology*, 20(4), pp. 471–478. doi: 10.1016/0020-7519(90)90194-R.

Lightowlers, M. W. *et al.* (1996) 'Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen', *Parasite Immunology*, 18(9), pp. 457–462. doi: 10.1111/j.1365-3024.1996.tb01029.x.

Lightowlers, M. W. *et al.* (1999) 'Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep', *International Journal for Parasitology*, 29(4), pp. 531–534. doi: 10.1016/S0020-7519(99)00003-X.

Lightowlers, M. W. *et al.* (2000) 'Vaccination Against Cysticercosis and Hydatid Disease', *Parasitology Today*, 16(5), pp. 191–196. doi: 10.1016/S0169-4758(99)01633-6.

Lightowlers, M. W. *et al.* (2003) 'Vaccination against cestode parasites: Anti-helminth vaccines that work and why', *Veterinary Parasitology*, 115(2), pp. 83–123. doi: 10.1016/S0304-4017(03)00202-4.

Lightowlers, M. W. (2006) 'Cestode vaccines: Origins, current status and future prospects', *Parasitology*, 133(SUPPL.2). doi: 10.1017/S003118200600179X.

Lloyd, L. S. *et al.* (1992) 'Results of a community-based Aedes aegypti control program in Merida, Yucatan, Mexico. Am. J. Trop', *Med. Hyg*, 46, pp. 635–642.

M'rad, S. *et al.* (2010) 'Molecular Identification of Echinococcus granulosus in Tunisia: First Record of the Buffalo Strain (G3) in Human and Bovine in the Country', *Open Vet Sci J*, 4, pp. 27–30.

Macpherson, C. N. L. (2005) 'Human behaviour and the epidemiology of parasitic zoonoses. Int J Parasitol.', pp. 1319–1331.

Macpherson, C. N. L., Meslin, F. X. and Wandeler, A. I. (2013) 'Dogs, Zoonoses and Public Health. 2nd edition.', p. 277.

Macpherson, C. N. L. and Wachira, T. W. M. (1997) 'Cystic echinococcosis in Africa south of the Sahara, in: Andersen, F.L., Ouhelli H., Kachani, M., (Eds.),Compendium on cystic echinococcosis in Africa and in Middle Eastern Countries with special reference to Morocco. Brigham Young University, Print Servi', pp. 245–277.

Maghnouj, M. (1999) 'Quelques espèces de mammifères de la cédraie au Maroc : cas du singe magot', *Forêt Méditerranéenne*, 20(3), pp. 101–106.

Maillard, S. *et al.* (2007) 'Taxonomic position and geographical distribution of the common sheep G1 and camel G6 strains of Echinococcus granulosus in three African countries', *Parasitology Research*, 100(3), pp. 495–503. doi: 10.1007/s00436-006-0286-9.

Maillard, S. *et al.* (2009) 'The EmsB tandemly repeated multilocus microsatellite: A new tool to investigate genetic diversity of Echinococcus granulosus sensu lato', *Journal of Clinical Microbiology*, 47(11), pp. 3608–3616. doi: 10.1128/JCM.00938-09.

El Mansouri, B. *et al.* (2015) 'Hydatidosis human in Rabat region (Morocco): study of prevalence and contribution of serological diagnosis', *Int J Innov Sci Res*, 14, pp. 252–8.

Mantovani, A. (1980) 'Information on echinococcosis hydatidosis in Italy', *Working paper for the WHO. European Meeting on Hydatidosis Control (Mediterranean Countries)*, (Document ICP/BVM 009).

Mao, R. *et al.* (2017) 'CT Scanning in Identification of Sheep Cystic Echinococcosis', *BioMed Research International*, 2017. doi: 10.1155/2017/4639202.

Marcotty, T. *et al.* (2013) 'Intersectoral collaboration between the medical and veterinary professions in low-resource societies: The role of research and training institutions', *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 36(3), pp. 233–239. doi: 10.1016/j.cimid.2012.10.009.

