



HAL
open science

Etude du rôle des hôtes définitifs impliqués dans la contamination environnementale par *Echinococcus multilocularis* en zone d'endémie

Abdou Malik da Silva

► **To cite this version:**

Abdou Malik da Silva. Etude du rôle des hôtes définitifs impliqués dans la contamination environnementale par *Echinococcus multilocularis* en zone d'endémie. Parasitologie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2021. Français. NNT : 2021UBFCE021 . tel-03716264

HAL Id: tel-03716264

<https://theses.hal.science/tel-03716264v1>

Submitted on 7 Jul 2022

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

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



THESE DE DOCTORAT
DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE
PREPAREE AU LABORATOIRE CHRONO-ENVIRONNEMENT-UMR6249 CNRS-UFC

Ecole doctorale n°554

Environnements-Santé

Doctorat de Sciences de la vie et de la Santé

Par

M. DA SILVA Abdou Malik

Etude du rôle des hôtes définitifs impliqués dans la contamination environnementale par
***Echinococcus multilocularis* en zone d'endémie**

Thèse présentée et soutenue à Besançon, le 16 décembre 2021.

Composition du Jury :

M. Raoul Francis, Professeur des universités, Université Bourgogne Franche-Comté	Examineur
M. Gottstein Bruno, Professeur, Université de Berne	Rapporteur
M. Berry Antoine, PU-PH, Université de Toulouse III	Rapporteur
Mme Hayette Marie-Pierre, Professeure, Université de Liège	Examineur
M. Umhang Gérald, Chargé de recherche, ANSES/LRFS/LNR <i>Echinococcus</i> spp.	Examineur
M. Bart Jean-Mathieu, Chargé de recherche, IRD/UMR INTERTRYP	Examineur
Mme Millon Laurence, PU-PH, Université Bourgogne Franche-Comté	Directrice de thèse
Mme Knapp Jenny, Chargée de recherche, Université Bourgogne Franche-Comté	Codirectrice de thèse

Titre : Etude du rôle des hôtes définitifs impliqués dans la contamination environnementale par *Echinococcus multilocularis* en zone d'endémie

Mots clés : *Echinococcus multilocularis*, fèces de carnivores, identification individuelle, copro-génotypages, contamination environnementale, persistance

L'échinococcose alvéolaire demeure une zoonose en expansion malgré l'amélioration des mesures sanitaires, le changement des habitudes alimentaires et la diminution des populations des catégories socio-économiques les plus à risque. La contamination de l'environnement par *Echinococcus multilocularis*, le parasite responsable de cette zoonose, et le risque d'infection pour l'homme dépendent de la distribution des fèces des carnivores hôtes définitifs du parasite. Cette étude visait à caractériser la contribution des renards, chiens et chats dans la contamination environnementale par *E. multilocularis* en zone d'endémie. La présence des œufs d'*E. multilocularis* a été confirmée plus significativement dans les fèces de renards. De plus, nos travaux ont démontré une hétérogénéité spatiale locale du risque d'exposition aux œufs d'*E. multilocularis* via les fèces de renards, ce qui représente un paramètre clé dans la transmission locale du parasite. Par ailleurs, l'étude de la contamination des sols de potagers par *E. multilocularis* laisse penser que les œufs du parasite pouvaient persister pendant au moins une année après la disparition des fèces porteuses du parasite.

La contribution individuelle des renards dans la contamination de l'environnement par *E. multilocularis* a été explorée par l'identification de leurs fèces par génotypage à l'aide de marqueurs microsatellites. Parmi les renards infestés, nous avons mis en évidence quelques individus (35%) ayant déposé la majorité des fèces testées positives pour *E. multilocularis* (60%). Enfin, l'identification des profils génétiques EmsB des œufs d'*E. multilocularis* isolés des fèces des hôtes suggère une transmission du parasite des renards, alors considérés comme un réservoir local du parasite, vers les chiens et chats via la prédation d'une même population locale de rongeurs. L'ensemble du travail démontre le rôle majeur du cycle sylvatique entretenu par les renards dans le maintien du cycle synanthropique du parasite. Il semble alors que les mesures de contrôle d'abondance d'*E. multilocularis* sur le terrain doivent nécessairement couvrir le territoire des renards super-propagateurs du parasite pour espérer interrompre le cycle local du parasite.

Title : Study of the role of definitive hosts involved in environmental contamination by *Echinococcus multilocularis* in endemic area

Keywords : *Echinococcus multilocularis*, carnivore faeces, individual identification, copro-genotyping, environmental contamination, persistence

Alveolar echinococcosis remains an expanding zoonosis despite improved sanitary measures, changing dietary habits and decreasing populations in the most at-risk socio-economic categories. Environmental contamination with *Echinococcus multilocularis*, the parasite responsible for this zoonosis, and the risk of infection for humans depend on the distribution of carnivore faeces, as definitive hosts of the parasite. This study aimed to characterise the contribution of foxes, dogs and cats to environmental contamination with *E. multilocularis* in endemic area. The presence of *E. multilocularis* eggs was confirmed most significantly in fox faeces. Furthermore, our studies demonstrated local spatial heterogeneity in the exposure risk to *E. multilocularis* eggs via fox faeces, which represents a key parameter in the local transmission of the parasite. In addition, investigation of soil contamination with *E. multilocularis* in vegetable gardens suggests that *E. multilocularis* eggs could persist for at least one year after the disappearance of faeces carrying the parasite.

Individual contribution of foxes to environmental contamination with *E. multilocularis* was explored by genotyping their faeces with microsatellite markers. Among infested foxes, we identified a few individuals (35%) that deposited the majority of faeces tested positive for *E. multilocularis* (60%). Finally, the identification of EmsB genetic profiles of *E. multilocularis* eggs isolated from definitive host faeces suggests transmission of the parasite from foxes, then considered as a local reservoir, to dogs and cats via predation of the local rodent population. The whole study demonstrates the major role of the sylvatic cycle perpetuated by foxes in maintaining the synanthropic cycle of the parasite. It seems then measures to control *E. multilocularis* abundance in the field must necessarily cover the territory of fox individuals that are super-spreaders for the parasite in order to succeed in interrupting the local cycle of the parasite.

À Adjo et Falilou.

Toujours près du cœur.

À ma sœur unique et à mes frères.

Loin des yeux certes, mais jamais on ne se perd de vue.

À feu Olympio Victor.

Je suis certain que vous auriez trouvé tout ceci utile et fort intéressant.

Remerciements

*Mes premiers remerciements vont à trois personnes avec qui tout a commencé et qui sont restées tout près au cours de ces trois dernières années. Tout d'abord, **Marie** (Dr **Marie-Lazarine Poulle** !) qui, après un entretien téléphonique un jour de novembre 2017, m'a offert l'opportunité de travailler sur trois parasites transmis par l'alimentation. Ce travail a abouti à la mise au point de la technique de flottaison qui a largement servi au cours de ce travail de thèse. Merci Marie pour tes conseils, ta disponibilité de toujours. Mes reconnaissances vont également aux Drs **Gérald Umhang** et **Franck Boué** qui m'ont initié aux techniques de flottaison et d'isolement des œufs de parasites.*

*Mes sincères remerciements au Pr **Bruno Gottstein** et au Pr **Antoine Berry** qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, au Pr **Francis Raoul**, au Pr **Marie-Pierre Hayette** et aux Drs **Jean-Mathieu Bart** et **Gérald Umhang** d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Je tiens à adresser mes sincères remerciements au Pr **Laurence Millon** qui a dirigé ce travail et qui n'a cessé de donner des orientations précieuses pour que ce travail soit mené avec succès. Merci pour votre accueil et d'avoir su me faire une place dans votre équipe. Merci également au Dr **Jenny Knapp** pour avoir co-encadré cette thèse. Merci à toute l'équipe du **CNR Echinococcoses**, particulièrement à **Sandra Courquet**.*

*Ma profonde gratitude également aux membres de mon comité de thèse qui m'ont bien fourni des conseils très enrichissants : Pr **Patrick Giraudoux** (ah ! les commentaires bien dosés dans les corrections d'articles, ça c'est quelque chose mais c'est de bonne guerre) grâce à qui je pense avoir compris les statistiques de **Kulldorff**, Pr **Francis Raoul** pour les nombreuses aides sur les différents articles et aux Drs **Jean-Mathieu Bart** et **Marie-Lazarine Poulle**.*

*Un grand merci à **Matthieu Bastien** pour les nombreux conseils de statistiques et sur un des articles de ce travail ; Mes remerciements également aux équipes de Nancy, **LNR Echinococcus spp.** et **ELIZ** pour les aides concernant les sessions de terrain.*

*Merci aux membres du laboratoire chrono-environnement avec qui j'ai pu parler lors des sessions de collecte de crottes ou au laboratoire qui m'ont apporté leur aide d'une façon ou d'une autre. Je pense particulièrement à **Dominique Rieffel** pour la bonne ambiance et les discussions bien nourries sur le terrain. Je pense aussi à **Julie C.** pour la bonne ambiance dans le bureau pendant les quelques mois de partage et les nombreux doigts d'h.....(Mdr, j'oserai pas mettre d'émoticônes comme tu les aimes). Merci à **Steffi** pour l'ambiance électrique au*

*laboratoire (un clin d'œil au petit bout de chou qui va bientôt venir au monde, félicitations !!) ; A **Daniel** (Dr Martak, svp) également pour la bonne ambiance ; A **Alban** ça va payer les cryptos...ahah ; A **Alex TetR** (c'est encore de la faute de Julie C. ça) pour les nombreux mots partagés sur la thèse, les thèses, toi tu as pleuré dans une Ferrari et moi dans une Twingo ! On ne se saura jamais laquelle des situations est la plus confortable. Un merci aussi au **Dr Alice Baraquin**, il faut croire que tu m'as cédé un bureau qui porte chance. Enfin, on verra jusqu'à la fin.*

*Un gros merci à **Benoît**. Maitre Valot que j'aime l'appeler car j'ai bien appris des choses en sa compagnie, des stats sur R jusqu'aux cours de natation. Merci Benoît pour la relecture de ce document (j'en ai bien profité), de faire le lien entre les gens et aussi pour ta gentillesse, ton professionnalisme (bon ça, ce n'est un secret pour personne). Il va falloir que je trouve un cadeau qui tient la route pour tout ça.*

*Je n'oublie pas les potes qui m'ont encouragé de près, **Alphonse Oué** (depuis la région parisienne), ou de loin **Yasmine** (depuis Alger), **Mess 'Merlot'** (depuis Bamako), **Séna[m]** (depuis Brest). Les gars, il faut bien se calmer sur le titre de Dr.*

*Enfin, un gros, gros et spécial merci à **Stella**, je ne me souviens plus de ce que tu exigeais que j'écrive. Mais tu sais, pour moi les mots ont moins de valeurs que les actes. Alors Akpé !!*

Table des matières

Publications et communications sur le sujet -----	4
Liste des figures -----	6
Liste des tableaux -----	8
Introduction générale -----	10
1. Interactions humains-animaux : émergence et croissance des maladies zoonotiques ----	11
2. Ecologie de la transmission des parasites à cycles complexes -----	14
2.1. Distribution et comportement des hôtes et du parasite -----	15
2.1.1. Hétérogénéité de l'environnement-----	16
2.1.2. Schémas comportementaux-----	17
2.1.3. Dynamique de population des hôtes-----	17
2.2. Distribution et persistance des stades libres parasitaires dans l'environnement-----	18
3. <i>Echinococcus multilocularis</i> -----	19
3.1. Description du parasite -----	19
3.2. Cycle de transmission et répartition géographique -----	20
3.3. Potentiel zoonotique-----	23
3.4. Distribution et contamination des hôtes définitifs -----	26
3.4.1. Distribution des prévalences -----	28
3.4.2. Distribution des dépôts fécaux -----	29
3.4.3. Identification et suivi d' <i>E. multilocularis</i> au sein de ses hôtes définitifs -----	31
3.4.3.1. Détection d' <i>E. multilocularis</i> dans les fèces des hôtes définitifs -----	32
3.4.3.2. Identification individuelle des hôtes définitifs par génotypage non-invasif ----	33
3.4.3.3. Diversité génétique d' <i>E. multilocularis</i> à partir des œufs du parasite-----	36
3.5. Contamination environnementale par les œufs d' <i>E. multilocularis</i> -----	37
4. Objectifs -----	39
4.1. Objectifs généraux-----	39
4.1.1. Projet MONIZOO-----	39

4.1.2. Projet SICAR -----	42
4.1.3. Projet RISKJARDINS -----	42
4.2. Objectifs de la thèse -----	43
Première partie : Distribution des dépôts fécaux de carnivores porteurs d'<i>Echinococcus multilocularis</i> dans un environnement rural en zone de forte endémie d'EA -----	46
1. Introduction -----	47
1.1. Contexte -----	47
1.2. Objectifs -----	48
2. Méthodologie -----	48
3. Résultats principaux -----	49
4. Assessment of the exposure to <i>Echinococcus multilocularis</i> associated with carnivore faeces using qPCR and flotation technique assays -----	50
5. Fox coprogenetics: infection and contribution of individuals to <i>Echinococcus multilocularis</i> environmental contamination -----	78
6. Résultats complémentaires : Distribution spatiale des fèces de renards identifiées individuellement -----	109
7. Conclusion -----	113
Deuxième partie : Circulation d'<i>Echinococcus multilocularis</i> entre les hôtes sauvages et domestiques par l'étude de la diversité génétique du parasite à une échelle locale -----	115
1. Introduction -----	116
1.1. Contexte -----	116
1.2. Objectifs -----	117
2. Méthodologie -----	117
3. Résultats principaux -----	118
4. Assessment of the genetic diversity of <i>Echinococcus multilocularis</i> from copro-isolated eggs -----	119
5. Conclusion -----	141

Troisième partie : Distribution d'<i>Echinococcus multilocularis</i> dans le sol de jardins potagers en lien avec l'intensité et la fréquence de dépôts fécaux des carnivores hôtes définitifs	142
1. Introduction	143
1.1. Contexte	143
1.2. Objectifs	144
2. Méthodologie	145
3. Résultats principaux	145
4. Soil contamination by <i>Echinococcus multilocularis</i> in rural and urban vegetable gardens in relation to fox, cat and dog faecal deposits	147
5. Conclusion	172
Discussion générale	173
1. Surdispersion des fèces porteuses des œufs d' <i>E. multilocularis</i>	179
2. Contribution individuelle hétérogène des hôtes définitifs dans la contamination environnementale par <i>E. multilocularis</i>	181
3. Maintien du risque de transmission d' <i>E. multilocularis</i> dans l'environnement humain	185
4. Persistance de la contamination environnementale par les œufs d' <i>E. multilocularis</i>	187
5. Applications à la prévention et au contrôle de la contamination environnementale par <i>E. multilocularis</i>	188
Conclusion & Perspectives	193
Références bibliographiques	193
Annexes	193

Publications et communications sur le sujet

Publications

Da Silva, A.M., Courquet, S., Raoul, F., Rieffel, D., Giraudoux, P., Millon, L., Knapp, J. 2020. **Assessment of the exposure to *Echinococcus multilocularis* associated with carnivore faeces using real-time quantitative PCR and flotation technique assays.** *International Journal for Parasitology* 50, 1195–1204. (DOI: [org/10.1016/j.ijpara.2020.07.008](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.07.008)).

Da Silva, A.M., Afonso E., Raoul, F., Giraudoux, P., Merguey, M., Umhang, G., Courquet, S., Rieffel, D., Millon, L., Knapp, J. **Fox coprogenetics: infection and contribution of individuals to *Echinococcus multilocularis* environmental overdispersion in an endemic area of alveolar echinococcosis.** En préparation.

Jenny Knapp, **Abdou Malik Da Silva**, Sandra Courquet and Laurence Million. 2021. **Assessment of the genetic diversity of *Echinococcus multilocularis* from copro-isolated eggs.** *Pathogens* 10 (10): 1296. (DOI: [10.3390/pathogens10101296](https://doi.org/10.3390/pathogens10101296))

Da Silva, A. M., **M. Bastien**, G. Umhang, F. Boué, V. Bastid, J.-M. Boucher, C. Caillot, C. P. de Garam, C. Renault, M. Faisse, S. Courquet, V. Scalabrino, L. Millon, J. Knapp, and M.-L. Poulle. 2021. **Soil contamination by *Echinococcus multilocularis* in rural and urban vegetable gardens in relation to fox, cat and dog faecal deposits.** *Parasite* 28, 74. (DOI: [10.1051/parasite/2021073](https://doi.org/10.1051/parasite/2021073))

Communications

Présentation de poster + communication flash de 3 min

- **Da Silva A. M.**, Courquet S., Millon L., Giraudoux P., Raoul F., Knapp J. Génotypage par le microsatellite EmsB sur œufs isolés d'*Echinococcus multilocularis* : diversité génétique chez un hôte définitif et au niveau local. Congrès de la Société Française de Parasitologie : « One Health, de l'Animal à l'Homme en Parasitologie – Mycologie » Tours, 22 – 24 Mai 2019.

Communication affichée

- **A. M. DA SILVA**, S. COURQUET, V. SCALABRINO, L. MILLON, and J. KNAPP. Assessment of the human risk exposure to *Echinococcus multilocularis* via soil and carnivore faecal analyses in urban vegetable gardens used for growing fresh produces. EMOP 2021, Changing climate, changing parasites, Belgrade, Serbia, 12-16 October 2021.
- **Da Silva A. M.**, Courquet S., Millon L., Rieffel D., Giraudoux P., Raoul F., Knapp J. EmsB microsatellite genotyping on isolated eggs of *Echinococcus multilocularis*: genetic diversity in a definitive host and at the local level. 28TH World Echinococcosis Congress, Lima, Peru, October 31, 2019.

Présentation orale

- **A.M. DA SILVA**, M. Bastien, G. Umhang, F. Boué, V. Bastid, J.-M. Boucher, C. Caillot, C. Peytavin de Garam, C. Renault, M. Faisse, S. Courquet, V. Scalabrino, L. Millon, J. Knapp, M.-L. Poulle. Contamination du sol par *Echinococcus multilocularis* dans des jardins potagers fréquentés par des renards, chiens et chats. Congrès de la Société Française de Parasitologie, Lyon, France, 28-29 Octobre 2021.
- **Da Silva A. M.**, Courquet S., Millon L., Giraudoux P., Raoul F., Knapp J. Risque d'exposition à *Echinococcus multilocularis* lié aux matières fécales de carnivores collectées dans l'environnement. Société de Biologie de Besançon, 12 décembre 2019.
- **Da Silva A. M.**, Courquet S., Millon L., Rieffel D., Giraudoux P., Raoul F., Knapp J. EmsB microsatellite genotyping on isolated eggs of *Echinococcus multilocularis*: genetic diversity in a definitive host and at the local level. Forum des Jeunes Chercheurs, Dijon, 13 – 14 juin 2019

Liste des figures

Figure 1 : Flux de transmission des pathogènes zoonotiques entre les populations humaines, les animaux domestiques et la faune sauvage dans différents milieux. -----	13
Figure 2 : Schéma des processus de rencontre et de compatibilité intervenant dans les interactions hôtes-parasite. -----	15
Figure 3 : Les trois stades parasitaires d' <i>Echinococcus multilocularis</i> .-----	20
Figure 4 : Cycle d' <i>Echinococcus multilocularis</i> indiquant les hôtes définitifs et intermédiaires principaux en Europe et les principales variables impliquées dans la transmission du parasite. -----	22
Figure 5 : Distribution mondiale du parasite <i>Echinococcus multilocularis</i> au sein de ses principaux hôtes définitifs suivant les localisations géographiques. -----	23
Figure 6 : Distribution des cas humains d'EA dans le monde avec un aperçu sur l'expansion de la maladie en Europe. -----	25
Figure 7 : Schématisation du chevauchement des aires de répartition des hôtes d' <i>Echinococcus multilocularis</i> et de la transmission spatiale du parasite. -----	26
Figure 8 : Adaptation du concept de filtre de rencontre pour l'identification des facteurs écologiques impliqués dans la transmission d' <i>Echinococcus multilocularis</i> en Europe. -----	28
Figure 9 : Hétérogénéité spatiale des prévalences d' <i>Echinococcus multilocularis</i> chez le renard roux en France.-----	29
Figure 10 : Principe de géotypage à partir des marqueurs microsatellites. -----	34
Figure 11 : Incidence moyenne annuelle de l'EA par département en France. -----	40
Figure 12 : Les parcours de collecte des fèces de carnivore et leurs distances respectives sur les trois communes incluses dans le projet « Monitoring des Zoonoses ».-----	41
Figure 13 : Objectifs de cette étude.-----	45
Figure 14 : The predetermined circuit (red dash) of carnivore faeces collection on the study site (a rural town in the eastern part of France (006°26'46"E, 46°56'53"N)). -----	55
Figure 15 : Workflow of <i>E. multilocularis</i> DNA and egg detection in carnivore faeces. -----	58
Figure 16 : Relationship between Cq values obtained from specific <i>E. multilocularis</i> -qPCR (<i>E. multilocularis</i> -qPCR) performed on carnivore faeces containing <i>E. multilocularis</i> eggs (<i>E. multilocularis</i> egg (+)) or not (<i>E. multilocularis</i> egg (-)). -----	64
Figure 17 : Kulldorff statistics on the distribution of carnivore faeces in the studied site in France, from <i>E. multilocularis</i> DNA-positive faeces (Aa, Ba, Ca) and <i>E. multilocularis</i> egg-positive faeces (Ab, Bb, Cb). -----	66

Figure 18 : Screenshot of the visualization of the KML file containing the area covered (red outline). -----	83
Figure 19 : Map showing the localisation of the study area (a rural town in the eastern part of France (0062604600E, 465605300N)) in France (A) and locations of fox faeces tested for <i>Echinococcus multilocularis</i> DNA presence (B).-----	84
Figure 20 : Venn diagram of fox genotypes identified by sampling year. In brackets, number of successfully genotyped fox faeces. -----	96
Figure 21 : Rank abundance curve for the fox genotypes identified in this study. -----	97
Figure 22 : Maps showing clusters of <i>E. multilocularis</i> -positive fox faeces based on Kulldorff statistics on the spatial distribution of fox faeces collected between March 2017 and January and convex polygons covering faecal deposits of fox genotypes identified in an endemic area of alveolar echinococcosis in France.-----	112
Figure 23 : Results of <i>Echinococcus multilocularis</i> (Em) identification and EmsB typing on egg batches isolated from carnivores faeces with <i>E. multilocularis</i> DNA detected.-----	127
Figure 24 : Dendrograms constructed from EmsB amplification data, after a hierarchical clustering analysis based on Euclidean distances and unweighted pair group method. -----	130
Figure 25 : Localisation of the three study areas in France (A), highlighting the rural (B) and urban (C) settings. -----	152
Figure 26 : Process chart showing the collection and analysis of faeces and soil samples in rural and urban vegetable gardens located in <i>E. multilocularis</i> endemic regions of the north-eastern France.-----	154
Figure 27 : Index of soil contamination by <i>Echinococcus multilocularis</i> in relation to the size of rural vegetable gardens sampled from north-eastern France. -----	160
Figure 28 : Average turnover of fox and cat faecal deposits in rural vegetable gardens (N=50) sampled from north-eastern France, with soil tested negative and positive for <i>E. multilocularis</i> eggs DNA.. -----	161
Figure 29 : Schéma sommaire des résultats obtenus au cours de cette étude.-----	177
Figure 30 : Représentation schématique des différents moyens de prévention et de contrôle de l'EA en fonction des résultats obtenus de cette étude. -----	191

Liste des tableaux

Table 1 : Comparison between faeces identification based on morphological criteria (shape, size, and composition) and faeces identification on molecular analysis (by specific species qPCRs). -----	61
Table 2 : Method sensitivities (in %) of the sucrose flotation technique combined with microscopic observation and detection by specific <i>E. multilocularis</i> -qPCR for <i>Echinococcus multilocularis</i> in freezing copro-samples (5 g). -----	62
Table 3 : Detection of <i>E. multilocularis</i> DNA and eggs in carnivore host faecal samples collected between March 2017 and November 2018 in a rural town in the eastern part of France. -----	63
Table 4 : Number of fox faecal samples collected and successfully genotyped by sampling date. -----	85
Table 5 : Genetic diversity of the 14 microsatellite and sex markers selected and used for individual genotyping and molecular sexing of fox faecal samples in the present study.-----	89
Table 6 : Number of individual foxes (unique genotypes), genetic variation and population sizes estimated by using CAPWIRE R package during the whole study period and annually in a rural town in the eastern part of France, between March 2017 and January 2020. -----	94
Table 7 : Distances (in meter) between faecal locations among fox genotypes with multiple occurrences in the study site in France. -----	111
Table 8 : Collection of 19 carnivore faeces, details on sampling and flotation, molecular identification of the host and the parasite. -----	124
Table 9 : Egg-batches genotyping after dendrogram construction and Pearson correlation coefficient (r) sorting. -----	131
Table 10 : Number of fox, dog and cat faeces found in rural and urban vegetable gardens of north-eastern France and number of faeces and soil samples tested positive for <i>E. multilocularis</i> by real-time PCR.-----	158
Table 11 : Values of descriptors of fox and cat faeces deposition and proportion of vegetable gardens with at least one soil sample tested positive for <i>Echinococcus multilocularis</i> DNA in the three classes of intensity of faecal deposits.-----	159
Tableau 12 : Répartition des fèces collectées en fonction des principales espèces émettrices et des parasites <i>Echinococcus multilocularis</i> et <i>Toxocara</i> spp. identifiés par qPCRs sur les trois sites d'étude du projet « Monitoring des Zoonoses ».-----	181

Tableau 13 : Exemple de quelques études de terrain sur le contrôle d'*Echinococcus multilocularis* par la distribution d'appâts contenant du praziquantel pour les renards. ----- 192

Introduction générale

1. Interactions humains-animaux : émergence et croissance des maladies zoonotiques

Les changements environnementaux liés à l'évolution des comportements humains tels que les migrations, le développement de l'agriculture, l'urbanisation ou encore l'industrialisation modifient profondément la structure et le fonctionnement des écosystèmes (Thomas *et al.*, 2012; Reperant *et al.*, 2013). L'accélération de ces changements et l'augmentation des populations humaines contribuent à diminuer les zones sauvages et intensifient les interactions entre les populations humaines et animales (Lloyd-Smith *et al.*, 2009). Ces interactions croissantes ont ainsi donné lieu à un continuum de contacts entre les hommes et les animaux, qui favorise le transfert et l'émergence de nombreux agents pathogènes infectieux (Lloyd-Smith *et al.*, 2009; Reperant *et al.*, 2013). En effet, cette interface homme-animal a servi de médiateur pour la circulation interspécifique de pathogènes dits zoonotiques, c'est-à-dire d'agents infectieux pouvant se transmettre naturellement des animaux vertébrés aux humains, et inversement (Kerr, 2004; Keesing and Ostfeld, 2021). Plus de la moitié des 1407 agents pathogènes humains identifiés sont zoonotiques (Woolhouse and Gowtage-Sequeria, 2005). La part des espèces pathogènes impliquées varie considérablement en fonction des taxons, jusqu'à 95% des helminthes pathogènes à l'homme sont zoonotiques contre 76% pour les virus, 65% pour les protozoaires, 50% pour les bactéries et seulement 38% pour les champignons (Taylor *et al.*, 2001; Woolhouse, 2002). Toutefois, ce sont les virus qui sont les plus susceptibles de causer des maladies émergentes, avec comme caractéristique principale, une augmentation significative de leur incidence (Woolhouse, 2002), à l'instar du coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV-2) très probablement d'origine animale mais non encore avérée (Haider *et al.*, 2020). Globalement, trois quart des maladies émergentes et réémergentes sont d'origine animale (Woolhouse and Gowtage-Sequeria, 2005; Coker *et al.*, 2011), ce qui induit que les zoonoses représentent la plupart des maladies émergentes apparues chez l'homme au cours de ces soixante-dix dernières années (Karesh *et al.*, 2012; Fesce *et al.*, 2020).

Les zoonoses sont généralement catégorisées par les modes de transmission (par exemple, par ingestion alimentaire, par des vecteurs), le type de pathogène (micro-parasites ou macro-parasites) et la transmissibilité inter-humaine (Lloyd-Smith *et al.*, 2009). Les micro-parasites (bactéries, virus, protozoaires, microchampignons) sont très souvent des intracellulaires obligatoires et se reproduisent rapidement avec un temps de génération très court entraînant la mort ou le développement d'une immunité chez l'hôte (Hudson, 2002). Ils causent généralement des maladies épidémiques (par exemple les leishmanioses). A l'inverse, les macro-parasites incluant les helminthes, les arthropodes et autres métazoaires se développent

dans le corps ou dans les cavités de l'hôte avec un temps de génération long entraînant une infection chronique avec une immunité plutôt transitoire (Anderson and May, 1992; Hudson, 2002). Ils sont donc souvent responsables de maladies endémiques caractérisées par leur présence constante dans une région ou une population donnée (Grace *et al.*, 2012). Les zoonoses endémiques représentent le plus lourd impact sur la santé humaine avec un milliard de malades et des millions de décès chaque année dans le monde (Karesh *et al.*, 2012). La distinction entre zoonoses endémiques et émergentes est de nature temporelle et/ou géographique. Une maladie endémique devient émergente et donc, plus préoccupante, quand le pathogène se répand à partir de son réservoir naturel et conquiert d'autres populations animales et humaines d'une nouvelle zone géographique (Daszak *et al.*, 2001). En effet, les pathogènes responsables de zoonoses endémiques sont très souvent enzootiques donc circulant activement dans les populations animales (Karesh *et al.*, 2012).

Les espèces animales les plus impliquées sont les plus proches de l'homme, dans l'ordre d'importance les ongulés, les carnivores et les rongeurs (Woolhouse and Gowtage-Sequeria, 2005). On considère que ce sont les populations sauvages qui constituent le maillon essentiel de l'émergence des pathogènes zoonotiques en étant des réservoirs, souvent sans symptômes apparents, à partir desquels peuvent se diffuser les zoonoses. C'est notamment le cas de nombreuses maladies vectorielles comme la maladie de Lyme (Daszak *et al.*, 2001). La transmission vers la faune sauvage est cependant plausible via la propagation de pathogènes des animaux domestiques et par l'introduction par l'homme de pathogènes dans des endroits jusqu'alors considérés comme vierges, un phénomène désigné « pollution par les agents pathogènes » (Daszak *et al.*, 2001). Dans les deux cas, les causes sont fortement associées aux activités et aux changements de l'environnement effectués par l'homme. Les conséquences de ces changements affectent les populations humaines à leur tour, surtout en zones rurales où elles peuvent être exposées aux pathogènes par les habitudes de production et de consommation alimentaires ainsi que par la proximité avec la faune sauvage et ses interactions avec les animaux domestiques. Bien que l'urbanisation réduise la prévalence de nombreux pathogènes dans les populations animales, la transmission pourrait dans certains cas, augmenter parmi la faune sauvage établie en milieu urbain ou péri-urbain (Bradley and Altizer, 2006; Mackenstedt *et al.*, 2015), et représenter un problème de santé publique majeur puisque plus de 50% des humains seront concentrés dans des zones urbaines dans moins de 30 ans (Shochat *et al.*, 2006). Les dynamiques des populations humaines et leur utilisation de l'environnement influent ainsi sur la structure et la composition des populations animales, agissant également sur les cycles

de vie et de transmission des pathogènes zoonotiques (**Figure 1**) (Thompson, 2013; Gottdenker *et al.*, 2014). Ceci concerne particulièrement quelques protozoaires comme *Toxoplasma gondii* (Gilot-Fromont *et al.*, 2012), mais surtout la plupart des macro-parasites ayant des cycles de vie complexes qui impliquent des relations trophiques entre plusieurs espèces animales (Eckert *et al.*, 2001c; Liccioli, 2015).

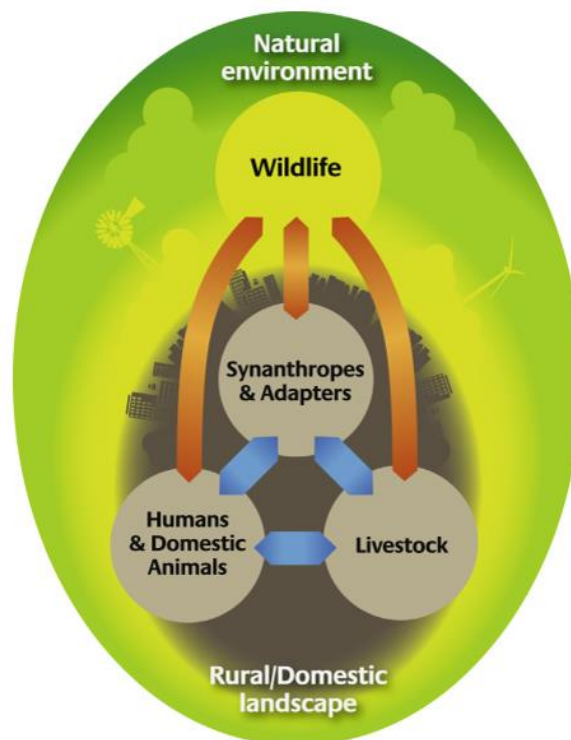


Figure 1 : Flux de transmission des pathogènes zoonotiques entre les populations humaines, les animaux domestiques et la faune sauvage dans différents milieux (Thompson, 2013).

2. Ecologie de la transmission des parasites à cycles complexes

Contrairement aux parasites à cycle monoxène (implication d'un hôte unique), les macro-parasites à cycle de vie complexe ou hétéroxène se développent dans plusieurs hôtes successivement, chacun correspondant souvent à un stade parasitaire et généralement en passant par un stade libre infectieux répandu dans l'environnement (Combes, 2001; Chubb *et al.*, 2010). Les vers parasites (ou helminthes) hétéroxènes représentent le groupe de macro-parasites le plus répandu et sont particulièrement susceptibles de causer des zoonoses (Taylor *et al.*, 2001; Weil *et al.*, 2006; Froeschke and Matthee, 2014). De surcroît, ces organismes ont des voies de transmission impliquant une large contamination de l'environnement et donc qui leur offrent de nombreuses possibilités d'infection des hôtes (Woolhouse *et al.*, 2001). Cette faculté à se répandre et à persister dans l'environnement combinée à l'existence et à la possibilité d'infecter un large éventail d'hôtes augmentent probablement les risques d'émergence de zoonoses (Daszak *et al.*, 2001; Bengis *et al.*, 2002).

Les helminthes sont souvent transmis par voie trophique (Benesh *et al.*, 2021), on distingue donc les hôtes intermédiaires (HI) à l'intérieur desquels se développe la forme asexuée du parasite, eux-mêmes consommés, dans un système prédateur-proie, par les hôtes définitifs (HD) qui abritent les formes adultes et sont garant de la reproduction parasitaire. D'autres helminthes comme *Trichinella spiralis* ou *Toxocara* spp. peuvent en plus de cette transmission horizontale se transmettre verticalement d'un hôte femelle aux descendants par voie transplacentaire ou lors de l'allaitement (Shoop, 1991; Overgaauw and Van Knapen, 2008). Dans tous les cas, la réalisation et la maintenance du cycle chez les hôtes exigent la rencontre et la compatibilité entre ces derniers et l'agent pathogène. Les deux processus ont été imaginés par Euzet et Combes (1980) – repris par Holmes (1987) et Combes (2001) – sous la forme de filtres que le parasite doit traverser pour sa transmission chez les hôtes (**Figure 2**). La rencontre détermine la probabilité de contact physique entre le parasite et ses hôtes. Il faudrait alors qu'ils cohabitent dans le même écosystème et puissent se rencontrer (filtre écologique). Le contact dépend aussi de la distribution et de la dynamique de population des hôtes et du parasite et de leurs comportements favorisant la contamination (filtre éthologique). La compatibilité détermine la probabilité d'adaptation du parasite aux conditions physico-chimique internes des hôtes (filtre métabolique) incluant la capacité à résister aux systèmes immunitaires (filtre immunologique). In fine, ces différents filtres vont déterminer le pool d'hôtes susceptibles d'être infectés (spectre d'hôtes). Les interactions hôtes-parasite s'inscrivent donc dans un système spatio-temporel co-évolutif dans lequel le parasite développe des caractères pour infecter et s'adapter aux hôtes

alors que ces derniers mettent en place des stratégies d'échappement (Gandon and Michalakis, 2002). Dans ce mémoire, nous nous attardons plus particulièrement sur les variables qui déterminent les filtres de rencontre.

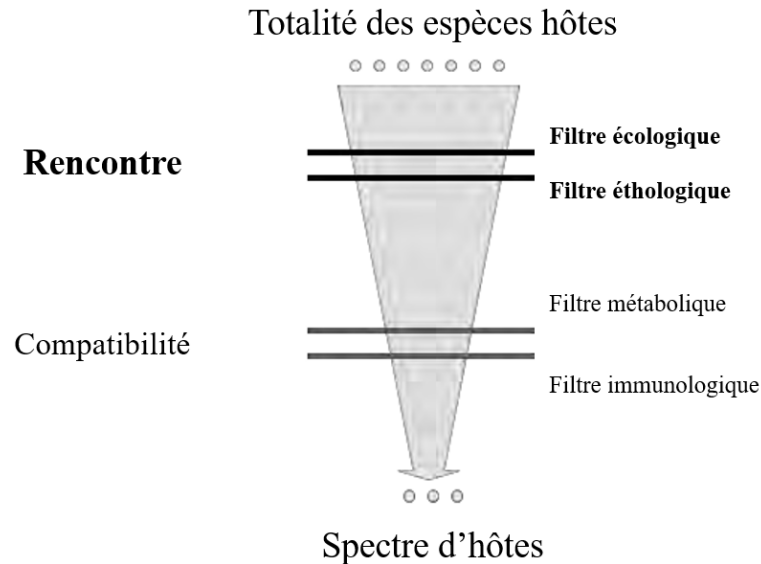


Figure 2 : Schéma des processus de rencontre et de compatibilité intervenant dans les interactions hôtes-parasite (adapté de Euzet et Combes, 1980 et de Combes, 2001). Le spectre d'hôtes d'un parasite inclut les espèces qui partagent son habitat et susceptibles de le rencontrer (**filtres écologique et éthologique**) et pouvant procurer les conditions physico-chimiques et immunologiques adéquates (filtres métabolique et immunologique) pour pérenniser la transmission. En gras, les variables qui relèvent de notre champ d'étude.

2.1. Distribution et comportement des hôtes et du parasite

La première condition de contact entre un parasite et ses potentiels hôtes (intermédiaires et définitifs) implique que leurs distributions spatiales se chevauchent partiellement ou totalement et donc qu'ils partagent la même niche écologique. La caractérisation, la modélisation et la cartographie des aires de distribution des parasites et de leurs hôtes sont par exemple utilisées pour identifier les vecteurs et les réservoirs et donc prédire les zones d'endémie (Peterson, 2006; Peterson *et al.*, 2006). Ensuite, la transmission ou la circulation parasitaire sont supposées sensiblement dépendantes de la densité de population des hôtes, en particulier en cas de variations importantes des populations (Altizer *et al.*, 2003; Borremans *et al.*, 2017). Ce phénomène a été démontré chez les populations de campagnol des champs, *Microtus arvalis*, HI du cestode *Taenia taeniaeformis*, dont les densités étaient associées significativement aux variations saisonnières de prévalences du parasite (Fichet-Calvet *et al.*, 2003). Cependant, les macro-parasites se propageant dans l'environnement pourraient être moins sensibles aux

changements de densité des hôtes (Anderson and May, 1992; Altizer *et al.*, 2003). Les taux de contact entre les différents hôtes et les parasites peuvent également être déterminants dans la transmission de ces agents pathogènes (McCallum *et al.*, 2001; Tompkins *et al.*, 2011; Borremans *et al.*, 2017). L'étude des systèmes complexes de transmission des pathogènes implique ainsi la prise en compte d'autres paramètres supplémentaires comme l'hétérogénéité de l'environnement et les schémas comportementaux, qui amènent à des distributions non homogènes d'individus et donc des contacts hôtes-parasite non uniformes (Jong *et al.*, 2002). En outre, à l'intérieur d'une même population d'hôtes, les individus n'ont pas la même susceptibilité aux parasites et donc la composition et la dynamique de la population sont des variables à prendre en considération dans la distribution de l'infection parasitaire dans la population des hôtes (Hudson, 2002; Altizer *et al.*, 2006).

2.1.1. Hétérogénéité de l'environnement

Les facteurs environnementaux abiotiques et biotiques peuvent affecter fortement la distribution et la densité des hôtes, des parasites et surtout les relations liant les prédateurs et leurs proies, et influencent donc la dynamique des interactions hôtes-parasite (Neuhauser, 2001; Cai *et al.*, 2018). La composition du paysage, des habitats et la disponibilité des ressources sont très variables en fonction des environnements amenant à l'existence de zones ou de foyers avec des intensités de circulation parasitaire très hétérogènes (Giraudoux *et al.*, 2003). Par exemple, dans les paysages européens, la densité des rongeurs, HI de nombreux helminthes, augmente suivant le gradient urbain - rural et du fait de la réponse fonctionnelle des prédateurs comme le renard roux, l'intensité des prévalences parasitaires et de la contamination environnementale suivent également ce gradient (Reperant *et al.*, 2007). En règle générale, plus la relation prédateur-proie est importante, plus la circulation et la transmission parasitaire sont intenses. Ainsi, à une échelle spatiale plus restreinte, les interactions hôtes-parasite sont variables en fonction de la distribution et de l'abondance des hôtes, des facteurs sous influence des types d'habitats, de la composition paysagère ou du niveau de fragmentation des habitats. En milieu rural, la diversité et l'abondance des communautés de rongeurs diffèrent selon le type d'habitat (prairie, forêt, champs, etc.) influençant directement la distribution des prédateurs (Alain *et al.*, 2006) et donc une distribution de prévalences parasitaires très hétérogène. En milieu urbanisé, les hôtes se répartissent dans des aires géographiques boisées non occupées en permanence par l'homme comme les parcs, les fragments de forêts, etc. (Bradley and Altizer, 2006) qui pourraient être des foyers de transmission élevée de parasites. Par exemple, la détection de formes infectieuses d'helminthes s'est avérée positive dans la plupart des parcs publics de deux

villes en Argentine, démontrant leur statut de zones localisées à risque d'exposition aux parasites zoonotiques en milieu urbain (Thevenet *et al.*, 2004). Toutefois, en cas de distributions chevauchantes des HI et HD, la circulation parasitaire peut être effective dans des zones fortement urbanisées. Il a été démontré, à titre d'exemple, que la prévalence du nématode *Baylisascaris procyonis* chez des populations de souris (*Peromyscus* spp.) augmentait à mesure que le gradient d'urbanisation et la densité humaine augmentaient, ceci en raison des densités plus élevées de rats laveurs (*Procyon lotor*), HD du parasite (Kellner *et al.*, 2012).

2.1.2. Schémas comportementaux

Dans les cycles complexes, les schémas de déplacement des hôtes sont un déterminant majeur dans la circulation parasitaire. Les HI parcourent souvent de courtes distances par rapport aux HD qui disséminent donc les propagules sur de plus larges distances avec leurs fèces (Morgan *et al.*, 2004). De nombreux canidés dispersent les œufs d'helminthes dans l'environnement des petits mammifères créant potentiellement des zones de transmission élevée par leurs comportements de défécation liés à leurs habitudes de recherche de nourritures, d'utilisation de l'habitat et d'interactions entre congénères par marquage fécal visuel et/ou olfactif (Barja *et al.*, 2005; Barja, 2009; Otranto *et al.*, 2015a; Gecchele *et al.*, 2020). Par ailleurs, les regroupements denses d'individus autour des points de ressources pourraient augmenter les taux de contacts intraspécifiques et/ou interspécifiques et faciliter la circulation parasitaire (Wright and Gompper, 2005). En général, les espèces grégaires qui vivent dans de grands groupes sociaux seraient particulièrement sensibles aux transmissions parasitaires dues à la promiscuité et aux taux de contacts élevés (Altizer *et al.*, 2003; Nunn *et al.*, 2011).

2.1.3. Dynamique de population des hôtes

Les distributions hétérogènes et agrégées parmi les hôtes sont une des caractéristiques importantes des parasites métazoaires dont les helminthes (Shaw *et al.*, 1998; Hudson, 2002; Poulin, 2013). Les hôtes juvéniles concentrent le plus souvent la majorité de la biomasse parasitaire (Sorvillo *et al.*, 2002; Altizer *et al.*, 2003, 2006). Le taux de dispersion souvent très élevé dans la tranche des jeunes pourrait accroître le risque de propagation de leurs parasites (Altizer *et al.*, 2003; Soulsbury *et al.*, 2008; Gras *et al.*, 2018; Gecchele *et al.*, 2020). Ceci démontre la grande importance de la dynamique de population des hôtes, particulièrement la composition et les paramètres démographiques, dans la circulation et la dissémination des parasites. Le degré de renouvellement des jeunes et des individus sains, susceptibles d'être immunologiquement naïfs, évolue dans le même sens que l'amplitude de la transmission et du cycle parasitaire (Altizer *et al.*, 2006).

2.2. Distribution et persistance des stades libres parasitaires dans l'environnement

Le succès du cycle parasitaire repose en partie sur la dispersion et la survie des œufs ou larves en ce qui concerne les helminthes, dans l'environnement. La plupart des helminthes sont caractérisés par un taux élevé de production d'œufs, ce qui assure une large dispersion dans l'environnement et compense la faible probabilité de rencontre avec les hôtes (Viney and Cable, 2011). Par exemple, un ver femelle d'*Ascaris* spp. peut produire jusqu'à 200 000 œufs par jour (Anderson and May, 1992; Bendall *et al.*, 2011). De plus, la coque externe des œufs leur procure une résistance aux conditions climatiques et environnementales (Wharton, 1983). Toujours dans le genre *Ascaris*, les œufs peuvent persister pendant plusieurs années dans diverses matrices environnementales (Oh *et al.*, 2016). Cependant, pour la plupart des parasites, les conditions de développement et de survie de ces stades infectieux varient en fonction des environnements et dans le temps (Alum *et al.*, 2010). Les œufs de certaines espèces d'helminthes ont besoin de chaleur et d'humidité pour se développer alors que d'autres survivent mieux dans les conditions fraîches (Morgan *et al.*, 2004). La disponibilité et la persistance de ces formes infectieuses sont donc dépendantes des saisons et des facteurs abiotiques environnementaux – température, humidité, précipitations, enneigement, etc. –, lesquels pourraient être les causes des variations spatiales et temporelles de la circulation des parasites (Altizer *et al.*, 2006). En conséquence, à une échelle de perception fine, les zones au microclimat favorable à la survie et à la persistance des œufs peuvent devenir des foyers à risque de transmission parasitaire élevée.

La variabilité de l'ensemble de ces paramètres (impacts humains, facteurs environnementaux, etc.) que nous venons de décrire affecte la distribution des communautés d'hôtes et des parasites à différentes échelles spatiales (continentale, régionale, locale) et temporelles, influençant de ce fait les variations de la contamination environnementale et des dynamiques de transmission des infections dont les compréhensions fines restent peu explorées (Collinge and Ray, 2006).

3. *Echinococcus multilocularis*

Echinococcus multilocularis est un helminthe hétéroxène qui, en raison de sa distribution, de la morbidité et du ratio de létalité de la zoonose dont il est responsable, occupe la première place (sur un classement de 24 parasites) des priorités en matière de prévention des zoonoses parasitaires transmissibles par l'alimentation en Europe (Bouwknegt *et al.*, 2018; EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) *et al.*, 2018; van der Giessen *et al.*, 2021). Plus particulièrement, il a été recommandé d'améliorer la compréhension des liens entre la présence du parasite dans les populations animales hôtes et les cas humains de l'échinococcose alvéolaire (EA), zoonose causée par *E. multilocularis* (Capek, 2010).

3.1. Description du parasite

Echinococcus multilocularis (Leuckart, 1863) est un ver hermaphrodite de l'embranchement des plathelminthes, de la classe des cestodes et de la famille des Taeniidae (Thompson, 2017). Le genre *Echinococcus* présente quelques caractéristiques qui le distingue du genre *Taenia* de la même famille (Thompson and McManus, 2001), notamment en ce qui concerne la taille des vers adultes, généralement très petite par rapport aux *Taenia*. Les vers d'*Echinococcus multilocularis* mesurent entre 1,2 et 4,5 mm (Deplazes and Eckert, 2001) et sont constitués de 4 à 5 segments ou proglottis (**Figure 3**) (Eckert *et al.*, 2001d). Le scolex (la tête), composé de 4 ventouses et de 2 petites couronnes de crochets, est l'organe de fixation du ver. Les proglottis intermédiaires du corps du ver renferment les organes génitaux femelle et mâle, qui s'autofécondent souvent et produisent donc les œufs qui seront libérés avec le proglottis terminal (Thompson, 2017). Les œufs sont ovoïdes (30-50 µm, Thompson, 2017) et sont constitués d'un embryon hexacanthé (avec 6 crochets fixateurs rangés en paires), l'oncosphère (c'est le premier stage larvaire) entouré de plusieurs enveloppes dont l'embryophore kératinisé très résistant conférant l'aspect strié à l'œuf (**Figure 3**) (Federer *et al.*, 2015). Le second stade larvaire du parasite correspond au metacestode qui a une localisation préférentielle hépatique. C'est la forme responsable de l'EA chez l'homme. Il s'agit d'une structure sans barrière limitative, infiltrante, qui se multiplie par bourgeonnement et est formée de nombreuses petites vésicules noyées dans un stroma de tissu conjonctif (Thompson, 2017). À l'intérieur de chaque vésicule, se forment par bourgeonnement de la membrane interne les protoscolex (**Figure 3**), formes fertiles qui se développeront en vers adultes. La membrane germinative du metacestode est responsable de la croissance invasive et de la libération de cellules germinatives qui peuvent former d'autres foyers métastatiques distants via la lymphe et le sang, ce qui constitue une particularité de l'espèce *E. multilocularis*. En tout, 9 (McManus, 2013; Nakao *et al.*, 2013) ou

10 autres espèces (Thompson, 2017) sont décrites dans le genre *Echinococcus* : *E. granulosus sensu lato* (*E. granulosus sensu stricto*, *E. equinus*, *E. canadensis*, *E. ortleppi*, *E. felidis*) et *E. intermedius* responsables de l'hydatidose, *E. shiquicus* décrite en Chine et potentiellement impliquée dans l'échinococcose alvéolaire (Xiao *et al.*, 2005), *E. vogeli* et *E. oligarthra* agents des échinococcoses polykystiques.