Marossi, A. (2010) 'Etude Qualitative Sur La Perception de l ' Hydatidose / Echinococcose En Haut et Moyen Atlas', *Thèse médecine vétérinaire. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II*.

Mathis, A. and Deplazes, P. (2006) 'Copro-DNA tests for diagnosis of animal taeniid cestodes', *Parasitology International*, 55(SUPPL.). doi: 10.1016/j.parint.2005.11.012.

Maxson, A. D. *et al.* (1996) 'The use of ultrasound to study the prevalence of hydatid cysts in the right lung and liver of sheep and goats in Turkana, Kenya', *International Journal for Parasitology*, 26(11), pp. 1335–1338. doi: 10.1016/S0020-7519(96)00124-5.

McMANUS, D. P. and THOMPSON, R. C. A. (2003) 'Molecular epidemiology of cystic

echinococcosis', *Parasitology*, 127(S1), pp. S37–S51. doi: 10.1017/S0031182003003524.

MEYMARIAN, E. and SCHWABE, C. W. (1962) 'Host-parasite relationships in echinococcosis. VII. Resistance of the ova of Echinococcus granulosus to germicides.', *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 11, pp. 360–4.

Ministère de la Santé du Maroc (2012) *Ministère de la santé du Maroc, Direction de l'épidémiologie et de la lutte contre les maladies. Service des Maladies Parasitaires, Ministère de la Santé, Rabat, Maroc*. Available at: www.sante.gov.ma.

Ministère de la Santé du Maroc (2015) *Ministère de la Santé du Maroc, Direction de l'épidémiologie et de la lutte contre les maladies. Service des Maladies Parasitaires, Ministère de la Santé, Rabat, Maroc*. Available at: www.sante.gov.ma.

Ministry for Agriculture of the People's Republic of China (2017) *National Animal Disease Compulsory Immunization Program 2017*. Available at: http://jiuban.moa.gov.cn/zwllm/ghjh/201703/t20170320_5530358.htm (Accessed: 10 June 2020).

MORAR, R. and FELDMAN, C. (2003) 'Pulmonary echinococcosis', *European Respiratory Journal. 2003 21: 1069-1077; DOI: 10.1183/09031936.03.00108403. R. Morar.*

Mourglia-Ettlin, G. *et al.* (2018) 'Ageing impairs parasite-specific antibody responses in cystic echinococcosis', *Parasite Immunology*, 40(1), pp. 10–13. doi: 10.1111/pim.12505.

Naidich, A. *et al.* (2006) 'Patent and pre-patent detection of Echinococcus granulosus genotypes in the definitive host', *Molecular and Cellular Probes*, 20(1), pp. 5–10. doi: 10.1016/j.mcp.2005.08.001.

Nakao, M. *et al.* (2013) 'Phylogenetic systematics of the genus Echinococcus (Cestoda: Taeniidae)', *International Journal for Parasitology*, 43(12–13), pp. 1017–1029. doi: 10.1016/j.ijpara.2013.06.002.

OMS (2003) *Report of the WHO Informal Working Group on cystic and alveolar echinococcosis surveillance, prevention and control, with the participation of the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Organisation for Animal Health*. Switzerland.

OMS (2012) 'Distribution of Echinococcus granulosus and cystic echinococcosis, worldwilde, 2011', *Control of Neglected Tropical Diseases (NTDs), World Health Organization, Geneva*.

ONSSA, N. O. of S. S. of F. P. (2015) *National Office of Sanitary Security of Food Products*. Available at: http://www.onssa.gov.ma.

ONSSA, N. O. of S. S. of F. P. (2019) *National Office of Sanitary Security of Food Products*. Available at: http://www.onssa.gov.ma.

Otero-Abad, B. and Torgerson, P. R. (2013) 'A Systematic Review of the Epidemiology of Echinococcosis in Domestic and Wild Animals', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(6). doi: 10.1371/journal.pntd.0002249.