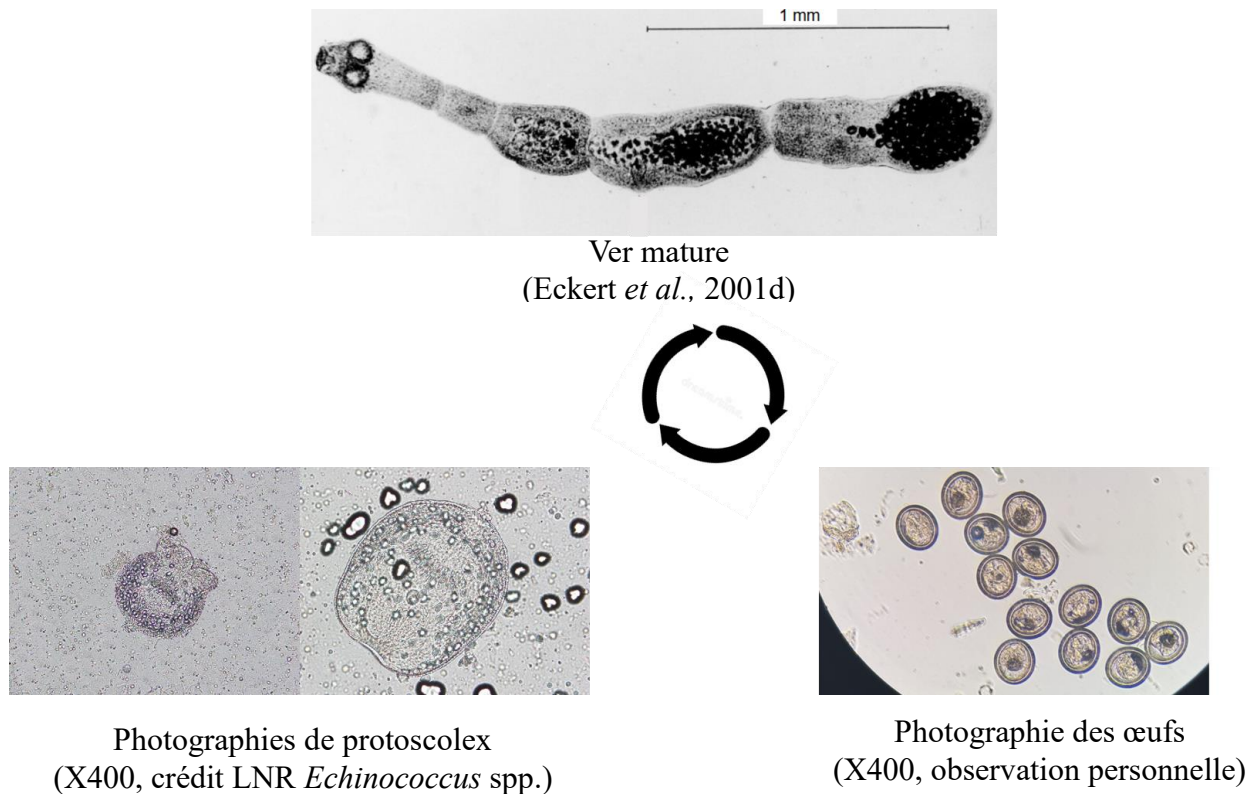


Figure 3 : Les trois stades parasitaires d'*Echinococcus multilocularis*.

3.2. Cycle de transmission et répartition géographique

Echinococcus multilocularis est un parasite dixène se transmettant via un système prédateur-proie entre un HD carnivore et un HI micromammifère (Romig *et al.*, 2017). Le ver adulte vit fixé dans l'intestin grêle des HD dont l'infestation est asymptomatique (Eckert *et al.*, 2001d). Il s'agit principalement des canidés – renards (genres *Vulpes* et *Alopex*), chiens domestiques, chiens viverrins, coyotes, loups, chacals – dont l'importance dans le cycle d'*E. multilocularis* varie en fonction de la distribution géographique des espèces (Eckert *et al.*, 2001d; Kapel *et al.*, 2006; Liccioli *et al.*, 2014; Oksanen *et al.*, 2016). Le cycle du parasite implique également dans

une moindre mesure les félidés comme les chats domestiques, les chats sauvages et le lynx (Eckert *et al.*, 2001d).

En Europe, le cycle essentiellement sylvatique implique le renard roux (*Vulpes vulpes*) comme l'hôte principal dans la transmission (Hegglin and Deplazes, 2013). Par ailleurs, les renards sont responsables de 81 à 96% de la contamination environnementale par les œufs d'*E. multilocularis* dans les zones rurales et urbaines de forte et faible endémicité et constituent donc la source majeure de dissémination du parasite (Hegglin and Deplazes, 2013; Knapp *et al.*, 2018). Les carnivores domestiques notamment les chiens (*Canis lupus familiaris*) peuvent participer au maintien d'un cycle synanthropique dans la mesure où leur contribution à la contamination environnementale (estimée jusqu'à près de 19% ; Hegglin and Deplazes, 2013) peut être relativement importante. Le rôle du chat (*Felis silvestris catus*) est considéré marginal et incertain car le potentiel reproductif du parasite est extrêmement faible chez cet hôte (Kapel *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2006; Umhang *et al.*, 2015). De plus, sa contribution dans la contamination environnementale par le parasite semble être très réduite (< 0,3% ; Hegglin and Deplazes, 2013). On retrouve le metacestode chez les HI constitués d'un large éventail de petits mammifères dont principalement les genres *Arvicola* et *Microtus* en Europe (Thompson and McManus, 2001; Beerli *et al.*, 2017; Romig *et al.*, 2017). La présence du metacestode a été décrite chez de nombreux hôtes aberrants ou accidentels comme les primates, les chiens, les chevaux, des rongeurs aquatiques, les suidés (Deplazes and Eckert, 2001; Eckert *et al.*, 2001c; Federer *et al.*, 2016; Umhang, 2017).

Après une maturation de 28 à 35 jours dans l'intestin de l'HD, le ver libère quelques milliers d'œufs directement infectieux, déposés dans l'environnement avec les fèces des HD (**Figure 4**) (Eckert *et al.*, 2001a; Thompson, 2017). La distribution des œufs dans l'environnement est ainsi principalement régie par la distribution des fèces des HD liée à leurs habitudes de défécation et d'utilisation des habitats (Raoul *et al.*, 2015). Ces œufs peuvent rester vivants et infectants pendant plusieurs mois à l'extérieur, à des températures comprises entre - 15 et 27°C (Federer *et al.*, 2015). Ils sont, par contre, très sensibles à la dessiccation et aux températures chaudes (Veit *et al.*, 1995). Par conséquent les conditions climatiques locales contrôlent la survie et la disponibilité des œufs (Giraudoux *et al.*, 2002). Les HI se contaminent en ingérant ces œufs. Sous l'action des enzymes de leur système digestif, l'oncosphère est libéré, traverse la paroi intestinale et migre passivement vers le foie. Là, a lieu une reproduction asexuée qui aboutit à la formation des vésicules contenant les protoscolex au bout de 2 – 4 mois seulement après l'ingestion des œufs démontrant une adaptation efficace du parasite à la courte vie des rongeurs

HI (Eckert *et al.*, 2001a). Les structures paysagères et l'utilisation des terres peuvent affecter la distribution et la densité des HI et donc la prévalence locale du parasite (**Figure 4**). La prédation par les carnivores des HI alors affaiblis par le développement du metacestode permet de boucler le cycle du parasite.

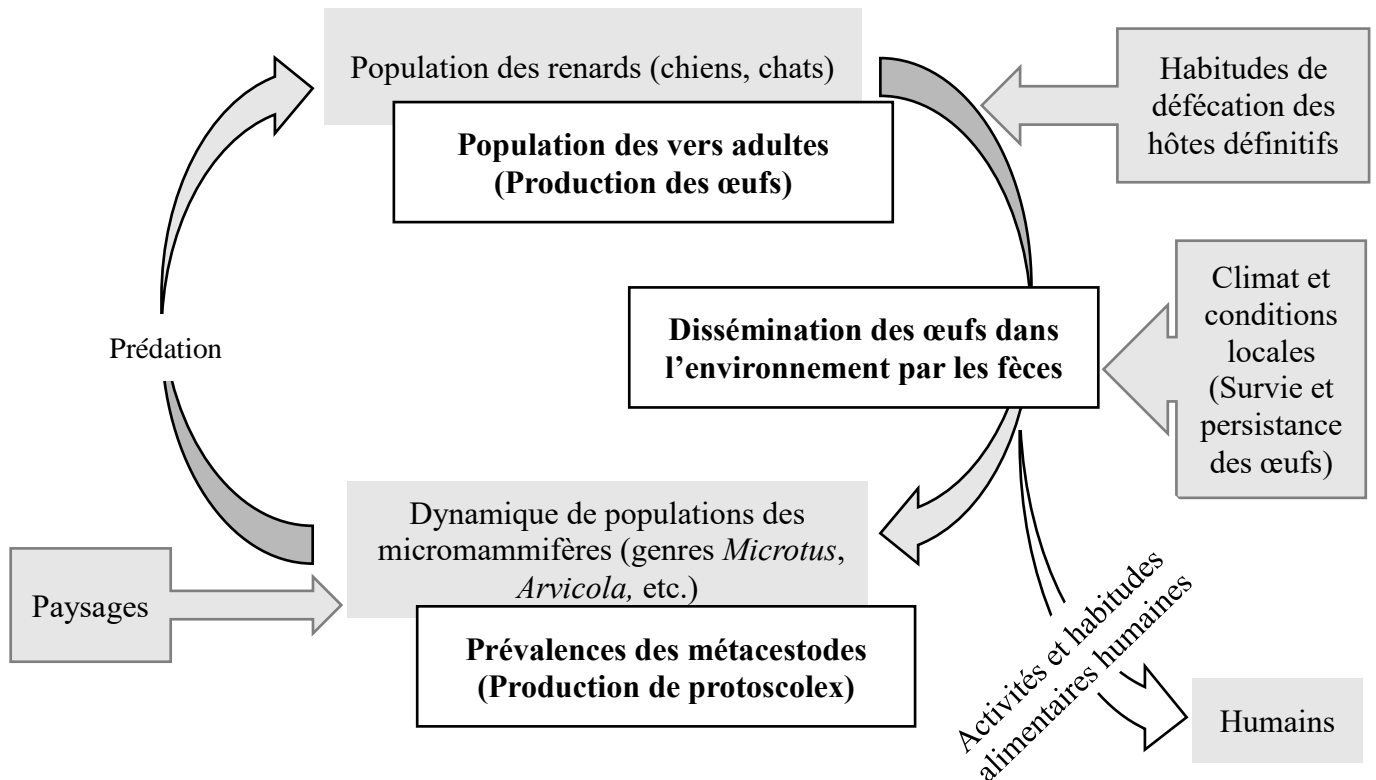


Figure 4 : Cycle d'*Echinococcus multilocularis* indiquant les hôtes définitifs et intermédiaires principaux en Europe et les principales variables impliquées dans la transmission du parasite (adapté de Giraudoux *et al.*, 2003).

Echinococcus multilocularis est présent uniquement dans l'hémisphère nord comprenant des zones d'Asie, d'Europe et d'Amérique du Nord (**Figure 5**), dans des écosystèmes divers comme la toundra arctique, les prairies et les paysages agricoles et urbains (Romig *et al.*, 2017). En Europe, le parasite s'est propagé des régions endémiques historiques connues du nord de la Suisse, de l'est de la France, du sud de l'Allemagne et de l'ouest de l'Autriche vers des régions auparavant considérées indemnes comme l'ouest de la France, les pays scandinaves, les pays baltes et l'Europe de l'est (Torgerson and Budke, 2003; Romig, 2009; Lind *et al.*, 2011; Combes *et al.*, 2012; Oksanen *et al.*, 2016; Deplazes *et al.*, 2017). Dans la plupart de ces pays européens, les données de chasse démontrent que les densités des populations de renards HD principal du

parasite augmentent fortement grâce notamment à l'élimination de la rage par les interventions vaccinales antirabiques et le changement de perception et d'attitude des populations envers le canidé (Chautan *et al.*, 2000; Eckert and Deplazes, 2004; Pleydell *et al.*, 2004; Vervaeke *et al.*, 2006; Hegglin *et al.*, 2015; Liccioli *et al.*, 2015a). De plus, en raison de la disponibilité permanente des ressources alimentaires anthropogènes, les renards roux s'établissent de plus en plus dans les villes avec des prévalences parasitaires très variables (Hegglin *et al.*, 2003; Romig, 2009; Davidson *et al.*, 2012). Les zones avec les plus fortes prévalences restent toutefois les périphéries des villes et des villages qui présentent les plus fortes densités croisées de renards et des micromammifères HI (Stieger *et al.*, 2002; Deplazes *et al.*, 2004; Hegglin *et al.*, 2007; Robardet *et al.*, 2008, 2011; Janko *et al.*, 2011).

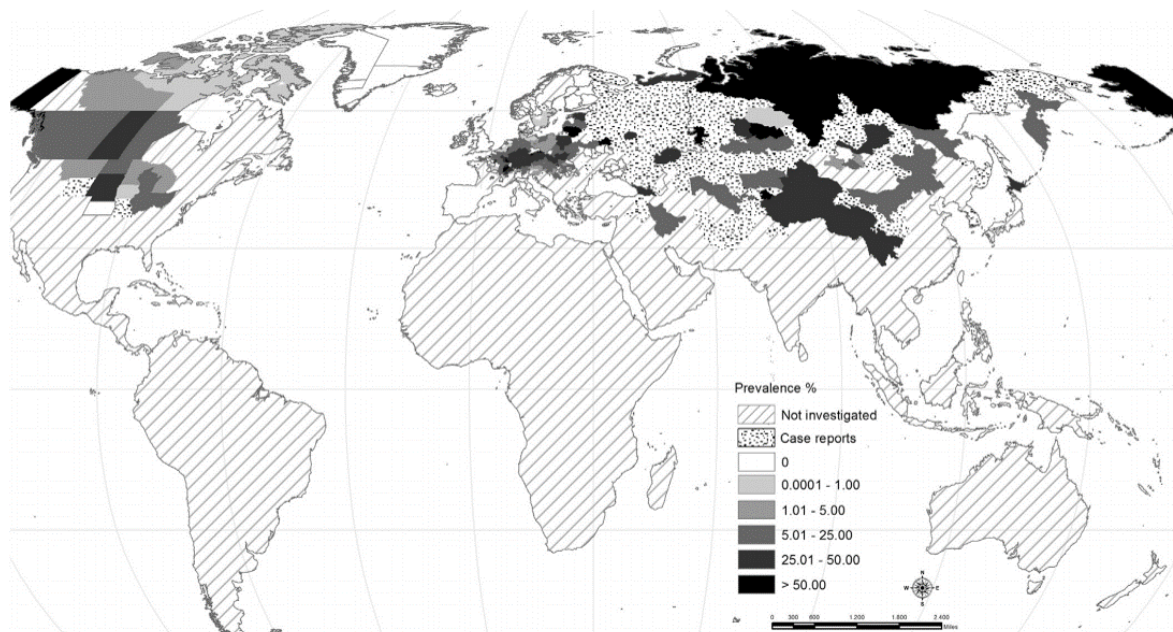


Figure 5 : Distribution mondiale du parasite *Echinococcus multilocularis* au sein de ses principaux hôtes définitifs suivant les localisations géographiques (Deplazes *et al.*, 2017).

3.3. Potentiel zoonotique

L'EA humaine survient suite à l'ingestion accidentelle des œufs par contact direct avec les HD ou indirectement via la consommation de végétaux ou d'eau souillés ou par le contact avec le sol contaminé (Danson *et al.*, 2003; Torgerson *et al.*, 2010; Oksanen *et al.*, 2016). L'homme constitue alors un hôte accidentel car n'intervenant pas dans la réalisation du cycle parasitaire et un hôte aberrant produisant très rarement des vésicules fertiles contenant des protoscolex (Ricken *et al.*, 2017) avec une réponse immunitaire efficace dans la quasi-totalité des cas de tentatives d'infection (seulement 1 personne sur 100 ingérant un œuf du parasite développe

l'EA évolutive ; Gottstein *et al.*, 2015b). L'infection humaine est régie par des variables comportementales et socio-économiques qui favorisent un contact étroit avec le parasite et son ingestion accidentelle (Torgerson *et al.*, 2010). Ainsi, les personnes possédant ou entretenant un jardin potager, les propriétaires de chiens, de chats, ou les personnes qui manipulent des renards, ainsi que les agriculteurs ont un risque d'infection plus élevé (Kern *et al.*, 2004; Piarroux *et al.*, 2013; Conraths *et al.*, 2017). La maladie se manifeste essentiellement par une atteinte du foie (seulement 2 à 4% de formes exclusivement extrahépatiques ; Bresson-Hadni *et al.*, 2014) avec une dispersion pseudo-tumorale vers les organes adjacents ou plus distants tels que les poumons, le cerveau, etc. (Eckert and Deplazes, 2004). La maladie présente une période d'incubation de 5 à 15 ans avant l'apparition des premiers signes cliniques (Gottstein *et al.*, 2015b), tels une hépatomégalie, des douleurs abdominales, un ictère et dans les formes sévères et métastatiques, des atteintes cérébrales, pulmonaires, osseuses, etc. (Bresson-Hadni *et al.*, 2014). Le diagnostic repose sur des techniques d'imagerie, sérologiques, anatomopathologiques et potentiellement moléculaires mises en relation avec les données épidémiologiques et cliniques (Brunetti *et al.*, 2010). Le traitement est basé sur une approche médicamenteuse parasitostatique à l'albendazole couplée à une chirurgie radicale ou partielle (dans 30 à 40% des cas actuellement) (Brunetti *et al.*, 2010). C'est donc une pathologie grave et d'évolution mortelle en absence de diagnostic précoce (Torgerson and Craig, 2009), mais rare puisqu'on ne recense qu'environ 18 000 nouveaux cas par an dans le monde dont la grande majorité (91%) en Chine sur le plateau tibétain (**Figure 6**) (Torgerson *et al.*, 2010; Torgerson and Macpherson, 2011).

Les prédictions prévoyaient la disparition complète de l'EA de l'Europe à la fin du 20^{ème} siècle grâce à l'urbanisation, à l'amélioration des mesures sanitaires en matière de sécurité alimentaire, d'assainissement et à la diminution des populations des catégories socio-économiques les plus à risque de l'infection (Vuitton *et al.*, 2015). En fait, parallèlement à la croissance des populations de renards, les cas humains augmentent dans les zones d'endémie historique et on recense de plus en plus de cas dans des pays considérés comme indemnes jusqu'à la fin du 20^{ème} siècle (**Figure 6**) (Davidson *et al.*, 2012; Gottstein *et al.*, 2015a; Baraquin, 2019). En France, 853 cas d'EA sont recensés sur la période 1982 – 2020 (en moyenne 22 nouveaux cas par an) dont plus de 80% se situent dans les régions de l'Est – Bourgogne-Franche-Comté, Grand-Est et Auvergne-Rhône-Alpes – (CNR Echinococcoses, 2021) classées comme zone d'endémie historique de la maladie (Eckert *et al.*, 2000). Avec un nombre moyen de nouveaux cas de 35,3 pour la période 2010 – 2019, l'incidence a plus que

doublée par rapport à la période 1982 – 1999 (CNR Echinococcoses, 2021). Le même phénomène d'expansion de la maladie est constaté à l'échelle de la France avec une augmentation des cas en dehors de la zone d'endémie historique, provenant des régions du Sud, de l'Ouest et du Nord (7% de nouveaux cas sur la période 1982-2010 contre 15% sur 2010-2020, registre FrancEchino ; CNR Echinococcoses, 2021). Comme attendu, on note une distribution spatio-temporelle agrégative des cas humains au niveau régional (Piarroux *et al.*, 2013; Said-Ali *et al.*, 2013) en lien avec les densités de populations de rongeurs d'espèces d'arvicolidés (Viel *et al.*, 1999) et donc avec la structure paysagère (Giraudoux *et al.*, 2003). Si l'augmentation des prévalences humaines au niveau régional a été démontrée consécutive à la croissance des populations de renards (Schweiger *et al.*, 2007), on a, en revanche, peu de données sur le lien, à différentes échelles spatio-temporelles, entre la distribution du parasite au sein de ses hôtes, dans l'environnement et la répartition hétérogène des cas humains.

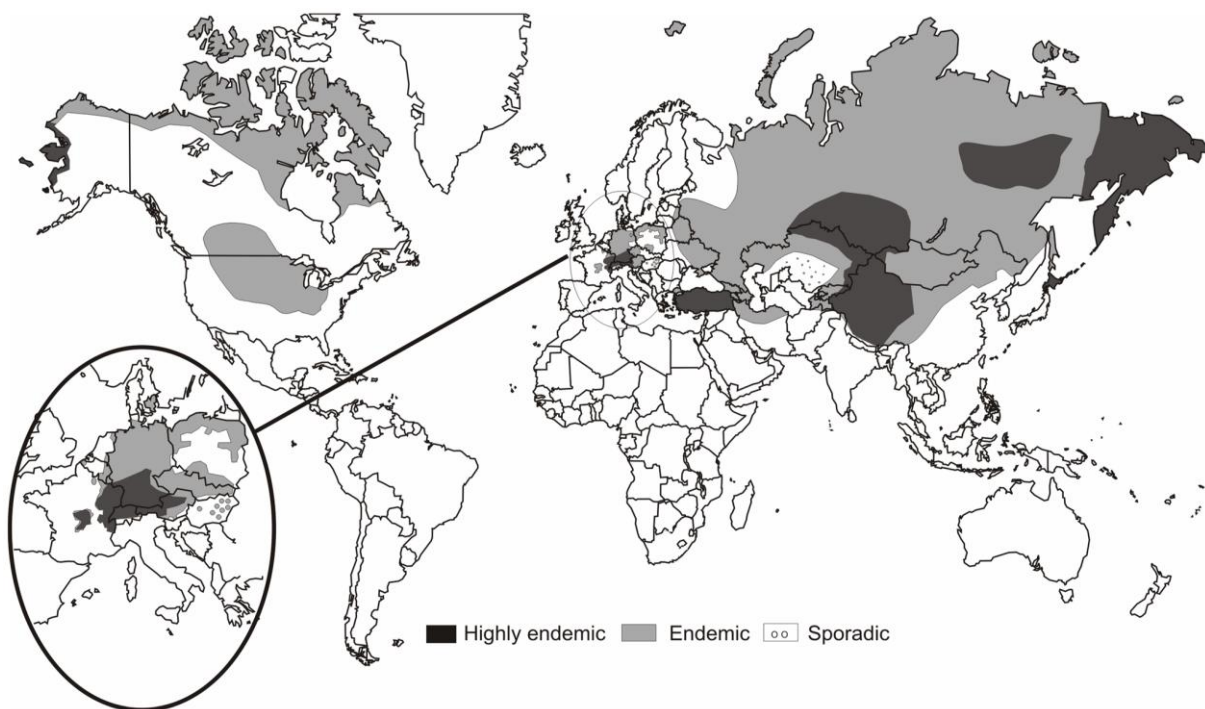


Figure 6 : Distribution des cas humains d'EA dans le monde avec un aperçu sur l'expansion de la maladie en Europe (Torgerson *et al.*, 2010).

3.4. Distribution et contamination des hôtes définitifs

Le risque d'infection des HD dépend essentiellement de la mesure dans laquelle leur aire de répartition chevauche celle des HI sensibles et du taux de prédation (**Figure 7**). Dans ces habitats communs aux hôtes, la distribution des fèces des HD et la disponibilité des œufs du parasite sous le contrôle des conditions microclimatiques locales modulent la transmission du parasite (**Figure 7** et **Figure 8**) (Giraudoux *et al.*, 2002; Guislain *et al.*, 2007).

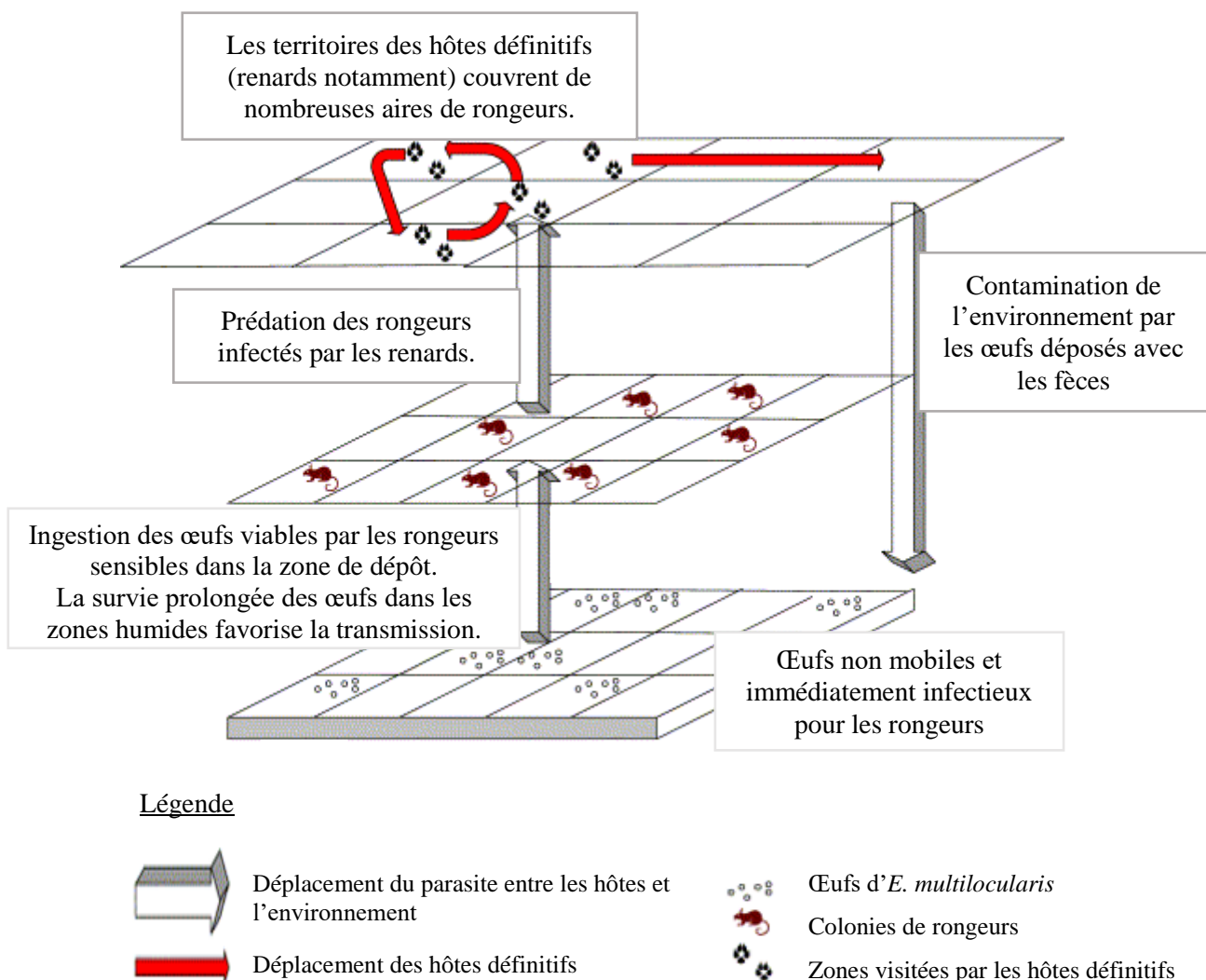


Figure 7 : Schématisation du chevauchement des aires de répartition des hôtes d'*Echinococcus multilocularis* et de la transmission spatiale du parasite (adaptée de Morgan *et al.*, 2004).

Le type d'habitat a une influence directe sur la distribution et la densité des rongeurs (**Figure 8**) et donc sur la répartition et la prévalence parasitaire des HD. Par exemple, les prévalences

les plus élevées du parasite chez le renard roux ont été rapportées dans les zones riches en prairies propices aux pullulations des campagnols terrestres (*Arvicola scherman*) et des campagnols des champs (*Microtus arvalis*) (Raoul *et al.*, 2015). À l'intérieur des habitats favorables à la rencontre du parasite et des hôtes, la survie des œufs ainsi que la structure des populations des hôtes varient en fonction des saisons, ce qui induit une adaptation des HD en termes de taux et de comportement de prédation vis-à-vis de la disponibilité variable des proies (**Figure 8**). L'accessibilité et l'abondance des proies dans une zone donnée peuvent induire une augmentation de la densité et du taux de prédation des renards roux (Dupuy *et al.*, 2009; Ferreras *et al.*, 2011). En conséquence, la biomasse parasitaire pourrait s'accroître et aboutir donc à une intensification de la transmission du parasite dans la zone (Raoul *et al.*, 2015). En Alaska, il a été rapporté une prévalence d'*E. multilocularis* de presque 100% à la fin de l'été et en automne chez les jeunes renards après plusieurs mois de régime alimentaire composé essentiellement de rongeurs (Rausch *et al.*, 1990a, 1990b; Eckert *et al.*, 2001a). Au printemps suivant, la prévalence a diminué drastiquement (à près de 30%) car le manteau neigeux en hiver a diminué l'accessibilité des rongeurs et les renards en ont consommé moins (Rausch *et al.*, 1990a, 1990b; Saitoh and Takahashi, 1998). Les dynamiques de population des rongeurs sensibles au parasite et leurs interactions avec les renards via le système prédateur-proies expliqueraient donc les variations spatiales et saisonnières de la transmission d'*E. multilocularis* (Giraudoux *et al.*, 2003; Raoul *et al.*, 2015). Peu d'études ont fourni des preuves directes sur ces aspects saisonniers chez les hôtes domestiques comme le chien et le chat. Chez le chien, les prévalences d'*E. multilocularis* étaient toutefois proportionnelles à la densité des rongeurs en Chine (Budke *et al.*, 2005a; Wang *et al.*, 2010; Giraudoux *et al.*, 2013b) et en Slovaquie (Antolová *et al.*, 2009).

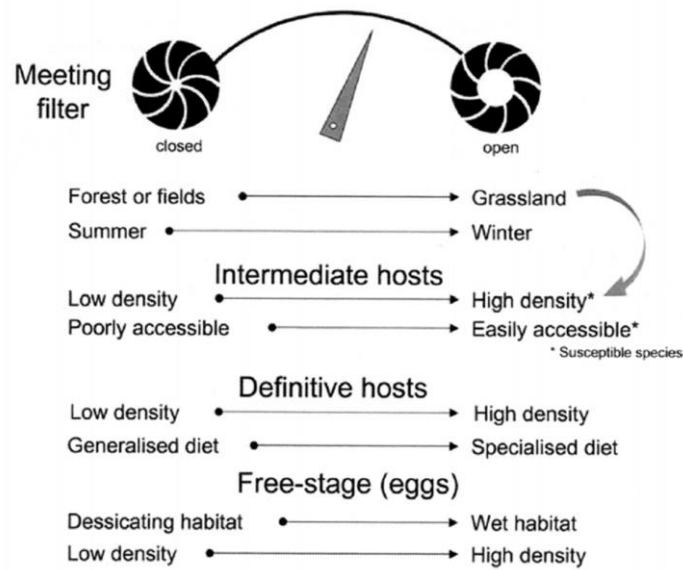


Figure 8 : Adaptation du concept de filtre de rencontre pour l'identification des facteurs écologiques impliqués dans la transmission d'*Echinococcus multilocularis* en Europe (Giraudoux *et al.*, 2003). Les variables de gauche sont considérées comme défavorables à la circulation du parasite et celles de droite comme favorables.

3.4.1. Distribution des prévalences

Les prévalences cumulées du parasite chez le renard roux montrent des disparités importantes au niveau du continent européen avec, sans surprise, les taux les plus élevés (> 10 %) dans les zones d'endémie historique dont l'est de la France (Oksanen *et al.*, 2016). À une échelle plus régionale, les prévalences du parasite dans les populations des renards apparaissent très hétérogènes dans l'espace et dans le temps (Miterpáková *et al.*, 2006a; Combes *et al.*, 2012; Guerra *et al.*, 2014). En France, en zone d'endémie, sur quelques dizaines de kilomètres les prévalences parmi la population de renard roux ont évolué de plus de 50% à moins de 10% localement (**Figure 9**) (Combes *et al.*, 2012). Du fait de la corrélation entre les densités des proies et le taux de prédation du renard, les prévalences croissent sensiblement selon le gradient urbain-périurbain-rural (Hegglin *et al.*, 2007; Robardet *et al.*, 2008, 2011; Raoul *et al.*, 2015). De plus, une distribution agrégative du parasite est constatée généralement parmi les populations locales notamment en zones d'endémie où seulement quelques individus, essentiellement les jeunes renards, hébergent la quasi-totalité de la biomasse parasitaire (Raoul *et al.*, 2001; Tackmann *et al.*, 2001; Fischer *et al.*, 2005; Robardet *et al.*, 2008). Des données, plutôt rares, sur les prévalences dans les populations de carnivores domestiques, notamment chez les chiens montrent des taux autour de 1% (Toews *et al.*, 2021) avec la même tendance agrégative de la charge parasitaire observée chez les renards (Budke *et al.*, 2005b). Comme

attendu, les prévalences sont généralement plus élevées (près de 8%) chez les chiens ayant des habitudes de prédation et ceux ayant la possibilité de se déplacer librement (Svobodová and Lenská, 2002; Deplazes *et al.*, 2011). Concernant les chats domestiques, les études expérimentales et les données collectées sur le terrain ont montré que les infections sont caractérisées par de très faibles charges des vers adultes d'*E. multilocularis* (Petavy *et al.*, 2000; Kapel *et al.*, 2006). La prévalence chez cet hôte a varié donc de 0 à un peu plus de 5% sans une distribution particulière dans diverses zones endémiques (Gottstein *et al.*, 2001; Deplazes *et al.*, 2011; Eckert *et al.*, 2011).

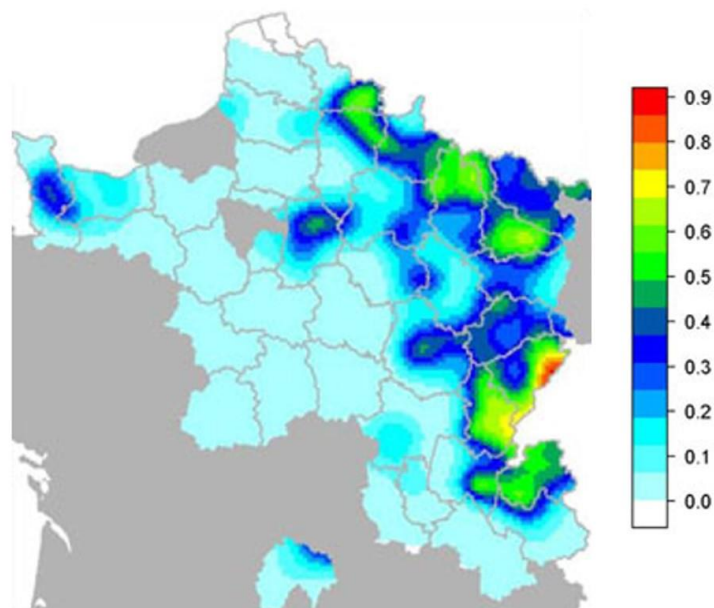


Figure 9 : Hétérogénéité spatiale des prévalences d'*Echinococcus multilocularis* chez le renard roux en France (Combes *et al.*, 2012).

3.4.2. Distribution des dépôts fécaux

Les HI ne peuvent acquérir l'infection que lorsque les œufs infectants sont déposés dans leur environnement. Par voie de conséquence, l'endroit, la densité et la fréquence des dépôts fécaux des HD sont des paramètres déterminants dans la transmission locale du parasite. Ces paramètres sont directement dépendants de la densité des HD et de leur comportement de défécation influencé par plusieurs facteurs comme l'utilisation de l'habitat, les interactions entre les individus et la distribution des ressources dans l'environnement (Raoul *et al.*, 2015). La répartition des fèces est donc variable dans l'espace et dans le temps. En général, on note une distribution structurée des fèces des carnivores HD en fonction des environnements ruraux

et urbains. La modélisation de la distribution des fèces de renards, à une échelle locale, dans la zone d'endémie des Ardennes (France) a montré que les fèces n'étaient pas aléatoirement déposées (Guislain *et al.*, 2007). En effet, la densité des matières fécales était plus élevée au printemps qu'en automne et ceci plus dans les bordures herbeuses, les berges de route et dans les prairies. Or, ces endroits étaient les habitats avec les densités les plus élevées des espèces de campagnols HI sensibles (*A. scherman* et *M. arvalis*) au parasite *E. multilocularis*. Le risque de transmission du parasite pourrait être donc élevé dans ces micro-foyers locaux. À un niveau de perception régionale, dans les montagnes du Jura, 90% des excréments de renards ont été retrouvés le long de bordure des champs labourés et des routes alors qu'ils ont leurs tanières principalement dans les forêts (Raoul *et al.*, 2015). Dans ces micro-habitats, la prévalence du parasite chez les rongeurs était de 12,6 % contre une prévalence globale régionale de 1‰ seulement (Giraudoux *et al.*, 2002). La contamination était donc agrégée dans ces habitats des rongeurs HI fréquentés préférentiellement par les renards, favorisant ainsi la rencontre parasite-hôtes. Par ailleurs, les matières fécales des renards se retrouvent plus abondamment en périphérie des environnements urbains le plus souvent directement dans les aires avec de fortes densités de rongeurs (Stieger *et al.*, 2002; Janko *et al.*, 2011; Robardet *et al.*, 2011). Si les dépôts fécaux des renards y compris ceux contenant le parasite apparaissent très hétérogènes (Knapp *et al.*, 2018), la question est tout autre avec la distribution des fèces des carnivores domestiques qui présentent généralement des prévalences fécales d'*E. multilocularis* faibles mais pouvant monter jusqu'à 4 % pour les chats (Dyachenko *et al.*, 2008; Umhang *et al.*, 2015; Knapp *et al.*, 2016b), et jusqu'à 8 % pour les chiens (Deplazes *et al.*, 2011; Umhang *et al.*, 2014a; Budgley *et al.*, 2017). En effet, leurs fèces sont retrouvées plus abondamment proches des habitations humaines au cœur des villages et villes y compris dans les parcs publics (Vaniscotte *et al.*, 2011; Hegglin and Deplazes, 2013; Van Kesteren *et al.*, 2013; Knapp *et al.*, 2018). La probabilité de rencontre entre le parasite et les hôtes potentiels (l'homme y compris) pourrait ainsi être plus élevée en raison de ces fortes densités de fèces certes moins contaminées mais dans des aires restreintes au plus proche des humains (Deplazes *et al.*, 2004; Hegglin *et al.*, 2015; Knapp *et al.*, 2018). De plus, le contact direct avec les chiens infectés est bien documenté comme une voie de transmission d'*E. multilocularis* (Davidson *et al.*, 2012; Torgerson *et al.*, 2020). Il est alors possible que les œufs ou les proglottis présents sur le pelage des chiens infectés se transmettent aux humains à travers les caresses et les manipulations de ces animaux de compagnie (Deplazes *et al.*, 2004, 2011).

3.4.3. Identification et suivi d'*E. multilocularis* au sein de ses hôtes définitifs

La distribution géographique d'*E. multilocularis* en Europe a été principalement déterminée par l'identification du parasite chez l'hôte principal, le renard (Conraths and Deplazes, 2015). La surveillance éco-épidémiologique cible donc essentiellement les prévalences élevées ou en phase de croissance d'*E. multilocularis* dans les populations vulpines mais aussi les cas humains d'EA afin d'identifier l'aire de répartition du parasite et les zones d'endémie (Davidson *et al.*, 2012). C'est d'autant plus justifié que le parasite circule quasi-exclusivement en Europe entre les renards et les rongeurs mais avec des prévalences globalement très faibles chez les rongeurs (Giraudoux *et al.*, 2002; Hegglin *et al.*, 2007). Comme nous l'avons décrit précédemment, la tendance semble être une distribution fortement hétérogène du parasite avec des foyers locaux hyper-endémiques (Gottstein *et al.*, 2001; Giraudoux *et al.*, 2002; Combes *et al.*, 2012; Enemark *et al.*, 2013; Denzin *et al.*, 2014; Umhang *et al.*, 2014b) sur lesquels devraient se concentrer des approches ciblées afin d'y évaluer les déterminants clés (Conraths and Deplazes, 2015), par exemple, la taille du foyer, la dynamique de l'infection au sein du foyer, la direction ou la vitesse de la propagation à partir du foyer en utilisant des marqueurs moléculaires (Umhang *et al.*, 2014b).

Le diagnostic des infestations intestinales chez les HD repose sur l'identification du parasite à l'aide de techniques morphologiques, immunologiques ou moléculaires à partir de matériels biologiques comme les intestins et les fèces (Conraths and Deplazes, 2015). L'examen post-mortem du contenu intestinal par les techniques de sédimentation et de comptage est considéré comme la méthode de référence avec une sensibilité évaluée à environ 100% (Eckert, 2003; Umhang *et al.*, 2011). Cette méthode a l'avantage de permettre l'identification concomitante d'autres helminthes intestinaux et de déterminer leurs stades de développement et les charges parasitaires ainsi que les caractéristiques des individus autopsiés (sexe, âge, mensurations, etc.). Sa faisabilité nécessite toutefois des précautions de biosécurité importantes en raison des risques d'infection pour l'expérimentateur et dépend de la disponibilité et le statut des espèces animales cibles. Les renards étant classés souvent comme des nuisibles, leurs cadavres sont accessibles pour les études utilisant des techniques invasives. L'application de cette méthode pour le diagnostic chez les carnivores domestiques (chiens et chats) est plutôt rare et non acceptable pour l'opinion publique et les propriétaires d'animaux, du fait de leur statut d'animaux de compagnie (Conraths and Deplazes, 2015). De plus, les individus étant irréversiblement retirés de la population, les méthodes d'analyses *post-mortem* ne permettent pas des mesures répétitives individuelles et des études longitudinales. D'autres approches de

dépistage ne nécessitant pas d'autopsie, comme la purge à l'arécoline ou les dépistages sérologiques, ont été longtemps utilisées pour la détection des infestations chez les chiens notamment (Conraths and Deplazes, 2015). Ces méthodes sont nettement moins appropriées à cause de leur lourdeur, leur toxicité ou leur manque de spécificité et de sensibilité. La collecte et l'analyse des échantillons fécaux représentent une alternative totalement noninvasive, qui permet de préserver les populations animales, ce qui est indispensable pour la détection du parasite *intra vitam* chez les carnivores animaux de compagnie et éthiquement plus acceptable pour les animaux sauvages. De plus, l'utilisation des copro-échantillons semble plus appropriée dans les investigations sur la transmission du parasite car les fèces sont la source d'exposition des HI et des hôtes aberrants comme l'homme. De ce fait, une estimation de la contamination environnementale par le parasite est tout à fait possible (Conraths and Deplazes, 2015; Knapp *et al.*, 2018).

3.4.3.1. Détection d'*E. multilocularis* dans les fèces des hôtes définitifs

La détection microscopique directe des œufs ou des proglottis dans les fèces par des techniques de concentration est peu sensible et ne permet pas de différencier les œufs d'*E. multilocularis* de ceux des autres espèces des genres *Echinococcus* et *Taenia* en général (Conraths and Deplazes, 2015; Thompson, 2017). Le diagnostic au niveau de l'espèce nécessite donc la détection par PCR dans les fèces de l'ADN du parasite dans les œufs, les proglottis ou les cellules issus des vers présents dans l'intestin (Bretagne *et al.*, 1993; Deplazes and Eckert, 2001; Dinkel *et al.*, 2011; Knapp *et al.*, 2014; Conraths and Deplazes, 2015). Diverses cibles impliquant des gènes nucléaires ou mitochondriaux du parasite ont été utilisées avec des spécificités parfois proches de 100% (pas d'amplification d'autres *Echinococcus* ou *Taenia*) et des sensibilités très élevées permettant la détection d'un seul œuf dans les échantillons (Conraths and Deplazes, 2015). La détection de copro-ADN du parasite est toutefois limitée par la taille d'échantillon à analyser (0,5 – 4 g) en raison de la présence potentielle de substances inhibitrices de PCR dans les fèces. La concentration des œufs au préalable par des techniques de flottaison par exemple, présente le double avantage de surmonter les limitations de la quantité d'échantillons à analyser et de diminuer considérablement l'effet des inhibiteurs d'amplifications (Conraths and Deplazes, 2015; Umhang, 2017). De plus, la PCR en temps réel permet de quantifier l'ADN du parasite et donc les œufs présents dans les fèces (Isaksson *et al.*, 2014; Knapp *et al.*, 2014). Les biais d'échantillonnage sont toutefois courants dans les études noninvasives dont les estimations de prévalences sont basées sur le nombre d'échantillons infectés collectés à partir d'individus non identifiés (Zhang *et al.*, 2011). En effet, la collecte

aléatoire des fèces sur un site ne permet pas de savoir si plusieurs échantillons sont déposés par un même individu ou quelques-uns seulement. Une approche intéressante pour surmonter ces limitations consiste à génotyper les individus ayant produit les fèces grâce à des marqueurs moléculaires comme les microsatellites.

3.4.3.2. Identification individuelle des hôtes définitifs par génotypage non-invasif

Les microsatellites sont des séquences d'ADN de motifs courts de 1 à 6 nucléotides répétés en tandem, distribuées de façon aléatoire et fréquente dans les génomes nucléaires de nombreux organismes eucaryotes et qui n'auraient pas de fonction biologique connue (Selkoe and Toonen, 2006; Balaesque, 2007; Kelkar *et al.*, 2010). Également désignés sous les appellations de répétitions de séquences simples (SSR), répétitions en tandem à nombre variable (VNTR) ou encore répétitions en tandem courtes (STR), leurs séquences présentent un polymorphisme de répétition (par conséquent de taille) variable d'un individu à un autre au sein d'une espèce et qui constitue le fondement des techniques de génotypage (Selkoe and Toonen, 2006; Guichoux *et al.*, 2011). En général, un microsatellite est unilocus avec un maximum de deux allèles co-dominants par individu (Valière, 2002a). Le principe de génotypage consiste à amplifier par PCR un ensemble de microsatellites à partir de leurs régions flanquantes (séquences très souvent bien conservées chez les individus), à mesurer les allèles amplifiés puis à construire un génotype par individu à partir des longueurs des fragments (**Figure 10**).

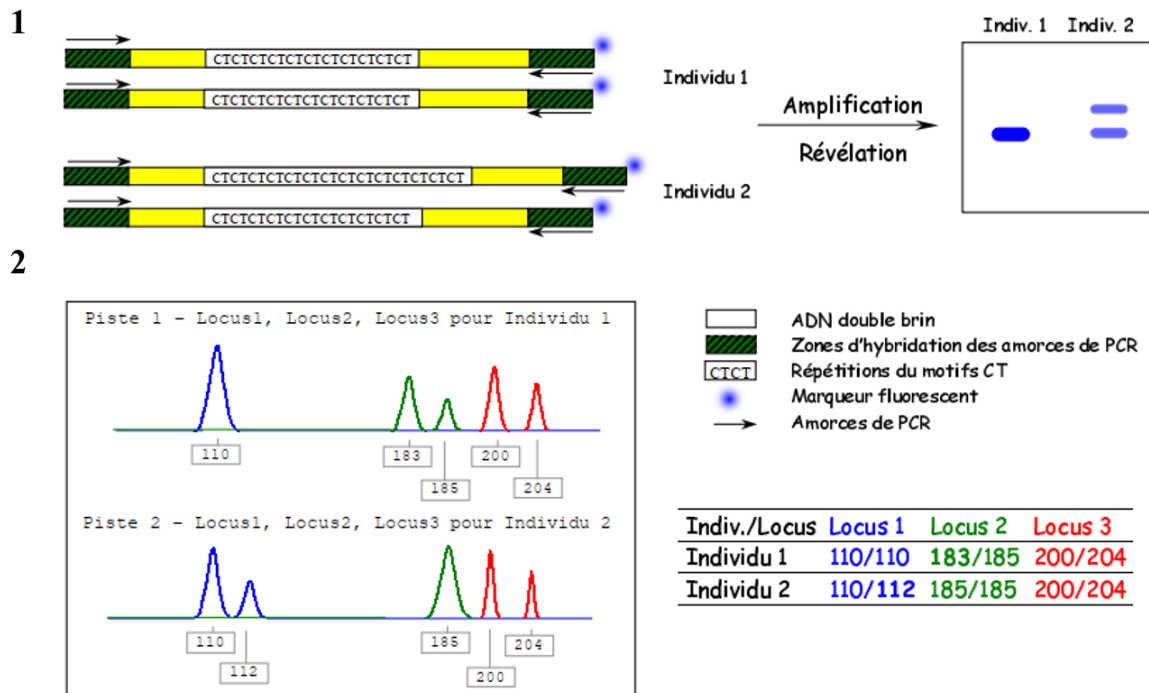


Figure 10 : Principe de génotypage à partir des marqueurs microsatellites (Valière, 2002a).