Otero-Abad, B., Torgerson, P. R. and V, E. S. P. B. (2013) 'A Systematic Review of the Epidemiology of Echinococcosis in Domestic and Wild Animals', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(6), pp. 303–319. doi: 10.1371/journal.pntd.0002249.

Oudni, M. *et al.* (2004) 'Genetic relationships between sheep, cattle and human Echinococcus infection in Tunisia', *Veterinary Parasitology*, 121(1–2), pp. 95–103. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.01.019.

Ouhelli, H. *et al.* (1997) 'Prevalence of Echinococcus granulosus in dogs in Morocco and potential role of dogs in transmission of cystic echinococcosis.', in *Compendium on cystic echinococcosis in Africa and in the Middle Eastern countries with special reference to Morocco*, pp. 145–155.

Ould Ahmed Salem, C. B. *et al.* (2010) 'Prévalence et aspects lésionnels de l'hydatidose chez les dromadaires et les petits ruminants au nord de la Mauritanie', *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 63(1–2), p. 23. doi: 10.19182/remvt.10105.

Ozdemir, Z. *et al.* (2019) 'Investigation of pharmacokinetic interaction between ivermectin and praziquantel after oral administration in healthy dogs', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 42(5), pp. 497–504. doi: 10.1111/jvp.12769.

Palmer, Jubb and Kennedy (2015) *Pathology of DOMESTIC ANIMALS*. 6th editio. Edited by M. Grant maxie.

Palmer, S. R. *et al.* (1996) 'Control of hydatid disease in Wales. BMJ.', (312), pp. 674–675.

Pawlowski (2001) 'WHO/OIE Manuel on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern', *Paris: World Health Organisation for Animal Health*.

Pawlowski, Z. . (1997) 'Critical points in the clinical management of cystic echinococcosis : a revised review', in *Compendium on cystic echinococcosis in Africa and in the Middle Eastern countries with special reference to Morocco*, pp. 119–135.

Pierangeli, N. B. *et al.* (2007) 'Heterogeneous distribution of human cystic echinococcosis after a long-term control program in Neuquén, Patagonia Argentina. Parasitol Int.', pp. 149–155.

Rickard, M. D. and Williams, J. F. (1982) 'Hydatidosis/Cysticercosis: Immune Mechanisms

and Immunization Against Infection', *Advances in Parasitology*, 21(C), pp. 229–296. doi: 10.1016/S0065-308X(08)60277-8.

Riesle, S. *et al.* (2014) 'Bovine IgG subclasses and fertility of Echinococcus granulosus hydatid cysts', *Veterinary Parasitology*, 205(1–2), pp. 125–133. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.06.003.

Ripoche, M. (2009) *La lutte contre l'hydatidose en Sardaigne*. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Riveau, G. (2000) 'Vaccins antiparasitaires', *Vaccinations, actualités et perspectives*, pp. 303–311.

Romig, T., Dinkel, A. and Mackenstedt, U. (2006) 'The present situation of echinococcosis in Europe', *Parasitology International*, 55(SUPPL.), pp. 187–191. doi: 10.1016/j.parint.2005.11.028.

ROSENZVIT, M. C. *et al.* (1999) 'Genetic variation and epidemiology of Echinococcus granulosus in Argentina', *Parasitology*, 118(5), pp. 523–530. doi: 10.1017/S0031182099004035.

Rostami Nejad, M. *et al.* (2008) 'Echinococcus granulosus strain differentiation in Iran based on sequence heterogeneity in the mitochondrial 12S rRNA gene', *Journal of Helminthology*, 82(4), pp. 343–347. doi: 10.1017/S0022149X0804594X.

Saadi, A. *et al.* (2020) 'The socio-economic burden of cystic echinococcosis in morocco: A combination of estimation method', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(7), pp. 1–20. doi: 10.1371/journal.pntd.0008410.

Sadjjadi, S. M. (2006) 'Present situation of echinococcosis in the Middle East and Arabic North Africa', *Parasitology International*, 55(SUPPL.), pp. 197–202. doi: 10.1016/j.parint.2005.11.030.