1, Polymorphisme de répétition et donc de taille d'un microsatellite [(CT)*n*] pour un locus pour deux individus et visualisation des produits PCR sur gel après amplification avec un couple d'amorces dont l'une est marquée avec un fluorochrome; **2**, exemple de pics de fluorescence pour trois microsatellites (une couleur par locus) après détection des amplicons par électrophorèse capillaire. Chaque pic représente la taille en paires de base d'un allèle. Puis à droite, les génotypes de deux individus construits à partir des allèles des trois marqueurs microsatellites.

Le génotypage à partir d'échantillons non-invasifs tels que les poils et les fèces est de plus en plus utilisé pour l'étude des animaux difficiles à capturer, à manipuler ou pour les espèces menacées ou en danger de disparition (Banks *et al.*, 2002; Prugh *et al.*, 2005; Selkoe and Toonen, 2006; Morán-Luis *et al.*, 2014). L'identification individuelle par copro-génotypage est ainsi utilisée chez de nombreux canidés et félinés dans le but de recenser les individus, établir la répartition des espèces ou encore étudier leur régime alimentaire (Smith *et al.*, 2006; Adams *et al.*, 2007; Rodgers and Janečka, 2013). En plus de l'identification au niveau individuel, les marqueurs microsatellites permettent également l'estimation de la taille de la population d'hôtes sur un site donné, la structure génétique et la composition (sex-ratio par exemple si utilisation d'un marqueur de sexe) de la population ainsi que le suivi des individus dans le temps (Kohn *et al.*, 1999; Valière, 2002a).

Une des difficultés majeures de l'identification individuelle par microsatellites est de disposer d'un panel de marqueurs suffisamment polymorphes pour discriminer les individus sans

ambiguïté (Taberlet and Luikart, 1999; Waits *et al.*, 2001; Banks *et al.*, 2002). Le degré de puissance du système de marqueurs est ainsi évalué par la probabilité d'identité, qui est la probabilité que deux individus sélectionnés aléatoirement aient le même génotype. Cette probabilité est calculée à partir des fréquences alléliques des loci utilisés avec un seuil recommandé inférieur à 0.01 (Waits *et al.*, 2001). Un autre inconvénient de l'utilisation des microsatellites dans les études noninvasives est lié à la nature de ces échantillons (fèces ou poils principalement). Ils contiennent généralement l'ADN cible en quantité faible qui est dégradé à cause des conditions environnementales et/ou soumis aux divers enzymes et sucs du tube digestif (dans les cas de fèces), en plus de la présence des inhibiteurs de PCR (Valière, 2002a; Reddy *et al.*, 2012). C'est pourquoi les rendements d'amplification des échantillons non-invasifs sont souvent inférieurs à ceux obtenus avec les méthodes invasives à partir de morceaux de tissus de renards par exemple (Valière, 2002a). En outre, l'utilisation de ces types d'échantillons amène à deux grands types d'erreurs d'amplification (Puechmaille and Petit, 2007; Valière *et al.*, 2007) :

- i) Présence de faux allèle (FA pour *false allele*) due à l'amplification et à la révélation de fragments d'ADN contaminant et pouvant être considérés comme des allèles réels.
- ii) Perte d'allèle (ADO pour *allelic dropout*) due à la non-amplification d'un des deux allèles chez les individus hétérozygotes pour un locus donné. Ces erreurs sont associées principalement à la faible quantité d'ADN cible dans les extraits issus des échantillons non-invasifs.

Des protocoles d'analyses rigoureuses comme l'approche multitubes – plusieurs répétitions d'amplifications pour un même échantillon et pour un même locus puis définition d'un génotype consensuel à partir des répliquats – sont mis en œuvre pour minimiser ces erreurs (Taberlet *et al.*, 1996; Valière, 2002a; Valière *et al.*, 2007). En principe, les taux de ces erreurs doivent être systématiquement rapportés dans les études d'identification individuelle basée sur le génotypage par amplifications de microsatellites (Selkoe and Toonen, 2006). Ces taux sont calculés en comparant le génotype consensuel avec le génotype obtenu lors de chacune des répétitions d'amplification et en comptabilisant les différences (Valière, 2002a, 2002b). Les approches d'analyses pour réduire les erreurs sont quasi-systématiquement intégrées dans les analyses moléculaires et parasitologiques des fèces (Smith *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2011). A notre connaissance, une seule étude a évalué la faisabilité du génotypage non-invasif fécal en tant qu'outil éco-épidémiologique dans l'investigation de la circulation d'*E. multilocularis* chez

un HD, les coyotes (*Canis latrans*), dans un environnement urbain au Canada (Liccioli *et al.*, 2015b). Ces travaux ont abouti à une estimation fiable de la prévalence réelle du parasite parmi ces hôtes mais aussi d'autres paramètres comme la taille de la population des hôtes dans les parcs de la ville et les taux de ré-infestation au cours de la période d'étude. Ces paramètres démographiques et de suivi individuel des hôtes sont essentiels pour définir la taille d'un foyer endémique ou pour détecter les dynamiques de l'infection au sein ou à partir du foyer (Staubach *et al.*, 2011; Conraths and Deplazes, 2015) ou encore suivre la dispersion du parasite vers les régions auparavant indemnes (Combes *et al.*, 2012; Denzin *et al.*, 2014). Ce dernier aspect implique également d'analyser la diversité génétique du parasite pour étudier les modes d'expansion du parasite entre les différentes zones. À un niveau plus local, recenser les différents variants du parasite pourrait aider à comprendre les liens potentiels entre les cycles domestiques ou péri-domestiques et sylvatiques.

3.4.3.3. Diversité génétique d'*E. multilocularis* à partir des œufs du parasite

Dû notamment à son mode de reproduction presque-exclusivement par autofécondation, la diversité génétique d'*E. multilocularis* apparaît relativement faible (Knapp *et al.*, 2011; Valot *et al.*, 2015). Les recherches sur le développement d'un outil moléculaire hautement discriminant ont cependant permis d'identifier et de caractériser le microsatellite multilocus EmsB présent en 40 copies dans le génome nucléaire d'*E. multilocularis* et qui présente un polymorphisme important (Bart *et al.*, 2006; Knapp, 2008; Valot *et al.*, 2015). Ce marqueur a été utilisé pour explorer la diversité génétique du parasite à différentes échelles spatiales allant d'un niveau micro-local à des niveaux de perception régional et continental (Knapp *et al.*, 2007, 2009, 2012). Ces études montrent que le parasite se répand des foyers historiques de la région alpine vers le nord et l'ouest de la France et vers les zones périphériques du nord et de l'est européen, suivant un système de transmission continent-île (Umhang *et al.*, 2014b, 2021).

Le défi majeur de l'application des analyses EmsB dans les études noninvasives concerne la qualité et la quantité d'ADN contenu dans les échantillons. En ce qui concerne les fèces, les œufs (ou les proglottis) du parasite sont les plus susceptibles de contenir de l'ADN en quantité et en qualité suffisante pouvant permettre l'amplification d'EmsB. Pour disposer de résultats fiables et stables, il apparaît nécessaire de concentrer ou d'isoler les œufs avant l'étape du génotypage par EmsB (Knapp, 2008).

3.5. Contamination environnementale par les œufs d'*E. multilocularis*

La distribution et la disponibilité – survie, infectiosité et persistance – des œufs d'*E. multilocularis* dans l'environnement sont directement sous l'influence des variations climatiques. Au vu de la susceptibilité du parasite mesurée sous conditions expérimentales (Veit *et al.*, 1995; Federer *et al.*, 2015), les périodes froides et humides contrairement aux périodes chaudes sont plus favorables à la survie et à la persistance des œufs dans l'environnement. Ceci expliquerait la répartition restreinte de l'espèce *E. multilocularis* à l'hémisphère nord contrairement à d'autres *Echinococcus* et *Taenia* (Eckert *et al.*, 2001b; Mas-Coma *et al.*, 2008). De même, les habitats humides pourraient présenter les densités les plus élevées des œufs d'*E. multilocularis* (Giraudoux *et al.*, 2003). Les zones avec de faibles températures annuelles et des sols très humides ont été ainsi associées significativement aux prévalences élevées du parasite chez les renards (Staubach *et al.*, 2001; Miterpáková *et al.*, 2006b). Il apparaît probable que la distribution du stade libre d'*E. multilocularis* dans les diverses matrices environnementales (sol, végétaux, eau, etc.) soit largement régie par celle des fèces des HD et donc soit différente ou hétérogène en fonction des habitats ou milieux, comme pour la plupart des parasites à transmission oro-fécale avec un stade libre environnemental (Morgan *et al.*, 2013; Collender *et al.*, 2015). Or, peu d'informations sont disponibles sur les niveaux de contamination ou de persistance du parasite dans ces matrices qui sont des voies potentielles de transmission d'*E. multilocularis* (Torgerson *et al.*, 2010; Oksanen *et al.*, 2016; Guggisberg *et al.*, 2020). La problématique relative à la présence et à la persistance d'*E. multilocularis* dans l'environnement demeure particulièrement prégnante car il est difficile voire impossible d'identifier avec certitude les sources de contamination chez l'homme à cause de la durée singulièrement longue de la phase d'incubation de l'EA (Davidson *et al.*, 2012; Umhang *et al.*, 2017b). C'est pourtant une variable tout aussi indispensable dans la compréhension et l'évaluation du risque surtout dans les zones de forte endémie où la distribution des œufs du parasite dans l'environnement pourrait fortement moduler la contamination humaine et la transmission vers les HI.

Les investigations sur la distribution des œufs du parasite dans l'environnement sont limitées dues à l'absence ou le manque de sensibilité de méthodes de détection (Matsuo and Kamiya, 2005; Umhang *et al.*, 2017b). La récente association de méthodes de flottaison/filtration et de biologie moléculaire a permis d'estimer la présence d'ADN d'*E. multilocularis* à approximativement 11% dans des échantillons de sol collectés en zone d'endémie d'EA en Pologne et en France (Szostakowska *et al.*, 2014; Umhang *et al.*, 2017b). Comme attendu, les échantillons de sol collectés sous les fèces de carnivores positives pour *E. multilocularis* étaient

significativement plus contaminés par le parasite, démontrant que la distribution du parasite dans le sol est directement fonction du lieu de dépôt initial des œufs (Umhang *et al.*, 2017b). En ce qui concerne les végétaux, aucune méthode standard n'est pour l'instant disponible pour détecter le parasite et évaluer le risque pour le consommateur (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) *et al.*, 2018). En conditions expérimentales, le parasite a été retrouvé sur tous les végétaux sur lesquels des lots de 4 à 20 œufs d'*E. multilocularis* ont été déposés au préalable (Guggisberg *et al.*, 2020). En conditions naturelles, l'ADN du parasite a été détecté en plus grande proportion, en zone d'endémie d'EA, sur des végétaux (fruits de forêt, champignons comestibles et framboises) collectés dans des sous-bois, jardins potagers et plantations en Pologne – 23,3% contre seulement près de 7% pour les échantillons collectés en zone de non-endémie – (Lass *et al.*, 2015, 2017). En raison des prévalences d'*E. multilocularis* très élevées dans les populations des HD notamment des renards, il apparaît probable que l'environnement en zone d'endémie soit plus largement contaminé par les œufs du parasite. En revanche, aucune étude n'est disponible sur la mesure dans laquelle la répartition des œufs dans l'environnement est conditionnée par les modèles de distribution spatiale des dépôts fécaux des carnivores HD du parasite.

4. Objectifs

La relation prédateur-proie détermine la transmission du parasite à cycle complexe *E. multilocularis* des hôtes intermédiaires vers les hôtes définitifs, alors que la dissémination des fèces de carnivores hôtes définitifs dans l'environnement permet la transmission du stade infectieux du parasite aux hôtes intermédiaires et à l'homme, hôte accidentel (Raoul *et al.*, 2015). La transmission des œufs du parasite est ainsi régie par la distribution des fèces des hôtes définitifs dans l'environnement et par les conditions climatiques qui contrôlent la survie des œufs (Giraudoux *et al.*, 2002). En zones rurales endémiques, la contamination environnementale apparaît très localisée dans des micro-foyers qui pourraient être des zones de haut risque de contamination humaine (Giraudoux *et al.*, 2002; Robardet *et al.*, 2011; Said-Ali *et al.*, 2013; Raoul *et al.*, 2015; Knapp *et al.*, 2018). Cette distribution très hétérogène du parasite ainsi que la caractérisation de la contribution des hôtes définitifs aux variations spatiales et temporelles de la contamination environnementale restent peu explorées.

4.1. Objectifs généraux

Les recherches entreprises ici s'inscrivent dans le cadre de projets initiaux suivants :

- Projet MONIZOO pour *Monitoring des Zoonoses*,
- Projet SICAR pour *suivi individuel des carnivores*,
- Projet RISKOJARDINS pour *l'étude du risque de contamination parasitaire des jardins potagers*.

4.1.1. Projet MONIZOO

Ce projet de recherche a pour objectif principal la compréhension fine et la caractérisation de l'évolution spatio-temporelle de la contamination environnementale par *E. multilocularis* en adoptant une approche systémique intégrant des données parasitologiques, génétiques, spatiales et climatiques. La finalité est de déterminer le niveau de pression d'infection sur les hôtes intermédiaires au cours des saisons et sa distribution spatiale et d'évaluer le risque d'exposition pour les populations humaines. Un nématode, *Toxocara* spp. très largement répandu parmi les mêmes hôtes définitifs (Morgan *et al.*, 2013; Overgaauw and van Knapen, 2013), a été considéré comme un indicateur de présence des parasites zoonotiques dans l'environnement et a servi de contrôle dans le système de détection et pour le suivi de la circulation de parasites de carnivores dans l'environnement.

Ce projet implique le laboratoire Chrono-environnement UMR6249 CNRS de l'Université Bourgogne Franche-Comté en collaboration avec le Laboratoire National de Référence *Echinococcus* spp. (Anses, Laboratoire de la rage et de la faune sauvage, Unité de surveillance et éco-épidémiologie des animaux sauvages, Malzéville, France) et les équipes de l'Entente de Lutte Interdépartementale contre les Zoonoses (ELIZ, Nancy, France). Les communes incluses dans le projet, Les Alliés (départements du Doubs, Région Bourgogne Franche-Comté), Rogéville et Velaine-sous-Amance (Meurthe-et-Moselle, Région Grand Est) sont situées dans la zone d'endémie historique d'EA dans des régions qui enregistrent les taux d'incidences les plus élevés chez l'homme (**Figure 11**) (Piarroux *et al.*, 2013; CNR Echinococcoses, 2021) et des prévalences d'*E. multilocularis* dépassant 50% dans la population de renards (Combes *et al.*, 2012).

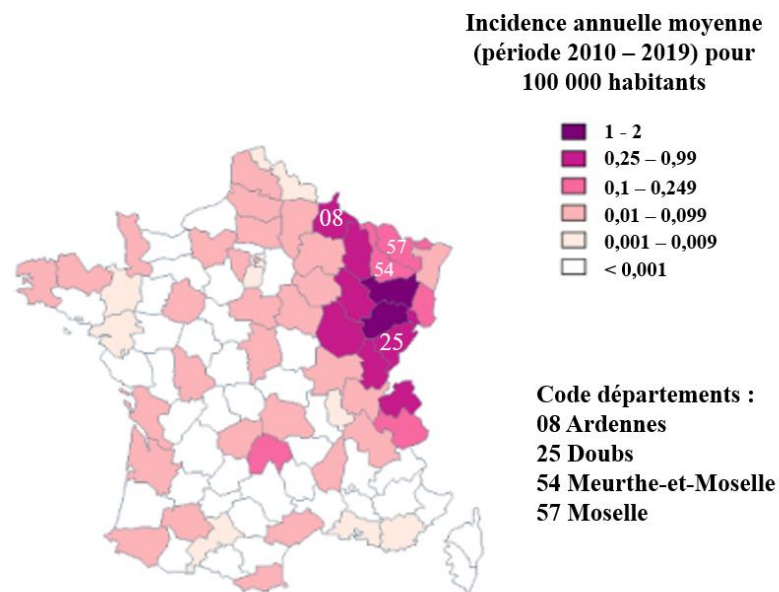


Figure 11 : Incidence moyenne annuelle de l'EA par département en France (issu de CNR Echinococcoses, 2021).

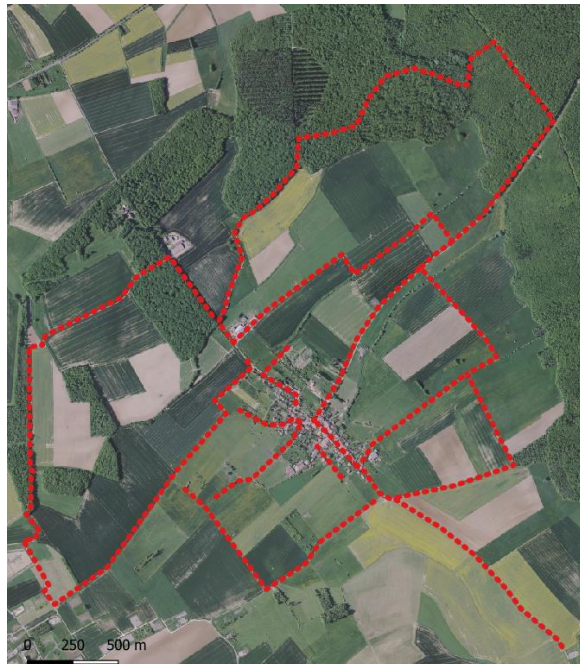
Le protocole d'étude entièrement non-invasif était basé sur la collecte de fèces de carnivores tous les deux mois de mars 2017 à janvier 2020 sur des parcours prédéfinis (**Figure 12**), soit un total de 17 sessions de collecte pour les Alliés et 18 sessions pour chacune des deux communes du département de la Meurthe-et-Moselle.



Les Alliés = 14,1 km



Rogéville = 21,8 km



Velaine-sous-Amance = 19,9 km

Figure 12 : Les parcours de collecte des fèces de carnivore et leurs distances respectives sur les trois communes incluses dans le projet « Monitoring des Zoonoses ».

Toutes les fèces identifiées visuellement comme appartenant aux carnivores ont été collectées et géoréférencées. Ces échantillons sont décontaminés à -80°C pendant une semaine (Veit *et al.*, 1995) pour inactiver les parasites et prévenir les contaminations humaines puis sont conservés à -20°C avant les analyses en laboratoire. Les espèces hôtes émettrices des fèces

ainsi que les parasites *E. multilocularis* et *Toxocara* spp. ont été identifiés par amplifications de fragments spécifiques de copro-ADN par qPCRs (Knapp *et al.*, 2014, 2016a). Ainsi, la distribution spatiale et temporelle de ces agents pathogènes notamment *E. multilocularis* portés par les hôtes définitifs est déterminée. Par ailleurs, le protocole d'étude implique également la collecte d'échantillons de sols une fois par an par intervalles d'environ 100 m sur les mêmes parcours de collecte des fèces. Les œufs d'*E. multilocularis* et de *Toxocara* spp. ont été recherchés par flottaison puis confirmés par qPCR dans ces échantillons de sol (Umhang *et al.*, 2017b). La distribution et la persistance des œufs dans le sol sont ainsi évaluées au cours des saisons.

4.1.2. Projet SICAR

Ce projet financé par la région Bourgogne Franche-Comté (France) porte sur l'identification individuelle des carnivores porteurs d'*E. multilocularis* permettant ainsi d'optimiser l'étude de la contamination environnementale par le parasite dans les zones de forte incidence d'EA (**Figure 11**), et donc de mieux cibler les mesures de prévention vers les populations les plus exposées. Les objectifs spécifiques étaient de i) mettre au point des protocoles de géotypages des fèces de chiens et de renards à l'aide de marqueurs microsatellites ; ii) conduire des essais sur le terrain permettant l'identification génétique individuelle des émetteurs de fèces porteuses d'*E. multilocularis* afin d'identifier la part des individus dans la contamination environnementale par le parasite.

4.1.3. Projet RISKJARDINS

Ce projet a été mené dans le cadre des travaux de thèse de Matthieu Bastien (2017). L'objectif du projet était d'évaluer et de caractériser la contamination de jardins potagers ruraux par les parasites transmis par l'alimentation dont *E. multilocularis*. Ces potagers ont été échantillonnés dans les départements des Ardennes et de la Moselle qui présentent des taux d'incidence de l'EA dépassant 0,1 pour 100 000 habitants (**Figure 11**). Les fèces de carnivores ont été collectées au cours de plusieurs sessions effectuées lors des hivers 2011 à 2015, identifiées pour les espèces émettrices puis testées pour la présence des parasites – *T. gondii*, *Toxocara* spp. et *E. multilocularis* – (Bastien, 2017; Poulle *et al.*, 2017; Bastien *et al.*, 2019). Ces parasites ont été également recherchés dans le sol de ces potagers. Ce dernier point a nécessité la mise au point et la validation de nouvelles méthodes de détection des trois parasites dans les échantillons de sol (Umhang *et al.*, 2017b; Escotte-Binet *et al.*, 2019). La distribution de la contamination

parasitaire des sols a été ainsi évaluée et pouvait être mise en relation avec les dépôts fécaux des carnivores.

4.2. Objectifs de la thèse

Dans le cadre général de ces projets initiaux, ce travail de thèse a pour objectif d'identifier, en zone d'endémie d'*E. multilocularis*, quelle est la part respective des différents hôtes définitifs connus – renard, chien et chat – dans la contamination environnementale par le parasite en milieu rural et urbain et de caractériser leur contribution dans cette contamination afin de disposer d'informations pour la prévention de l'exposition humaine. La circulation d'*E. multilocularis* a donc été étudiée dans l'environnement d'une part, via les fèces des carnivores hôtes définitifs du parasite et d'autre part dans le sol. En milieu urbain, nous nous sommes limités à une échelle très locale, dans les jardins potagers où la présence de ce parasite transmis par l'alimentation pourrait accroître le risque de contamination humaine. Cet objectif général est subdivisé en trois objectifs spécifiques présentés dans la **Figure 13** et autours desquels sont construites les trois parties de ce mémoire :

- i) **La première partie est axée sur l'étude de la distribution des dépôts fécaux de carnivores porteurs d'*E. multilocularis* dans un environnement rural en zone de forte endémie d'EA.**

Le but ici est d'estimer la fréquence des dépôts fécaux des renards, chiens et chats ainsi que la fréquence de détection d'*E. multilocularis* dans ces fèces et, d'autre part de rechercher d'éventuelles tendances de distribution spatiale dans le dépôt des fèces notamment celles porteuses du parasite. Compte tenu des comportements de défécation des carnivores liés au marquage de territoire et à la recherche de nourriture, une structuration de l'émission des fèces pouvait être attendue en fonction des espèces de carnivores et des individus.

- ii) **La deuxième partie porte sur la circulation d'*E. multilocularis* entre les hôtes sauvages et domestiques par l'étude de la diversité génétique du parasite à une échelle locale.**

L'une des questions en suspens soulevées par Raoul *et al.* (2015) dans leur revue sur la dynamique et le comportement des hôtes d'*E. multilocularis* dans la transmission trophique du parasite concernait le niveau de liaison entre les cycles sylviques, domestiques ou péri-domestiques du parasite, ceci afin de mieux cerner le risque d'EA au plus près de l'homme. L'objectif de cette deuxième partie consiste ainsi à évaluer dans quelle mesure le cycle

domestique est lié et maintenu par le cycle sylvatique à travers l'étude de la diversité génétique des œufs d'*E. multilocularis* isolés des fèces des hôtes sauvages et domestiques. Le défi majeur a été toutefois d'isoler les œufs d'*E. multilocularis* chez ces carnivores notamment les renards hébergeant potentiellement plusieurs espèces de la famille des Taeniidae et de pouvoir disposer de profils génétiques fiables à partir des faibles quantités d'ADN des œufs.

iii) La troisième partie concerne la distribution d'*E. multilocularis* dans le sol de jardins potagers en lien avec l'intensité et la fréquence de dépôts fécaux des carnivores hôtes définitifs.

Dans cette dernière partie, nous nous sommes intéressés à la distribution spatiale et temporelle du parasite dans des jardins potagers ruraux et urbains, des lieux à risque potentiel d'exposition humaine aux parasites agents pathogènes de zoonoses transmises par l'alimentation. L'objectif est de déterminer l'ampleur de la contamination des sols par *E. multilocularis* et de la mettre en relation avec la fréquence et l'intensité des fèces de renards, de chiens et de chats, afin de cerner la persistance à plus long terme du parasite dans l'environnement.

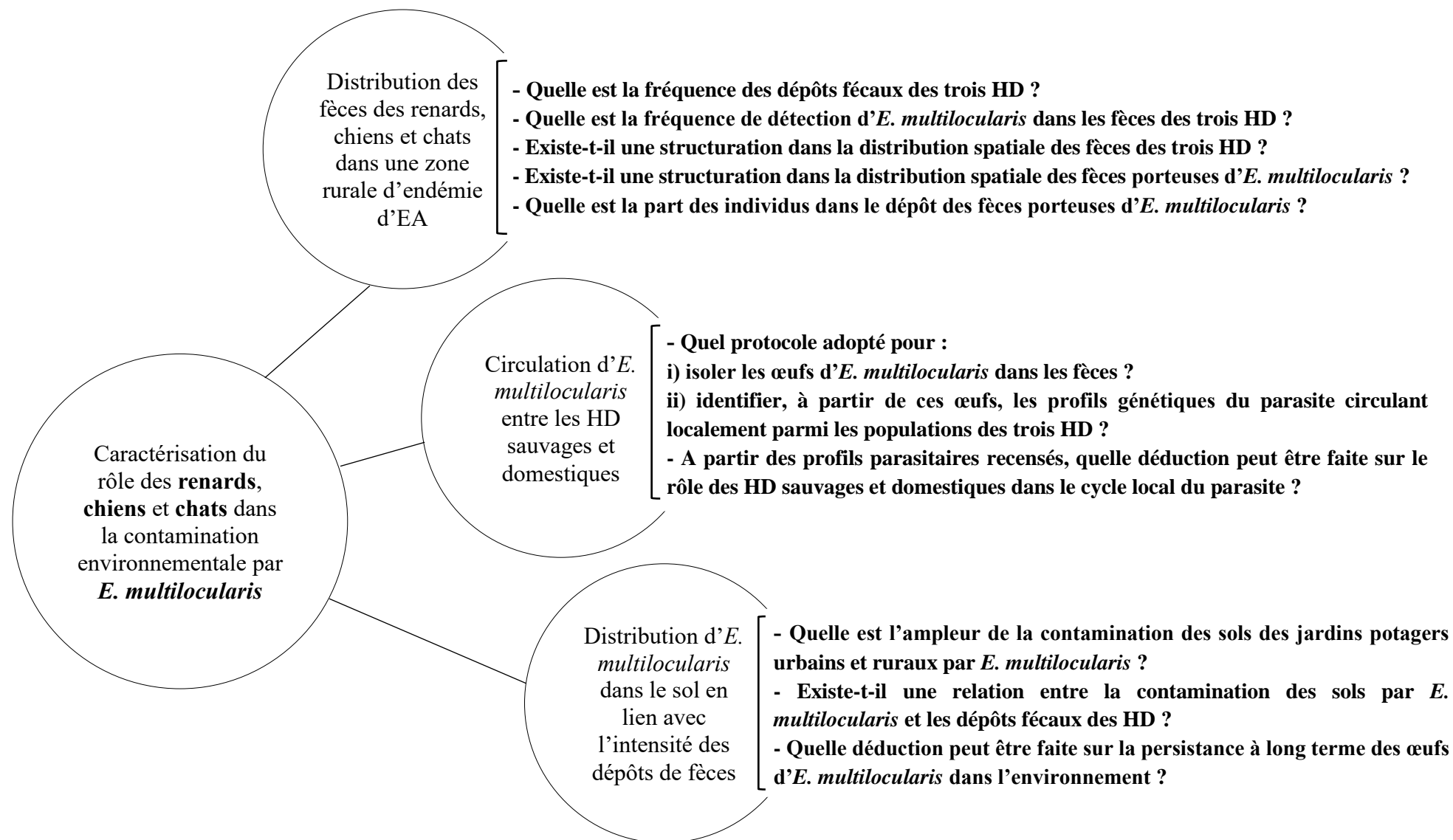


Figure 13 : Objectifs de cette étude.

Première partie : Distribution des dépôts fécaux de carnivores porteurs d'*Echinococcus multilocularis* dans un environnement rural en zone de forte endémie d'EA

1. Introduction

1.1. Contexte

La distribution spatiale des fèces de carnivores HD d'*E. multilocularis* est un paramètre clé pour étudier et déterminer les zones à risque d'EA (Pouille *et al.*, 2017; Bastien *et al.*, 2018; Knapp *et al.*, 2018). En effet, la contamination environnementale par le parasite et le risque d'infection pour les HI et l'homme dépendent de la distribution des fèces principalement celles contenant effectivement les œufs du parasite (Giraudoux *et al.*, 2002; Pleydell *et al.*, 2004; Raoul *et al.*, 2015; Knapp *et al.*, 2018). L'évaluation de cette contamination environnementale est souvent basée sur l'échantillonnage des fèces couplé à une analyse moléculaire par des techniques d'amplification (PCR ou qPCR) pour la détection de l'ADN d'*E. multilocularis* dans les échantillons fécaux (Conraths and Deplazes, 2015; Pouille *et al.*, 2017; Knapp *et al.*, 2018). Toutefois, l'ADN du parasite détecté dans les fèces ne provient pas toujours des œufs. Les cellules ou les fragments excrétés par le ver présent dans le tube digestif de l'animal infesté peuvent être décelés par les techniques de biologie moléculaire (Al-Sabi' *et al.*, 2007). De plus, les traces de transit du parasite comme le métacestode digéré donc non installé ou le passage inoffensif d'éléments parasitaires dû par exemple à la coprophagie fréquente chez certaines espèces de carnivores comme le chien peuvent être également détectés (Frenkel and Parker, 1996; Fahrion *et al.*, 2011; Nijssse *et al.*, 2015; Umhang *et al.*, 2015). Toutes ces éventualités peuvent potentiellement conduire à une surestimation, dans une mesure inconnue, de la contamination environnementale via les fèces par les techniques de biologie moléculaire. Par ailleurs, les comportements spécifiques associés à la défécation de quelques individus (par exemple, le sur-marquage fécal du territoire, la recherche de nourriture, etc.) dans la population locale des HD pourraient être plus décisifs que d'autres dans l'agrégation spatiale d'*E. multilocularis* (Vaniscotte, 2009; Vaniscotte *et al.*, 2011), d'autant plus que le parasite a une distribution très hétérogène au sein des hôtes (Hofer *et al.*, 2000; Raoul *et al.*, 2001; Fischer *et al.*, 2005; Guislain *et al.*, 2008). La contamination environnementale localisée devrait donc provenir essentiellement de quelques individus parmi la population des HD. Il s'agit là d'un point à prendre en compte pour comprendre, à échelle de perception locale, les processus d'infection des HI et les risques d'infection pour l'homme, afin de mieux orienter les mesures de lutte ou de prévention. Cependant, à notre connaissance, aucune étude antérieure n'a fourni de données sur la contribution individuelle des HD dans la contamination environnementale par le parasite *E. multilocularis*. Contrairement aux méthodes invasives ou d'observation directe sur le terrain, l'analyse génétique des copro-échantillons apparaît comme une option favorable

pour identifier les dépôts fécaux des individus et suivre leur fréquence d'émission des déjections par capture-recapture (Zhang *et al.*, 2011; Liccioli *et al.*, 2015b).

1.2. Objectifs

Dans ce contexte, l'objectif de cette première partie était de rechercher d'éventuelles structurations de l'émission des fèces notamment celles porteuses d'*E. multilocularis* par les renards, chiens et chats.

Nous avons, dans un premier temps, évalué la fréquence des dépôts fécaux des trois HD, la fréquence de détection du parasite dans ces fèces et étudié leurs distributions spatiales. Ce travail a été mené parallèlement à une validation de notre méthode de quantification de l'exposition au parasite *E. multilocularis* dans l'environnement. Cette étude a fait l'objet d'un article publié inclut dans ce mémoire :

- **Da Silva, A.M., Courquet, S., Raoul, F., Rieffel, D., Giraudoux, P., Millon, L., Knapp, J. 2020. Assessment of the exposure to *Echinococcus multilocularis* associated with carnivore faeces using real-time quantitative PCR and flotation technique assays. *International Journal for Parasitology* 50, 1195–1204. (DOI: [org/10.1016/j.ijpara.2020.07.008](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.07.008)).**

Dans un second temps, nous avons cherché à identifier par copro-génotypage, les caractéristiques individuelles de l'infection par *E. multilocularis* parmi la population des renards puis à déterminer la part des individus dans le dépôt des fèces positives pour le parasite dans l'environnement. Cette étude fait aussi l'objet d'une publication :

- **Da Silva, A.M., Afonso E., Raoul, F., Giraudoux, P., Merguey, M., Umhang, G., Courquet, S., Rieffel, D., Millon, L., Knapp, J. Fox coprogenetics: infection and contribution of individuals to *Echinococcus multilocularis* environmental overdispersion in an endemic area of alveolar echinococcosis.** En préparation.

2. Méthodologie

Les échantillons de fèces collectés, identifiés pour les espèces de carnivores et testés pour la présence d'ADN d'*Echinococcus multilocularis* sur la commune des Alliés dans le cadre du projet MONIZOO ont été inclus dans cette étude. Tout d'abord, nous avons développé et appliqué une approche qui allie la détection d'ADN et des œufs d'*E. multilocularis* dans les fèces, afin d'évaluer leur pertinence dans l'étude de l'exposition au parasite dans

l'environnement. L'approche consistait brièvement à concentrer les œufs de Taeniidae par une technique de flottaison au sucrose à partir des fèces détectées positives pour la présence d'ADN d'*E. multilocularis* puis à isoler un par un et à identifier les œufs du parasite par PCR spécifiques vérifiées par séquençage. Cette technique de flottaison au sucrose adaptée pour cette étude a été mise au point pour l'isolement des oocystes de *T. gondii* à partir d'échantillons de sol (voir Annexe A) lors de mes travaux de recherche en master 2 dans le cadre du projet RISKJARDINS. Par la suite, les fèces de renards ont été identifiées individuellement par un protocole basé sur l'amplification de copro-ADN cible à l'aide de 14 microsatellites et un marqueur de sexe spécifique au renard roux (*Vulpes vulpes*). Nous avons suivi ainsi les individus sur les trois années de l'étude à travers leurs dépôts fécaux.

3. Résultats principaux

Les distributions spatiales des fèces des trois HD s'étaient avérées être chevauchantes avec notamment celles de chiens plus importantes au centre du site, donc plus proches des habitations humaines et celles des renards déposées aussi bien à l'extérieur qu'à l'intérieur du village. Les œufs d'*E. multilocularis* ont été détectés en majorité dans les fèces de renards (27 sur 70 fèces positives pour l'ADN du parasite) contre 1 sur 15 pour les chiens et 1 sur 5 pour les chats. Similairement aux fèces positives pour l'ADN du parasite, la contamination environnementale par les œufs d'*E. multilocularis* via les fèces de renards était démontrée hétérogène et agrégée significativement dans un cluster localisé au centre-est du site d'étude. Par ailleurs, au terme des trois années de l'étude, seulement quelques renards – près de 35% (9/26) des individus infectés – avaient déposé une proportion majoritaire des fèces testées positives pour *E. multilocularis* (soit 60%).

4. Assessment of the exposure to *Echinococcus multilocularis* associated with carnivore faeces using qPCR and flotation technique assays

Abdou Malik Da Silva^a, Sandra Courquet^{a,b}, Francis Raoul^a, Dominique Rieffel^a, Patrick Giraudoux^a, Laurence Millon^{a,b} and Jenny Knapp^{a,b}

^a Chrono-Environnement, UMR UBFC/CNRS 6249, University of Bourgogne Franche-Comté, 25030 Besançon, France

^b Department of Parasitology-Mycology, University Hospital of Besançon, 25030 Besançon, France

International Journal for Parasitology 50, 1195–1204 (2020).

DOI: [org/10.1016/j.ijpara.2020.07.008](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.07.008)

International Journal for Parasitology 50 (2020) 1195–1204



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal for Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpara



Assessment of the exposure to *Echinococcus multilocularis* associated with carnivore faeces using real-time quantitative PCR and flotation technique assays



Abdou Malik Da Silva^a, Sandra Courquet^{a,b}, Francis Raoul^a, Dominique Rieffel^a, Patrick Giraudoux^a, Laurence Millon^{a,b}, Jenny Knapp^{a,b,*}

^a Chrono-Environnement, UMR UBFC/CNRS 6249, University of Bourgogne Franche-Comté, 25030 Besançon, France

^b Department of Parasitology-Mycology, University Hospital of Besançon, 25030 Besançon, France

Abstract:

The eggs of *Echinococcus multilocularis*, the infectious stage, are spread into the environment through wild and domestic carnivore faeces. The spatial location of the faeces containing infective *E. multilocularis* eggs is a key parameter for studying areas of exposure and understanding the transmission processes to the intermediate hosts and humans. *E. multilocularis* faecal prevalence is often assessed by detecting *E. multilocularis* DNA, not necessarily eggs. This work aimed to determine the rate of faeces containing *E. multilocularis* eggs in a rural town and its surroundings and known if this level of precision is relevant to assess the exposure to *E. multilocularis*. For this purpose, we developed a combined molecular and microscopic approach to investigate the *E. multilocularis* exposure of potential hosts into the environment from field-collected carnivore faeces. Carnivore defecation patterns were then spatialized to study the spatial distribution of *E. multilocularis*. Faeces were screened for *E. multilocularis* DNA using a specific qPCR. *E. multilocularis* eggs were morphologically identified from specific *E. multilocularis* qPCR-positive faeces after sucrose flotation and individually confirmed through specific PCR and sequencing. The spatial distribution of *E. multilocularis* was studied using Kulldorff statistics. *E. multilocularis* eggs were identified mostly in fox faeces positive for *E. multilocularis* DNA by qPCR (n=27/70) and only from 1 on 15 copro-samples from dogs and 1 on 5 from cats. The faecal prevalence of *E. multilocularis* DNA and egg was overdispersed, with the same geographical patterns. These data suggest that *E. multilocularis* DNA and/or egg detection in carnivore faeces mainly that of foxes, is appropriate in ecological studies of *E. multilocularis* transmission.

Keywords:

Echinococcus multilocularis, egg, definitive host, copro-qPCR diagnostic, flotation, spatial distribution.

4.1. Introduction

The larval stage of the cestode *Echinococcus multilocularis* is responsible for alveolar echinococcosis (AE), an expanding potentially lethal zoonosis that occurs only in the northern hemisphere, including large areas of Asia, Europe, and North America (Deplazes et al. 2017). The lifecycle is mainly sylvatic based on predator-prey interaction between wild and domestic carnivores, acting as definitive hosts, and small rodents as intermediate hosts. The adult worms live in the small intestine of carnivores and produce the infectious form at sexual maturity, the egg, eliminated in the environment with faeces during the patent period. The development of the larval stage of the parasite following the ingestion of the eggs causes AE in humans. In Europe, *E. multilocularis* eggs have only rarely been identified in dog and cat faeces (Dyachenko et al., 2008; Deplazes et al., 2011; Umhang et al., 2012, 2014, 2015; Knapp et al., 2016a). The red fox (*Vulpes vulpes*) has been identified as the main definitive host of *E. multilocularis*, in which the parasite has experimentally shown a high reproduction rate and high biotic potential, whereas domestic carnivores, notably the cat, likely excrete few or no eggs (Kapel et al., 2006; Hegglin and Deplazes, 2013; Umhang et al., 2015; Knapp et al., 2018).

The use of carnivore stools in ecological investigations on *E. multilocularis* transmission seems appropriate, as stool contamination is representative of environmental contamination by the infectious form of the parasite and it is the source of human exposure (Conraths et Deplazes 2015; Knapp et al. 2018). In addition, the spatial location of the faeces containing infective *E. multilocularis* eggs is a key parameter for studying areas of risk and understanding the transmission processes to the intermediate hosts and humans to propose appropriate prevention or control measures (Knapp et al., 2018). Moreover, the analysis of faecal samples is a non-invasive approach, allowing the preservation of animal populations, essential when studying pets and ethically more acceptable for wild animals.

The spatial distribution of carnivore faeces and the *E. multilocularis* prevalence appear heterogeneous and aggregate in micro-foci over large areas, including historically and newly endemic rural and urban sites. The reasons are in part linked to the defecation behaviour of the definitive hosts. For instance, micro-local hotspots of high *E. multilocularis* prevalence in fox faeces were detected in different rural situations in a study carried out in an eastern region of France (Knapp et al., 2018). Moreover, at a local level, *E. multilocularis* positive faeces were found in 19/94 sampled kitchen gardens studied (Pouille et al., 2017). In a North American urban setting, *E. multilocularis* prevalence in the faeces of coyotes varied significantly across the study area (Liccioli et al., 2014). In a rural context in China, *E. multilocularis* environmental

contamination via dog faeces was focused where dogs defecated inside villages (Vaniscotte et al., 2011). Given the close proximity of humans and the main definitive host of *E. multilocularis* in rural settings, this environmental overdispersal can potentially represent a major public health importance. However, *E. multilocularis* prevalence is often assessed by detecting *E. multilocularis* DNA, not necessarily eggs. Furthermore, the sporadic copro-sample collection may lead to failure to detect the parasite and a misestimation of environmental contamination by *E. multilocularis* via carnivore faeces.

The development and optimization of multiplex real-time PCR techniques based on the amplification of specific mitochondrial DNA targets has resulted in the very sensitive and rapid detection of host species and zoonotic parasites such as *E. multilocularis* in faeces collected from the environment (Farrell et al., 2000; Nonaka et al., 2009; Knapp et al., 2014, 2016b). Molecular tools (PCR or qPCR) detect the genetic material in faeces not only from eggs but also from cells or tissue fragments shed by the worm present in the digestive tract of the infected animal (Al-Sabi' et al., 2007) and other traces of the parasite in transit. The feeding behaviour and coprophagia common in certain carnivore species, such as dogs, may explain the innocuous passage of parasitic elements, and thus the detection of parasitic DNA, in the digestive system of these animals (Frenkel and Parker, 1996; Fahrion et al., 2011; Nijssse et al., 2015). *E. multilocularis* DNA may also originate directly from the digested metacestode due to predation of infected rodents (Umhang et al., 2015). These events can all potentially lead to overestimation, to an unknown extent, of the parasitic prevalence in faeces by molecular detection techniques. Thus, the detection of eggs in stool material is still a key step in the assessment of hosts' exposure into the environment.

Eggs may be concentrated by flotation techniques and identified at the family level (Taeniidae) based on their morphological characteristics (Mathis et al. 1996; Dryden et al. 2005) and PCR on isolated egg DNA remains the method of choice for the species-level diagnosis (Gasser et al., 1993).

This work aimed to determine the rate of faeces containing *E. multilocularis* eggs in a rural town and its surroundings and known if this level of precision is relevant to assess the exposure to *E. multilocularis* of the intermediate hosts. For this purpose, we collected periodically carnivore faeces in order to obtain suitable samples for parasite detection. We developed a combined molecular and microscopic approach to investigate the *E. multilocularis* exposure of potential hosts into the environment from field-collected carnivore faeces. This strategy is first based on the screening of *E. multilocularis* DNA in faeces, using quantitative real-time PCR

(qPCR) and then the identification of *E. multilocularis* eggs in positive qPCR samples by a flotation technique, confirmed by specific PCR. Then, carnivore defecation patterns were spatialized to compare the local distribution of *E. multilocularis* DNA and eggs in contaminated faeces.

4.2. Materials and methods

4.2.1. Copro-sampling

Faeces were collected every two months between March 2017 and November 2018 in a village and its surroundings in the Eastern part of France (006°26'46"E, 46°56'53"N), in order to regularly obtain fresh materials. This site was located in a historic endemic area of *E. multilocularis* (Combes et al., 2012; Piarroux et al., 2013, 2015). The studied area has a surface of 5.28 km², with a density of 25 inhabitants per km², and is located at an average altitude of 971 m in a predominantly agricultural landscape in which the proportion of permanent grassland to total land is 52% (See the 2010 General Agriculture Census (RGA) from the Ministry of Agriculture). It enjoys a continental climate, with long, cold, snowy winters. Average temperatures range from -2.2 to 15.1°C with average rainfall of 1,317 mm/year (www.meteofrance.com). All sampled carnivore faeces were collected from the study area access roads within the administrative limits (along a predetermined circuit of 25 km, **Figure 14**). Fox, dog, cat, mustelid or undetermined faeces were initially identified in the field by observing their physical characteristics (shape, size, composition). All faeces sampled were geolocated with a Global Positioning System (GPS) tracking device, with a precision of ± 10 m. Those were collected in an individual plastic bags and were stored for seven days at – 80°C for decontamination to prevent human infection, and then at – 20°C before laboratory analyses.

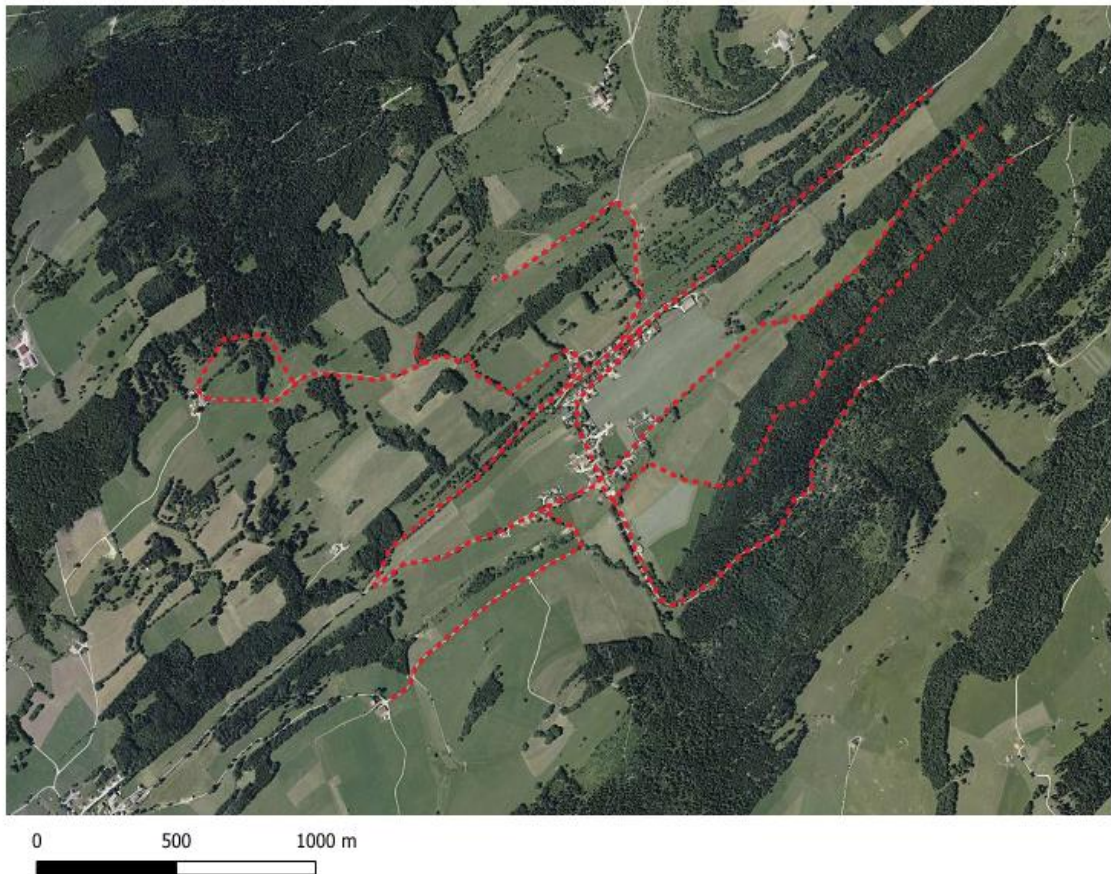


Figure 14: The predetermined circuit (red dash) of carnivore faeces collection on the study site (a rural town in the eastern part of France (006°26'46"E, 46°56'53"N)).

4.2.2. Faeces DNA extraction and qPCR protocols for carnivore host faecal test and *E. multilocularis* diagnostic tests

Faeces DNA was extracted from a 0.5 g sample (Knapp et al., 2014) and purified using the QIAmp Fast DNA Stool Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's recommendations, performed on a QIAcube automaton (Qiagen, Hilden, Germany), a robotic workstation for automated purification of DNA.

A host faecal qPCR test was performed on the copro-DNA to identify the carnivore host. The test was carried out as described above and was based on amplification of a fragment of the *cytB* gene for *Vulpes vulpes* (fox), *Canis familiaris* (dog), and *Felis catus* (cat) (Knapp et al., 2016b). This molecular identification of host species used as reference was compared to the identification from morphological criteria (described above) in order to verify the accuracy of faecal identification in the field.

DNA extracts were tested in a specific *E. multilocularis*-qPCR for the presence of *E. multilocularis* DNA in duplicate based on the amplification of a portion of the mitochondrial *rrnL* gene (Knapp et al., 2014, 2016b) (*rrn-E. multilocularis* forward primer 5'-CTGTGATCTTGGTGTAGTAGTTGAGATTT-3', *rrn-E. multilocularis* reverse primer 5'-GGGGTCAATCACAACAACCC-3', *rrn-E. multilocularis* probe 5'-FAM-TGGTCTGTTCGACCTTTTTAGCCTCCAT-TAMRA -3') for PCR products of 202 bp.