Sage, A. M. *et al.* (1998) 'Evaluation of diagnostic ultrasound as a mass screening technique for the detection of hydatid cysts in the liver and lung of sheep and goats', *International Journal for Parasitology*, 28(2), pp. 349–353. doi: 10.1016/S0020-7519(97)00187-2.

Scala, A., Varcasia, A. and Garippa, G. (2004) 'Cystic echinococcosis in Sardinia: the current role of sheep. Parassitologia.', (46), pp. 397–400.

Schantz, P. M. (2006) 'Progress in diagnosis, treatment and elimination of echinococcosis and cysticercosis', *Parasitology International*, 55(SUPPL.). doi: 10.1016/j.parint.2005.11.050.

Scott, P. R. and Sargison, N. D. (2010) 'Ultrasonography as an adjunct to clinical examination in sheep', *Small Ruminant Research*, 92(1–3), pp. 108–119. doi:

10.1016/j.smallrumres.2010.04.011.

Sigurdarson, S. (2010) 'Dogs and echinococcosis in Iceland (Oral presentation). Acta Vet Scand.', (52: S6), p. doi:10.1186/1751-0147-52-S1-S6.

Silvane, L. *et al.* (2020) 'A Vaccine Based on Kunitz-Type Molecule Confers Protection Against Fasciola hepatica Challenge by Inducing IFN-γ and Antibody Immune Responses Through IL-17A Production', *Frontiers in Immunology*, 11(October), pp. 1–13. doi: 10.3389/fimmu.2020.02087.

Von Sinner, W. (1993) 'Radiographic, CT and MRI spectrum of hydatid disease of the chest: A pictorial essay', *European Radiology*, 3(1), pp. 62–70.

Siracusano, A. *et al.* (2012a) 'Cystic Echinococcosis: Aspects of Immune Response, Immunopathogenesis and Immune Evasion from the Human Host', *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*, 12(1), pp. 16–23. doi: 10.2174/187153012799279117.

Siracusano, A. *et al.* (2012b) 'Host-parasite relationship in cystic echinococcosis: An evolving story', *Clinical and Developmental Immunology*, pp. 7–9. doi: 10.1155/2012/639362.

Smith, T. S. and Munn, E. A. (1990) 'Strategies for vaccination against gastro-intestinal nematodes.', *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 9(2), pp. 577–595. doi: 10.20506/rst.9.2.495.

Solcan, C. *et al.* (2010) 'Histological aspects of cystic echinococcosis in goats', 11(December).

Sweatman, G. K. and Williams, R. J. (1963) 'Survival of Echinococcus granulosus and Taenia hydatigena Eggs in Two Extreme Climatic Regions of New Zealand', *Research in Veterinary Science*, 4(2), pp. 199–218. doi: 10.1016/S0034-5288(18)34863-X.

Tahiri, S. *et al.* (2019) 'Genotyping of human Echinococcus granulosus cyst in Morocco', *Journal of Parasitic Diseases*, 43(4), pp. 560–565. doi: 10.1007/s12639-019-01127-1.

Tahiri, S. *et al.* (2020) 'Seroprevalence of cystic echinococcosis in the provinces of Ifrane and El Hajeb in Morocco', *Medecine et Maladies Infectieuses*. doi: 10.1016/j.medmal.2019.12.007.

Tajdine, M. T. *et al.* (2006) 'Problèmes thérapeutiques du kyste hydatique du dôme du foie', *À propos de 70 observations. Médecine Et Armées*, 34(3), pp. 207–214.

Thevenet, P. S. *et al.* (2005) 'Viability and infectiousness of eggs of Echinococcus granulosus aged under natural conditions of inferior arid climate', *Veterinary Parasitology*, 133(1), pp. 71–77. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.05.048.

Thomas, H. and Gönnert, R. (1978) 'The efficacy of praziquantel against cestodes in cats, dogs and sheep', *Res Vet Sci*, 24, pp. 20–25.