The presence of inhibitory factors were tested in the two previous qPCRs using the Alea qPCR control tool (Alea forward primer 5'-CCTAAAAATGTCTATGATTGGTCCACTA-3', Alea reverse primer 5'-GGGAGTACCTTGCCATACAAAATT-3', Alea probe 5'-VIC-TTAAATCAACTCCTAAATCCGCGCGATAGG-TAMRA-3') at a concentration of 6.10^{-6} ng/ μ l, corresponding to 1,000 plasmid copies/ μ l of the internal control (Knapp et al., 2016b).

DNA-free extraction controls (extraction from only kit reagents), PCR positive (DNA extracts from *E. multilocularis* worms) and negative (ultra-pure water instead of DNA extract) controls were used to ensure no contamination during the DNA extraction and the qPCR steps.

The qPCRs were performed for 45 cycles and reactions with Cq < 45 cycles were considered to be positive for *E. multilocularis*-qPCR and Cq < 30 for the species detected among the three targeted carnivore species in the faecal qPCR. The presence of PCR inhibitors was noted on the basis of the duplex *E. multilocularis* /Alea qPCR results, considering a Cq > 37 as the threshold beyond which the PCR inhibitors interfered with the PCR process (Knapp et al., 2016b). All samples were tested in duplicate by qPCR.

4.2.3. Isolation of parasite eggs from faeces

All positive faeces from the specific *E. multilocularis*-qPCR screening and a portion of randomly selected negative faeces, as controls, (n = 25) were subjected to a sucrose flotation technique as described in Matsuo and Kamiya (2005) and Escotte-Binet *et al.* (2019) to concentrate and isolate the parasite eggs, based on differential specific gravity (SG) between the eggs and particles. Briefly, the protocol consists of dispersing 5 g of faeces in 20 ml 0.1% Tween 80 by vortexing to separate the eggs from the organic particles. After a centrifugation step (2,500 x g, 10 min), the pellet is resuspended in distilled water and deposited on a sucrose solution (SG = 1.27) to float the eggs. Then the supernatant is concentrated in a volume of < 1 ml after centrifugation.

4.2.4. Microscopic observation and sampling of *E. multilocularis* eggs one by one

All flotation supernatants were examined using a Leica DMI3000-B micromanipulator (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with an inverted microscope to identify taeniid eggs at a 400X magnification. The observed taeniid eggs were picked one by one with micropipettes integrated into the micromanipulator and put in approximately 100 µl distilled water in individual microtubes. For each positive flotation sample, DNA from up to five individual taeniid eggs was extracted using the QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) in an elution volume of 50 µl following the manufacturer's instructions. However, the lysis step was extended from 1-3 h to overnight. The resulting DNA was used to confirm the *E. multilocularis* egg identification by two PCRs: the specific *E. multilocularis*-qPCR described above and the *E. multilocularis*-specific-PCR EMH15/H17, confirmed by electrophoresis. *E. multilocularis*-specific-PCR EMH15/H17 is based on the amplification of a portion of the mitochondrial 12S rRNA gene (Dinkel et al., 1998; Stieger et al., 2002; Georges et al., 2004) (EM-H15, forward primer: 5'-CCATATTACAACAATATTCCTATC-3', EM-H17, reverse primer: 5'-GTGAGTGATTCTTGTTAGGGGAAG-3') for an expected size of the PCR products of 200 bp. Then, several PCR products (n = 6) were randomly selected and sequenced by the Sanger method to confirm the *E. multilocularis* diagnosis (Sanger et al., 1992). The nucleotide sequences obtained were characterized by comparison with an *E. multilocularis* nucleotide sequence reference on GenBank using the online genetic databases and the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) available on the NCBI website.

In addition, for each negative flotation sample, the supernatants were extracted and subjected to specific *E. multilocularis*-qPCR to confirm the microscopic observations (see **Figure 15** for a synopsis of the complete protocol).

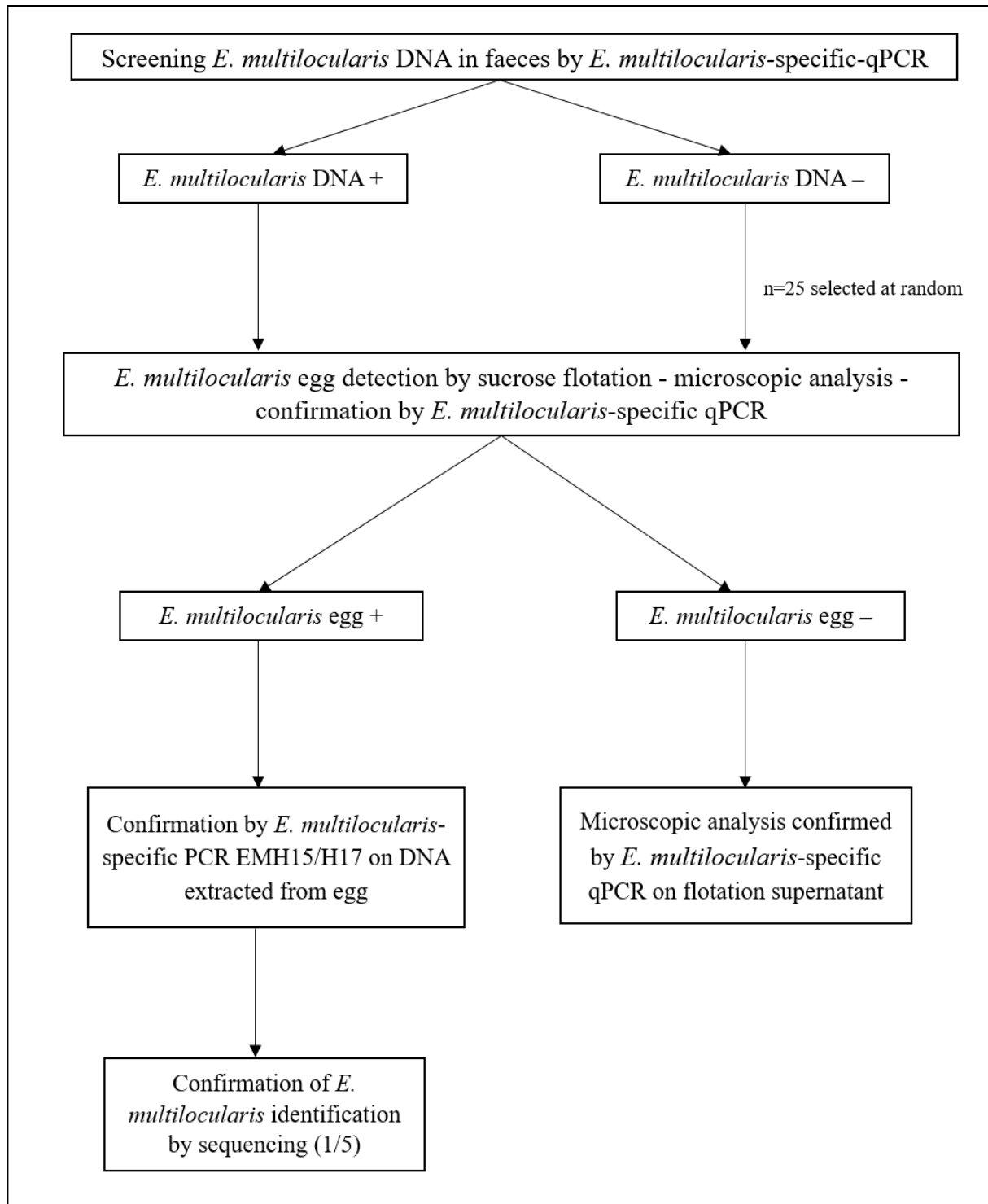


Figure 15 : Workflow of *E. multilocularis* DNA and egg detection in carnivore faeces. Screening and flotation were performed using 0.5 and 5 g of faeces, respectively.

4.2.5. Determination of flotation technique sensitivity

The effectiveness of the sucrose flotation technique followed by microscopic observation and detection with specific *E. multilocularis*-qPCR (described above) was evaluated by testing in duplicate series of faecal free-*E. multilocularis* DNA samples (5g) spiked with 10 *E. multilocularis* eggs (n=3), five *E. multilocularis* eggs (n=3), three *E. multilocularis* eggs (n=3) and one *E. multilocularis* egg (n=3). These spiked samples were frozen at -80°C for 7 days, before testing. The faecal samples were obtained from the colon of captive foxes exhibiting no worms of the *Taenia* genus nor *E. multilocularis* at the experimental station of the ANSES laboratory. *E. multilocularis* eggs were obtained from a faecal sample from the colon of a naturally infected fox and confirmed with specific *E. multilocularis*-qPCR.

4.2.6. Statistical and spatial data analysis

E. multilocularis faecal prevalence between the various carnivore species was compared using the Fisher's exact test. The non-parametric Mann-Whitney U Test was used to compare the Cq values between *E. multilocularis*-qPCR positive faeces, with or without *E. multilocularis* eggs detected. ROC curve analysis was used to estimate the ability of the specific *E. multilocularis*-qPCR (*E. multilocularis* DNA screening in faeces) to differentiate faeces containing *E. multilocularis* eggs or not. An optimal threshold value was determined by maximizing the Youden index. Faeces with a Cq higher than the optimal threshold value are classified as *E. multilocularis* eggs negative, whereas samples with Cq lower than the optimal threshold value are classified as *E. multilocularis* eggs positive (Fluss et al., 2005). ROC, area under ROC curve (AUC) and the optimal threshold value were calculated using the *pROC* R package (Robin et al., 2011).

For statistical tests, differences were considered significant for $p \leq 0.05$.

The spatial distributions of carnivore faeces and *E. multilocularis* faecal occurrence were mapped on orthophotos (BD Ortho version 2 of the 'Institut Géographique National' with a 50 cm resolution as background).

The randomness of the distribution of the *E. multilocularis* faecal prevalence was tested using a spatial scan statistic developed by Kulldorff and implemented in SatScan v9.6 software (Kulldorff and Nagarwalla, 1995). We tested the null hypothesis that the number of faeces containing *E. multilocularis* DNA or eggs follows a binomial distribution along the

predetermined circuit. In SatScan, we used the Bernoulli Model with the cases defined as faeces were found to contain *E. multilocularis* DNA or eggs and the controls as negative faeces. Kulldorff's method places a circular window on the map and moves the circle centre over each point location so that the window includes different sets of neighbouring points at different positions. At each point location, the radius of the circle increases continuously from zero to a maximum radius, defined by the user and defaulted in this study to a radius containing at most 50% of the total number of points. Potential clusters were detected by calculating a likelihood ratio for each circle, comparing an expected number of cases (under the null hypothesis) with the observed number of cases in and outside the window. The most likely cluster is the circle with the maximum likelihood ratio among all radius circles at all possible locations.

Computations were performed and graphical displays were generated using R 3.5.1 (R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org>) with the packages foreign 0.8-70 (R Core Team (2017). Foreign: Read Data Stored by 'Minitab', 'S', 'SAS', 'SPSS', 'Stata', 'Systat', 'Weka', 'dBase',...URL <https://CRAN.R-project.org/package=foreign>), rgdal 1.3-9 (Bivand et al., 2019) and the geographical information system Quantum GIS 3.2.3-Bonn (QGIS Development Team, 2018. QGIS Geographic Information System. <http://www.qgis.com>). Kulldorff's statistics were computed using SatScan v9.6 March 2018 (<https://www.satscan.org>).

4.2.7. Data accessibility

Raw data are available in Mendeley Data, DOI: <https://dx.doi.org/10.17632/bhzccxfy9c.3>.

4.3. Results

4.3.1. Host species identity of faeces collected in the field

We collected 814 faeces from March 2017 to November 2018. In total, 763 faeces (93.7% of the sampling) were identified by the host faecal qPCR test, including 278 fox faeces (34.15%), 431 dog faeces (52.95%), and 54 cat faeces (6.63%).

The morphological assessment made on fox, dog and cat faeces was confirmed by species qPCRs for 68%, 86% and 52% of the copro-samples, respectively (**Table 1**). For mustelid faeces identified on morphological criteria, 56% and 28% of samples were reassigned to fox

and dog stools, respectively, by molecular analysis. Most of the undetermined faeces in the field were identified by molecular assessment (87.5%).

The host faecal test was unsuccessful for 51 faeces for which identification was made based on morphological criteria. This concerned 31 fox, 14 dog, one cat, four mustelid, and one undetermined stools (**Table 1**).

Table 1 : Comparison between faeces identification based on morphological criteria (shape, size, and composition) and faeces identification on molecular analysis (by specific species qPCRs).

Morphological identification	Molecular identification				Total
	Fox	Dog	Cat	Undetermined	
Fox	220 (68.3%)	39 (12.1%)	32 (10.0%)	31 (9.6%)	322
Dog	38 (8.7%)	374 (85.8%)	10 (2.3%)	14 (3.2%)	436
Cat	5 (21.7%)	5 (21.7%)	12 (52.2%)	1 (4.4%)	23
Mustelids	14 (56.0%)	7 (28.0%)	0 (0.0%)	4 (16.0%)	25
Undetermined	1 (12.5%)	6 (75.0%)	0 (0.0%)	1 (12.5%)	8
Total	278	431	54	51	814

Only four samples (0.5% of all samples analysed) contained PCR inhibitors based on duplex *E. multilocularis*/Alea qPCR results.

4.3.2. *Echinococcus multilocularis* in carnivore hosts

4.3.2.1. Validation of the sucrose flotation protocol for frozen *Echinococcus multilocularis* eggs

When testing naive frozen copro-samples of 5 g spiked with 10 *E. multilocularis* eggs, a microscopic observation and a positive *E. multilocularis*-qPCR signal were obtained for all samples after the sucrose flotation technique, corresponding to 100% sensitivity (**Table 2**). Average Cq values ranged from 30.73 ±0.08 for 10 eggs to 37.72±0.16 for one egg. When using five eggs to one egg, sensitivity decreased from 66.7% to 33.3% for *E. multilocularis*-qPCR.

Table 2 : Method sensitivities (in %) of the sucrose flotation technique combined with microscopic observation and detection by specific *E. multilocularis*-qPCR for *Echinococcus multilocularis* in freezing copro-samples (5 g). For each number of *Echinococcus multilocularis* eggs, three samples were used.

Number of eggs	Microscopic observation	qPCR <i>E. multilocularis</i>
0	-	00.0% (0/3)
1	00.0% (0/3)	33.3% (1/3)
3	00.0% (0/3)	33.3% (1/3)
5	33.3% (1/3)	66.7% (2/3)
10	100.0% (3/3)	100.0% (3/3)

4.3.2.2. *Echinococcus multilocularis* DNA and egg prevalence in carnivore faeces

We detected *E. multilocularis* DNA in 96 faeces samples (11.8% of the collection, 95% Confidence interval (CI): 9.7-14.3%). *E. multilocularis* DNA was detected significantly more frequently in fox faeces (25.2% CI: 20.3-30.8%) than cat faeces (9.3% CI: 3.5-21.1%) or dog faeces (3.5% CI: 2.0-5.8%) (**Table 3**, Fisher's exact test, $p < 0.0001$).

Among the 96 carnivore faeces containing *E. multilocularis* DNA, 32 (33.3%) were found to contain *E. multilocularis* eggs, based on the sucrose flotation technique. The identification of *E. multilocularis* was confirmed by specific *E. multilocularis*-qPCR performed on DNA extracts from five individual taeniid eggs isolated from each flotation-positive faecal sample, for which between one and five were positive, with a mean Cq of 34.2 ± 1.46 ($n = 52$). All selected PCR EMH15/H17 products ($n = 6$, PCR EMH15/H17 positive from *E. multilocularis* eggs isolated from one dog, one cat, one undetermined host, and three fox stools) were confirmed to be *E. multilocularis*, with 100% identity to the *E. multilocularis* reference sequence (GenBank accession number **MK116545.1**).

Eggs were observed mostly in fox faeces ($n = 27/70$), one of five cat faeces, one of 15 dog faeces, and three of six host faecal qPCR undetermined faeces (**Table 3**, Fisher's exact test, $p < 0.0001$). These three faeces were identified morphologically as two fox and one dog stool.

All selected *E. multilocularis*-qPCR negative faeces (n = 25) did not contain *E. multilocularis* eggs, as their flotation supernatants were also negative by *E. multilocularis*-qPCR, except for one sample that had an average Cq of 37.34.

Table 3 : Detection of *E. multilocularis* DNA and eggs in carnivore host faecal samples collected between March 2017 and November 2018 in a rural town in the eastern part of France.

Host identification	Fox	Dog	Cat	Undetermined	Total
Total sampled	278	431	54	51	814
qPCR <i>E. multilocularis</i>					
(number of positive samples)	70	15	5	6	96
Prevalence %	25.2	3.5	9.3	11.7	11.8
95% CI	(20.3-30.8)	(2.0-5.8)	(3.5-21.1)	(4.9-24.6)	(9.7-14.3)
<i>E. multilocularis</i> egg-positive samples	27	1	1	3	32

4.3.3. Relationship between the *Echinococcus multilocularis* specific-qPCR for *Echinococcus multilocularis* egg-positive and egg-negative faeces

Comparison of the Cq values obtained from specific *E. multilocularis*-qPCR performed on carnivore faeces showed that, among positive faeces, the median Cq of the faeces not containing *E. multilocularis* eggs was higher than that of the faeces containing *E. multilocularis* eggs: 38.92 versus 36.9. The distributions of Cq values between *E. multilocularis*-qPCR positive faeces with or without *E. multilocularis* eggs differed significantly (**Figure 16A**, non-parametric Mann-Whitney test, W= 1511, $p < 0.001$). All but two faecal samples with a Cq less than 33.62 had taeniid eggs observed under a microscope, confirmed *E. multilocularis* by specific *E. multilocularis* qPCR and PCR (**Figure 16A**). However, the ROC curve showed that the Cq values had only a weak ability to differentiate samples containing *E. multilocularis* eggs and those without (AUC = 0.73, 95%CI: 0.614-0.847). Beyond the optimal threshold Cq of

38.36, corresponding to a sensitivity of 81% (95%CI: 66-94%) and a specificity of 69% (95%CI: 58-80%), most of the samples were negative by flotation (88%) (**Figure 16B**).

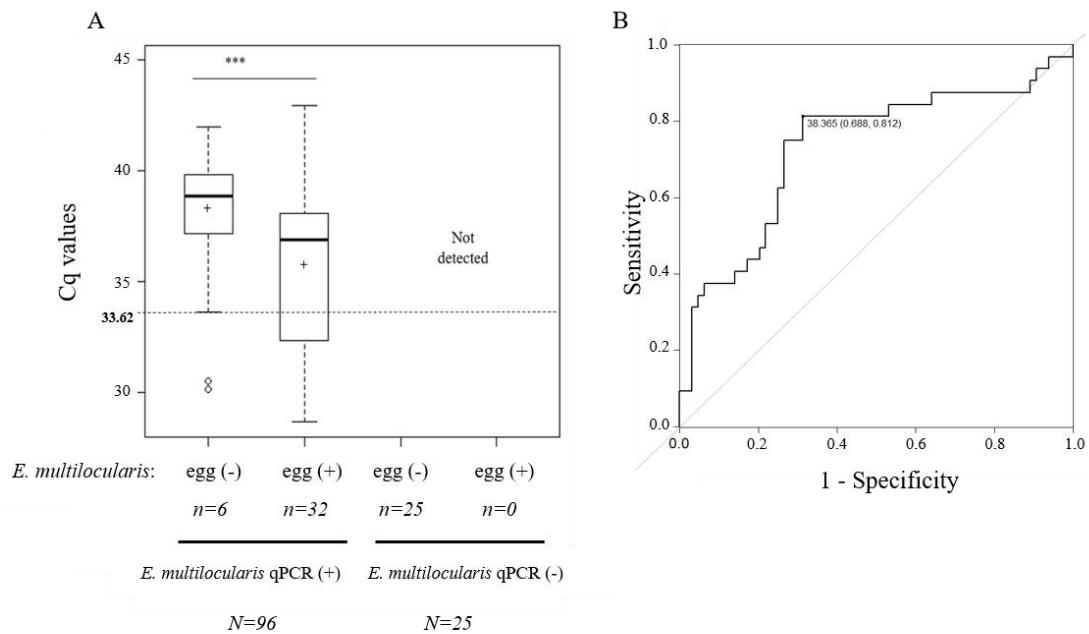


Figure 16 : Relationship between Cq values obtained from specific *E. multilocularis*-qPCR (*E. multilocularis*-qPCR) performed on carnivore faeces containing *E. multilocularis* eggs (*E. multilocularis* egg (+)) or not (*E. multilocularis* egg (-)).

(A) Distribution of faeces containing *E. multilocularis* eggs, or not, according to the Cq values of specific *E. multilocularis*-qPCR.

N, n: sample size. Boxes represent the inter-quartile distances; thick lines, the medians; whiskers, the extremes values; crosses, the means; and circles, outliers. Statistical significance was determined using the non-parametric Mann-Whitney U Test. *** $p = 0.001$

(B) ROC curve of the specific *E. multilocularis*-qPCR Cq values to predict the presence/absence of *E. multilocularis* eggs (AUC = 0.73). Optimal threshold by the Youden index Cq = 38.365, corresponding to a sensitivity of 81% (95%CI: 66-94%) and a specificity of 69% (95%CI: 58-80%).

4.3.4. Spatial distribution of *Echinococcus multilocularis* DNA and eggs via carnivore faeces

Domestic carnivore faeces (in particular, dog) were more prominent downtown than outside the village (**Figure 17C**). Fox faeces were mostly found outside the village but some were also found inside (**Figure 17B**).

Kulldorff's statistics showed two significant spatial clusters for *E. multilocularis* DNA-positive faeces and *E. multilocularis* egg-positive faeces for all carnivores pooled, located in the same areas in both cases. The *E. multilocularis* DNA faecal prevalence was clearly overdispersed, with a high-rate cluster ($p = 1.4 \times 10^{-6}$) located in the western part of the site but near the centre and a low-rate cluster ($p = 0.02$) in the eastern part (**Figure 17Aa**). The faecal prevalence of *E. multilocularis* eggs showed significant clusters (high rate: $p = 10^{-9}$, low rate: $p = 4.75 \times 10^{-3}$) with the same geographical situations as those for *E. multilocularis* DNA faecal prevalence (**Figure 17Ab** and **Figure 17Aa**). For fox, *E. multilocularis* DNA-positive faeces (high rate: $p = 0.01$, low rate: $p = 0.02$) and *E. multilocularis* egg-positive faeces (high rate: $p = 0.002$, low rate: $p = 0.01$) were also aggregated (**Figure 17Ba** and **Figure 17Bb**). *E. multilocularis* contamination in domestic carnivores was not found to be clustered, likely due to the low number of positive samples (**Figure 17C**). Contamination clusters were due to the high rate of contamination in fox faeces.

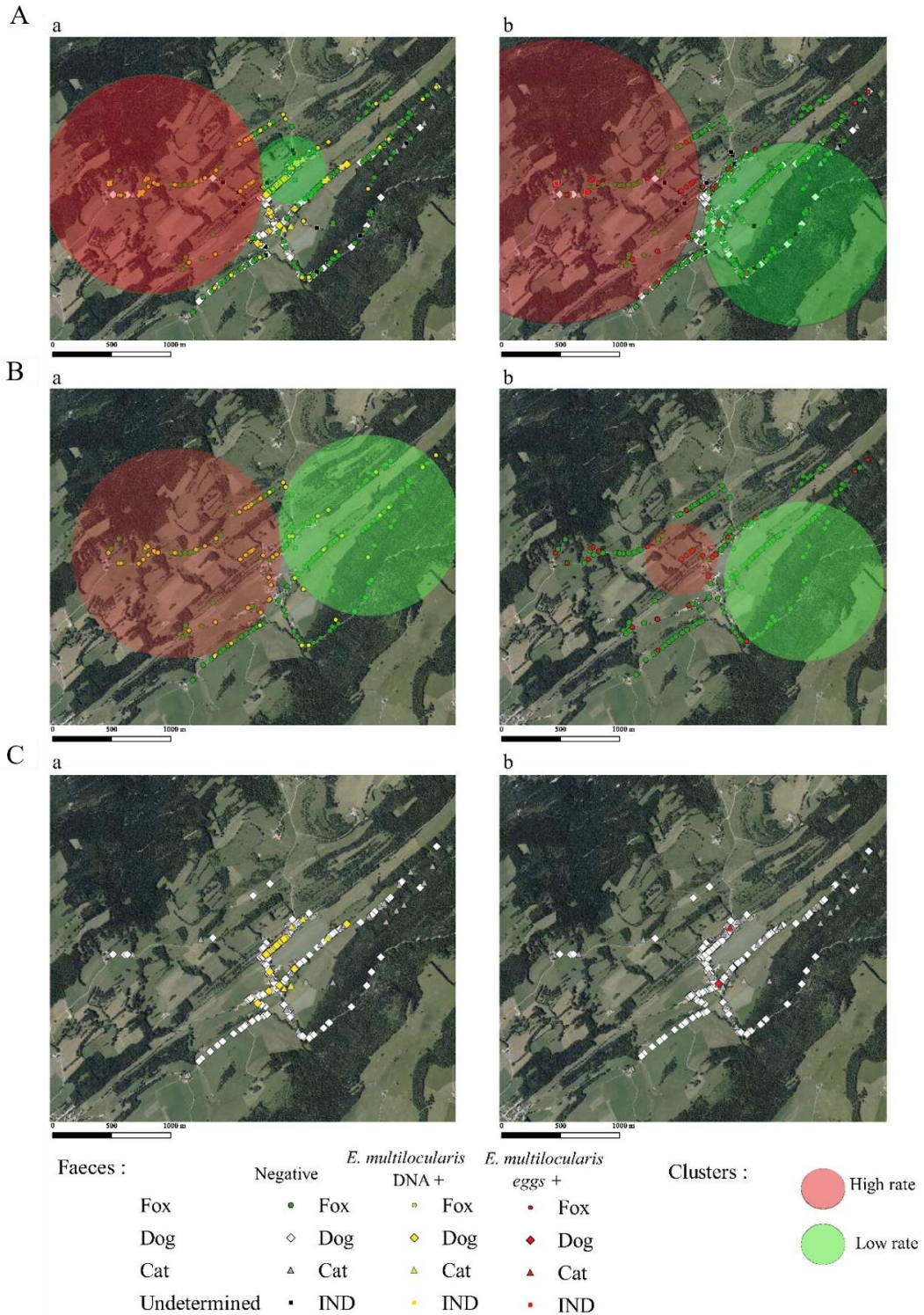


Figure 17 : Kulldorff statistics on the distribution of carnivore faeces in the studied site in France, from *E. multilocularis* DNA-positive faeces (Aa, Ba, Ca) and *E. multilocularis* egg-positive faeces (Ab, Bb, Cb). A: all carnivore faeces collected; B: fox faeces; C: dog and cat faeces.