Thompson *et al.* (1995) 'Variation in Echinococcus: towards a taxonomic revision of the genus.', *Advances in Parasitology*, 35, pp. 145–176.

Thompson, R. . A. and McManus, D. P. (2002) 'Towards a taxonomic revision on genus Echinococcus', *Trends in Parasitology*, 18(10), pp. 452–458.

Thompson, R. C. A. (1971) 'Potential danger of hydatid disease of Horse/dog', *origin British medical journal*, 3, p. 708.

Thompson, R.C.A. (2017) 'Biology and Systematics of Echinococcus', 95(Elsevier Ltd).

Thompson, R. C.A. (2017) 'Biology and Systematics of Echinococcus', *Advances in Parasitology*, 95. doi: 10.1016/bs.apar.2016.07.001.

Thys, S. *et al.* (2019) 'Community perception and knowledge of cystic echinococcosis in the High Atlas Mountains, Morocco', *BMC Public Health*, 19(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/s12889-018-6372-y.

Torgerson, P. R. (2006) 'Mathematical models for the control of cystic echinococcosis', *Parasitology International*, 55(SUPPL.), pp. 253–258. doi: 10.1016/j.parint.2005.11.037.

Torgerson, P. R. and Heath, D. D. (2003a) 'Transmission dynamics and control options for Echinococcus granulosus', *Parasitology*, 127(SUPPL.). doi: 10.1017/S0031182003003810.

Torgerson, P. R. and Heath, D. D. (2003b) 'Transmission dynamics and control options for Echinococcus granulosus', *Parasitology*. doi: 10.1017/S0031182003003810.

Totton, S. C. *et al.* (2010) 'Stray dog population demographics in Jodhpur, India following a population control/rabies vaccination program', *Prev Vet Med*, 97, pp. 51–57.

Touil-Boukoffa, C. *et al.* (1998) 'Production of nitric oxide (NO) in human hydatidosis: Relationship between nitrite production and interferon-γ levels', *Biochimie*, 80(8–9), pp. 739–744. doi: 10.1016/S0300-9084(99)80027-3.

Touimi, M. B. (2005) 'Contribution a la spatialisation de la gestion des risques sanitaires : cas de l"hydatidose/échinococcose au Maroc », thèse de doctorat vétérinaire', *Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Juillet 2005*.

Turner, E. L., Berberian, D. A. and Dennis, E. W. (1933) 'Successful Artificial Immunization of Dogs Against Taenia Echinococcus', *Experimental Biology and Medicine*, 30(5), pp. 618–619. doi: 10.3181/00379727-30-6598.

Umhang, G. *et al.* (2017) 'A flotation/sieving method to detect Echinococcus multilocularis and Toxocara spp. eggs in soil by real-time PCR', *Parasite*, 24. doi: 10.1051/parasite/2017029.

Urios Moliner, V. *et al.* (2016) 'The analysis of the canid mitochondrial genome studied in

Morocco shows that it is neither wolf (Canis lupus) nor Eurasian jackal (Canis aureus)', *PeerJ Computer Science*, 1(1763), pp. 1–19. doi: 10.7287/peerj.preprints.1763.

Varcasia, A. *et al.* (2007) 'Molecular characterization of Echinococcus granulosus in sheep and goats of Peloponnesus, Greece', *Parasitology Research*, 101(4), pp. 1135–1139. doi: 10.1007/s00436-007-0568-x.

VILLENEUVE, A. (2003) *Les zoonoses parasitaires. L'infection chez les animaux et chez l'homme*. Les Presses de l'Université de Montréal. doi: 10.2307/j.ctv69t8mx.

Vuitton, D. *et al.* (1985) 'Specific cell mediated immunity against Echinococcus Multilocularis in patient with alveolar echinococcosis', *J. Hepatol*, pp. 1–149.

Wang, Y. *et al.* (2015) 'Proteomic analysis of the excretory/secretory products and antigenic proteins of Echinococcus granulosus adult worms from infected dogs', *BMC Veterinary Research*, 11(1), pp. 1–7. doi: 10.1186/s12917-015-0423-8.

WOOLLARD, D. J., HEATH, D. D. and LIGHTOWLERS, M. W. (2000) 'Assessment of protective immune responses against hydatid disease in sheep by immunization with synthetic peptide antigens', *Parasitology*, 121(2), p. S0031182099006186. doi: 10.1017/S0031182099006186.

Yong, T. S. *et al.* (2019) 'Prevalence of Intestinal Helminth Infections in Dogs and Two Species of Wild Animals from Samarkand Region of Uzbekistan', *Korean Journal of Parasitology*, 57(5), pp. 549–552. doi: 10.3347/kjp.2019.57.5.549.

Zanini, F. *et al.* (2006) 'Epidemiological surveillance of ovine hydatidosis in Tierra del Fuego, Patagonia Argentina, 1997-1999', *Veterinary Parasitology*, 138(3–4), pp. 377–381. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.01.051.

Zanini, F. *et al.* (2009) 'Epidemiological surveillance of cystic echinococcosis in rural population of Tierra del Fuego, Argentina, 1997–2006. Parasitol Int.', (58), pp. 69–71.

Zeyhle, E. *et al.* (1992) 'Coproantigen detection for immunodiagnosis of echinococcosis and taeniasis in dogs and humans', *Parasitology*, 104(2), pp. 347–355. doi: 10.1017/S0031182000061801.

Zhang, W. *et al.* (2001) 'Further studies on an intermediate host murine model showing that a primary Echinococcus granulosus infection is protective against subsequent oncospheral challenge', *Parasitology International*, 50(4), pp. 279–283. doi: 10.1016/S1383-5769(01)00086-1.

Zhang, W., Zhang, Z., Shi, B., Li, J., You, H., Tulson, G., Dang, X., Song, Y., Yimiti, T., Wang, J., Jones, Malcolm K., *et al.* (2006) ' Vaccination of Dogs against Echinococcus granulosus, the Cause of Cystic Hydatid Disease in Humans ', *The Journal of Infectious*

Diseases, 194(7), pp. 966–974. doi: 10.1086/506622.

Zhang, W., Zhang, Z., Shi, B., Li, J., You, H., Tulson, G., Dang, X., Song, Y., Yimiti, T., Wang, J., Jones, Malcolm K., *et al.* (2006) 'Vaccination of dogs against Echinococcus granulosus, the cause of cystic hydatid disease in humans', *Journal of Infectious Diseases*, 194(7), pp. 966–974. doi: 10.1086/506622.

Zhang, W., Li, J. and McManus, D. P. (2003) 'Concepts in Immunology and Diagnosis of Hydatid Disease', *Clinical Microbiology Reviews*, 16(1), pp. 18–36. doi: 10.1128/CMR.16.1.18-36.2003.

Zhang, W. and McManus, D. P. (2006) 'Recent advances in the immunology and diagnosis of echinococcosis', *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 47(1), pp. 24–41. doi: 10.1111/j.1574-695X.2006.00060.x.

Zhang, W. and McManus, D. P. (2008) 'Vaccination of dogs against Echinococcus granulosus: a means to control hydatid disease?', *Trends in Parasitology*, 24(9), pp. 419–424. doi: 10.1016/j.pt.2008.05.008.

Zhang, Z. Z. *et al.* (2018) 'Dog vaccination with EgM proteins against Echinococcus granulosus', *Infectious Diseases of Poverty*, 7(1), pp. 1–8. doi: 10.1186/s40249-018-0425-4.

Ziadinov, I. *et al.* (2008) 'Canine echinococcosis in Kyrgyzstan: Using prevalence data adjusted for measurement error to develop transmission dynamics models', *International Journal for Parasitology*, 38(10), pp. 1179–1190. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.01.009.

Zinsstag, J. *et al.* (2015) 'One Health: The Theory and Practice of Integrated Health Approaches', in *CABI*, p. 477.