4.4. Discussion

This study focused on collecting evidence of the *E. multilocularis* eggs in carnivore faeces in which *E. multilocularis* DNA was first detected by specific *E. multilocularis*-qPCR. The *E. multilocularis* DNA and egg detection methods are notably effective in the patent phase of infection (Al-Sabi' et al., 2007). DNA detection is possible but remains uncertain during the pre-patent and post-patent periods due to irregular excretion of tissue or eggs (Deplazes et al., 2003). Here, the *E. multilocularis*-qPCR Cq values were significantly lower for samples in which eggs were present than for flotation-negative samples, implying a larger amount of *E. multilocularis* DNA in positive *E. multilocularis*-qPCR faeces. Our results suggest that, in our protocol (DNA extraction and qPCR protocol), faeces for which the *E. multilocularis*-qPCR Cq values less than 33.62 are likely to contain *E. multilocularis* eggs. The effectiveness of the key step of DNA extraction from taeniid or *E. multilocularis* eggs using a kit with only chemical lysis was previously demonstrated (Štefanić et al., 2004; Davidson et al., 2009; Øines et al., 2014; Umhang et al., 2017). This Cq value is very close to the mean *E. multilocularis*-qPCR Cq of a DNA extract from one *E. multilocularis* egg (34.2 ± 1.46). In a previous study, the detection limit of PCR targeting mitochondrial DNA (*E. multilocularis*, *E. granulosus*, and that from single eggs of other tainiids) was estimated to be 33 copies (Trachsel et al., 2007). Conversely, no conclusion can be drawn concerning the presence/absence of *E. multilocularis* eggs in faeces with *E. multilocularis*-qPCR Cq values ranging from 33.62 to 38.36, the maximum beyond which most of the samples were negative. This maximum corresponds to a mean *E. multilocularis*-qPCR Cq of a DNA extract of faeces (500 mg) experimentally spiked with one *E. multilocularis* egg (37.6 ± 1.34) (Knapp et al., 2014). The absence of eggs in this interval could be justified by a high concentration of *E. multilocularis*-free DNA. This is probably related to random sampling bias. Indeed, the *E. multilocularis*-qPCR was performed from only 0.5 g of faeces and the flotation technique from 5 g. In cases of low-grade infection, this small subsample size would be more likely to contain no eggs. This could also explain the weak ability of the *E. multilocularis*-qPCR to differentiate samples containing *E. multilocularis* eggs and those without. The *E. multilocularis*-qPCR performed directly on carnivore faeces probably detects more *E. multilocularis*-free DNA than *E. multilocularis* eggs. It appears that flotation is necessary to assess the exposure to *E. multilocularis* associated with carnivore faeces in the environment. The sucrose flotation method combined with microscopy observation and qPCR detection used in this study proved to have sensitivity of 100% for the detection of 10 *E. multilocularis* eggs in 5 g of freezing copro-samples. Additionally, the

sucrose flotation method enabled the potential recovery of only one egg in 5 g of faeces. Moreover, a flotation sample with no eggs gave a mean Cq of 37.34, demonstrating the presence of trace amounts of *E. multilocularis* DNA in the supernatant. The choice of the sucrose solution was justified by its safety and neutrality on parasitic elements, which can facilitate the recognition of eggs under the microscope after flotation. For instance, zinc chloride (SG=1.42), although more effective in floating eggs, could potentially alter the structural integrity of oocysts (Escotte-Binet et al., 2019) and frozen taeniid eggs (authors, pers. obs.). It is also very hazardous to human and environmental health (National Center for Biotechnology Information. PubChem Database., 2005). On the other hand, some *E. multilocularis*-qPCR results on isolated taeniid eggs were negative, likely related to the fact that other taeniid species can be found in carnivore intestines (Umhang et al., 2012; Li et al., 2013; Umhang et al., 2014, 2015; Karamon et al., 2019; Tylkowska et al., 2019). The individual isolation of eggs offers the possibility to non-invasively study the genetic diversity of the parasite in the same carnivore host faeces using the tandemly repeated microsatellite marker EmsB (Bart et al., 2006; Knapp et al., 2007, 2009; Umhang et al., 2014; Valot et al., 2015) and avoiding complex analysis of egg or DNA pools (Carlsgart et al., 2008).

The use of specific species qPCRs made it possible to identify the carnivore species for 763 of the 814 faeces samples collected, for a success rate of 93.7%. According to this molecular method, dog and fox faeces were better identified in the field than cat and mustelid faeces. Our results indicate that morphological identification of copro-material remains uncertain. Confirmation by a molecular reference technique is advisable to understand the relative contribution of each definitive species to the environmental contamination (Pouille et al., 2017; Knapp et al., 2018). Only 0.5% of all analysed samples contained PCR inhibitor agents. Knapp et al. (2018) reported a similar success rate (94.3%) but a higher rate of faeces containing inhibitors (9.7%). In our study, the frequent sampling of faeces probably allowed us to obtain fresher samples, less subject to environmental hazards and DNA degradation than copro-samples obtained by sporadic collection (Kovach et al., 2003; Nonaka et al., 2009). Improved sampling conditions and the use of specific kits for DNA extraction reduce the presence of PCR inhibitors and thus increase the sensitivity and specificity of qPCR methods for species identification from stools (Al-Sabi' et al., 2007; Knapp et al., 2014).

More than half of the faeces collected among domestic carnivores were from dogs versus only 7% for cats. These faeces were found mostly in the centre of the village near houses. Fox faeces accounted for 1/3 of all samples and were found in the centre and surrounding area. The

presence of fox faeces in proximity to humans is not surprising, as several studies have reported that foxes approach human dwellings at night in rural areas to feed (Janko et al., 2012; Krauze-Gryz et al., 2012; Scott et al., 2014), which was especially noticed in the study site (Knapp et al., 2018). However, *E. multilocularis* DNA was detected in 25% of fox faeces (70/278) versus only 4% (15/431) of dog faeces and 9.3% (5/54) of cat faeces. This relatively high prevalence of *E. multilocularis* DNA in cat faeces was observed (4/43; 9.3%) in an endemic area in the North-Eastern part of France (Knapp et al., 2016a). This observation could be due to the small number of samples collected or a possible multiple copro-sampling of the same or few infected cats. In foxes and dogs, similar findings were reported for the same study site in 2012 and 2013 (Knapp et al., 2018). Indeed, *E. multilocularis* DNA was detected in 25.85% (61/236) of fox faeces compared to 1.46% (3/205) of dog faeces. Fox faeces collected from 94 vegetable gardens located in the northeast of France were also reported to be the most contaminated, with a rate of 35% (24/69) *versus* 11% (2/18) for dog faeces and 7% (6/86) for cat faeces (Pouille et al., 2017). In light of the reported prevalence of *E. multilocularis* DNA, these studies, as well as ours, confirm the high risk of transmission of *E. multilocularis*, associated mainly with foxes, the role of cats and dogs being considered marginal (Hegglin and Deplazes, 2013). We confirmed these hypotheses by the detection of *E. multilocularis* eggs after flotation, mainly in fox faeces in this study (27/32) and only in 1/15 of copro-samples from dogs and 1/5 from cats. Despite a low prevalence of *E. multilocularis* DNA and eggs in dog faeces, the contribution of dogs in the transmission of *E. multilocularis* to humans may be sizable because of their promiscuity with them and the presence of a large amount of dog faeces downtown the village studied (Liccioli et al., 2015a; Knapp et al., 2018). Thus, the exposure risk related to domestic carnivores has to be more carefully considered. We are planning further studies based on *in vivo* experiments in mice to assess the infectivity of *E. multilocularis* eggs originating from cat and dog faeces from our study site.

Despite the low number of faeces containing *E. multilocularis* eggs, their spatial distribution was also overdispersed in the study area, with the same hotspot as faeces detected with *E. multilocularis* DNA. Such *E. multilocularis* environmental contamination is likely to persist for several months. Indeed, *E. multilocularis* eggs can survive for over one year in cold conditions (Veit et al., 1995). Our study confirms that contamination via the definitive host faeces on a local scale is generally overdispersed (Giraudoux et al., 2002; Vaniscotte et al., 2011; Liccioli et al., 2014; Knapp et al., 2018). The activity patterns and defecation behaviour of the definitive hosts have been suggested as possible causes of such micro-local hotspots of *E. multilocularis*

transmission to intermediate hosts and humans (Robardet et al., 2011; Giraudoux et al., 2013; Raoul et al., 2015; Knapp et al., 2018). It cannot be excluded that, in the present study, only a small number of individuals deposited multiple faeces collected in the field. It is therefore possible that such spatial heterogeneity of environmental contamination by *E. multilocularis* was the consequence of very few individuals in the definitive host population (notably foxes) harbouring almost the entire parasitic biomass (Raoul et al., 2001; Fischer et al., 2005). Individual identification of collected faeces could thus allow us to know the true *E. multilocularis* prevalence in a definitive host population in a non-invasive manner and to identify the contribution of each individual to the environmental contamination (Liccioli et al., 2015b).

Our data suggest that *E. multilocularis* DNA and/or egg detection in carnivore faeces (mainly that of foxes) is appropriate in ecological studies of *E. multilocularis* transmission, as their spatial distribution presented the same characteristics. According to our results, *E. multilocularis* egg detection from positive *E. multilocularis*-qPCR samples is especially advisable to evaluate the exposition due to infected domestic animals with close contact with humans.

Acknowledgements

This work was supported by the "Zones Ateliers" network (<https://inee.cnrs.fr/fr/zones-ateliers>) and carried out in the "Zone Atelier Arc Jurassien" (<http://zaaj.univ-fcomte.fr>), France. This work was also supported by the "Région Franche-Comté" (France) through the purchase of the Leica DMI3000-B micromanipulator equipment (Grant 2013 No. 903/5110/309). We would also like to thank the "Maison des Sciences de l'Homme et de l'Environnement Claude Nicolas Ledoux" (France) for providing the Orthophotos.

Declaration of interest

None

References

- Al-Sabi', M.N.S., Kapel, C.M.O., Deplazes, P., Mathis, A., 2007. Comparative copro-diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected foxes. *Parasitol. Res.* 101, 731–736.
- Bart, J.M., Knapp, J., Gottstein, B., El-Garch, F., Giraudoux, P., Glowatzki, M.L., Berthoud, H., Maillard, S., Piarroux, R., 2006. EmsB, a tandem repeated multi-loci microsatellite, new tool to investigate the genetic diversity of *Echinococcus multilocularis*. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 6, 390–400.
- Bivand, R., Keitt, T., Rowlingson, B., Pebesma, E., Sumner, M., Hijmans, R., Rouault, E., Warmerdam, F., Ooms, J., Rundel, C., 2019. rgdal: Bindings for the “Geospatial” data abstraction library.
- Carlsgart, J., Roepstorff, A., Nejsum, P., 2008. Multiplex PCR on single unembryonated *Ascaris* (roundworm) eggs. *Parasitol. Res.* 104, 939.
- Combes, B., Comte, S., Raton, V., Raoul, F., Boué, F., Umhang, G., Favier, S., Dunoyer, C., Woronoff, N., Giraudoux, P., 2012. Westward spread of *Echinococcus multilocularis* in foxes, France, 2005–2010. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 2059–2062.
- Conraths, F.J., Deplazes, P., 2015. *Echinococcus multilocularis*: Epidemiology, surveillance and state-of-the-art diagnostics from a veterinary public health perspective. *Vet. Parasitol.* 213, 149–161.
- Davidson, R.K., Øines, Ø., Madslie, K., Mathis, A., 2009. *Echinococcus multilocularis*—adaptation of a worm egg isolation procedure coupled with a multiplex PCR assay to carry out large-scale screening of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Norway. *Parasitol. Res.* 104, 509–514.
- Deplazes, P., Dinkel, A., Mathis, A., 2003. Molecular tools for studies on the transmission biology of *Echinococcus multilocularis*. *Parasitology* 127, S53–S61.
- Deplazes, P., Rinaldi, L., Alvarez Rojas, C.A., Torgerson, P.R., Harandi, M.F., Romig, T., Antolova, D., Schurer, J.M., Lahmar, S., Cringoli, G., Magambo, J., Thompson, R.C.A., Jenkins, E.J., 2017. Global distribution of alveolar and cystic echinococcosis. *Adv. Parasitol.* 95, 315–493.
- Deplazes, P., van Knapen, F., Schweiger, A., Overgaauw, P.A.M., 2011. Role of pet dogs and cats in the transmission of helminthic zoonoses in Europe, with a focus on echinococcosis and toxocarosis. *Vet. Parasitol., Special issue: Zoonoses in a changing world* 182, 41–53.

- Dinkel, A., von Nickisch-Roseneck, M., Bilger, B., Merli, M., Lucius, R., Romig, T., 1998. Detection of *Echinococcus multilocularis* in the definitive host: coprodiagnosis by PCR as an alternative to necropsy. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1871–1876.
- Dryden, M.W., Payne, P.A., Ridley, R., Smith, V., 2005. Comparison of common fecal flotation techniques for the recovery of parasite eggs and oocysts. *Vet. Ther.* 6, 14.
- Dyachenko, V., Pantchev, N., Gawlowska, S., Vrhovec, M.G., Bauer, C., 2008. *Echinococcus multilocularis* infections in domestic dogs and cats from Germany and other European countries. *Vet. Parasitol.* 157, 244–253.
- Escotte-Binet, S., Da Silva, A.M., Cancès, B., Aubert, D., Dubey, J., La Carbona, S., Villena, I., Poulle, M.-L., 2019. A rapid and sensitive method to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in soil samples. *Vet. Parasitol.* 274, 108904.
- Fahrion, A.S., Schnyder, M., Wichert, B., Deplazes, P., 2011. *Toxocara* eggs shed by dogs and cats and their molecular and morphometric species-specific identification: is the finding of *T. cati* eggs shed by dogs of epidemiological relevance? *Vet. Parasitol.* 177, 186–189.
- Farrell, L.E., Roman, J., Sunkist, M.E., 2000. Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Mol. Ecol.* 9, 1583-1590.
- Fischer, C., Reperant, L.A., Weber, J.M., Heggin, D., Deplazes, P., 2005. *Echinococcus multilocularis* infections of rural, residential and urban foxes (*Vulpes vulpes*) in the canton of Geneva, Switzerland. *Parasite* 12, 339–346.
- Fluss, R., Faraggi, D., Reiser, B., 2005. Estimation of the Youden index and its associated cutoff Point. *Biom. J.* 47, 458–472.
- Frenkel, J.K., Parker, B.B., 1996. An apparent role of dogs in the transmission of *Toxoplasma gondii*. The probable importance of xenosmophilia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 791, 402–407.
- Gasser, R.B., Chilton, N.B., Hoste, H., Beveridge, I., 1993. Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. *Nucleic Acids Res.* 21, 2525–2526.
- Georges, S., Villard, O., Filisetti, D., Mathis, A., Marcellin, L., Hansmann, Y., Candolfi, E., 2004. Usefulness of PCR analysis for diagnosis of alveolar echinococcosis with unusual localizations: two case studies. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5954–5956.
- Giraudoux, P., Delattre, P., Takahashi, K., Raoul, F., Quere, J.P., Craig, P., Vuitton, D.A., 2002. Transmission ecology of *Echinococcus multilocularis* in wildlife: what can be learned from comparative studies and multiscale approaches? In: Craig, P.S. and Pawlowski, Z. (Eds.), *Cestode Zoonoses: Echinococcosis and Cysticercosis: An Emergent and Global*

- Problem, Nato Science Series, Sub-Series. I: Life and Behavioural Sciences. IOS Press, Amsterdam, pp. 251–266.
- Giraudoux, P., Raoul, F., Afonso, E., Ziadinov, I., Yang, Y., Li, L., Li, T., Quéré, J.-P., Feng, X., Wang, Q., Wen, H., Ito, A., Craig, P.S., 2013. Transmission ecosystems of *Echinococcus multilocularis* in China and Central Asia. *Parasitology* 140, 1655–1666.
- Hegglin, D., Deplazes, P., 2013. Control of *Echinococcus multilocularis*: strategies, feasibility and cost–benefit analyses. *Int. J. Parasitol.* 43, 327–337.
- Janko, C., Schröder, W., Linke, S., König, A., 2012. Space use and resting site selection of red foxes (*Vulpes vulpes*) living near villages and small towns in Southern Germany. *Acta Theriol. (Warsz.)* 57, 245–250.
- Kapel, C.M.O., Torgerson, P.R., Thompson, R.C.A., Deplazes, P., 2006. Reproductive potential of *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected foxes, dogs, raccoon dogs and cats. *Int. J. Parasitol.* 36, 79–86.
- Karamon, J., Sroka, J., Dąbrowska, J., Bilska-Zajac, E., Zdybel, J., Kochanowski, M., Różycki, M., Cencek, T., 2019. First report of *Echinococcus multilocularis* in cats in Poland: a monitoring study in cats and dogs from a rural area and animal shelter in a highly endemic region. *Parasit. Vectors* 12, 313.
- Knapp, J., Bart, J.-M., Giraudoux, P., Glowatzki, M.-L., Breyer, I., Raoul, F., Deplazes, P., Duscher, G., Martinek, K., Dubinsky, P., Guislain, M.-H., Cliquet, F., Romig, T., Malczewski, A., Gottstein, B., Piarroux, R., 2009. Genetic diversity of the cestode *Echinococcus multilocularis* in red foxes at a continental scale in Europe. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3.
- Knapp, J., Bart, J.M., Glowatzki, M.L., Ito, A., Gerard, S., Maillard, S., Piarroux, R., Gottstein, B., 2007. Assessment of use of microsatellite polymorphism analysis for improving spatial distribution tracking of *Echinococcus multilocularis*. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2943–2950.
- Knapp, J., Combes, B., Umhang, G., Aknouche, S., Millon, L., 2016a. Could the domestic cat play a significant role in the transmission of *Echinococcus multilocularis*? A study based on qPCR analysis of cat feces in a rural area in France. *Parasite* 23.
- Knapp, J., Giraudoux, P., Combes, B., Umhang, G., Boué, F., Said-Ali, Z., Aknouche, S., Garcia, C., Vacheyrou, M., Laboissière, A., Raton, V., Comte, S., Favier, S., Demerson, J.-M., Caillot, C., Millon, L., Raoul, F., 2018. Rural and urban distribution of wild and domestic carnivore stools in the context of *Echinococcus multilocularis* environmental exposure. *Int. J. Parasitol.* 48, 937–946.

- Knapp, J., Millon, L., Mouzon, L., Umhang, G., Raoul, F., Ali, Z.S., Combes, B., Comte, S., Gbaguidi-Haore, H., Grenouillet, F., Giraudoux, P., 2014. Real time PCR to detect the environmental faecal contamination by *Echinococcus multilocularis* from red fox stools. *Vet. Parasitol.* 201, 40–47.
- Knapp J., Umhang, G., Poulle, M.-L., Millon, L., 2016b. development of a real-time PCR for a sensitive one-step coprodiagnosis allowing both the identification of carnivore feces and the detection of *Toxocara* spp. and *Echinococcus multilocularis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 2950–2958.
- Kovach, A.I., Litvaitis, M.K., Litvaitis, J.A., 2003. Evaluation of fecal mtDNA analysis as a method to determine the geographic distribution of a rare lagomorph. *Wildl. Soc. Bull.* 1973-2006 31, 1061–1065.
- Krauze-Gryz, D., Gryz, J.B., Goszczyński, J., Chylarecki, P., Zmihorski, M., 2012. The good, the bad, and the ugly: space use and intraguild interactions among three opportunistic predators—cat (*Felis catus*), dog (*Canis lupus familiaris*), and red fox (*Vulpes vulpes*)—under human pressure. *Can. J. Zool.* 90, 1402–1413.
- Kulldorff, M., Nagarwalla, N., 1995. Spatial disease clusters: detection and inference. *Stat. Med.* 14, 799–810.
- Li, W., Guo, Z., Duo, H., Fu, Y., Peng, M., Shen, X., Tsukada, H., Irie, T., Nasu, T., Horii, Y., Nonaka, N., 2013. Survey on helminths in the small intestine of wild foxes in Qinghai, China. *J. Vet. Med. Sci.* 75, 1329–1333.
- Liccioli, S., Giraudoux, P., Deplazes, P., Massolo, A., 2015a. Wilderness in the ‘city’ revisited: different urbes shape transmission of *Echinococcus multilocularis* by altering predator and prey communities. *Trends Parasitol.* 31, 297–305.
- Liccioli, S., Kutz, S.J., Ruckstuhl, K.E., Massolo, A., 2014. Spatial heterogeneity and temporal variations in *Echinococcus multilocularis* infections in wild hosts in a North American urban setting. *Int. J. Parasitol.* 44, 457–465.
- Liccioli, S., Rogers, S., Greco, C., Kutz, S.J., Chan, F., Ruckstuhl, K.E., Massolo, A., 2015b. Assessing individual patterns of *Echinococcus multilocularis* infection in urban coyotes: non-invasive genetic sampling as an epidemiological tool. *J. Appl. Ecol.* 52, 434–442.
- Mathis, A., Deplazes, P., Eckert, J., 1996. An improved test system for PCR-based specific detection of *Echinococcus multilocularis* eggs. *J. Helminthol.* 70, 219.
- Matsuo, K., Kamiya, H., 2005. Modified sugar centrifugal flotation technique for recovering *Echinococcus multilocularis* eggs from soil. *J. Parasitol.* 91, 208–209.

- National Center for Biotechnology Information. PubChem Database., 2005. Zinc chloride, CID=5727. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Zinc-chloride#section=Safety-and-Hazards> (accessed 6.12.20).
- Nijsse, R., Mughini-Gras, L., Wagenaar, J.A., Franssen, F., Ploeger, H.W., 2015. Environmental contamination with *Toxocara* eggs: a quantitative approach to estimate the relative contributions of dogs, cats and foxes, and to assess the efficacy of advised interventions in dogs. *Parasit. Vectors* 8, 397.
- Nonaka, N., Sano, T., Inoue, T., Teresa Armua, M., Fukui, D., Katakura, K., Oku, Y., 2009. Multiplex PCR system for identifying the carnivore origins of faeces for an epidemiological study on *Echinococcus multilocularis* in Hokkaido, Japan. *Parasitol. Res.* 106, 75–83.
- Øines, Ø., Isaksson, M., Hagström, Å., Tavornpanich, S., Davidson, R.K., 2014. Laboratory assessment of sensitive molecular tools for detection of low levels of *Echinococcus multilocularis*-eggs in fox (*Vulpes vulpes*) faeces. *Parasit. Vectors* 7, 246.
- Piarroux, M., Gaudart, J., Bresson-Hadni, S., Bardonnnet, K., Faucher, B., Grenouillet, F., Knapp, J., Dumortier, J., Watelet, J., Gerard, A., Beytout, J., Abergel, A., Wallon, M., Vuitton, D.A., Piarroux, R., FrancEchino network, 2015. Landscape and climatic characteristics associated with human alveolar echinococcosis in France, 1982 to 2007. *Eurosurveillance* 20, 21118.
- Piarroux, M., Piarroux, R., Knapp, J., Bardonnnet, K., Dumortier, J., Watelet, J., Gerard, A., Beytout, J., Abergel, A., Bresson-Hadni, S., Gaudart, J., 2013. Populations at risk for alveolar echinococcosis, France. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 721–728.
- Pouille, M.-L., Bastien, M., Richard, Y., Josse-Dupuis, É., Aubert, D., Villena, I., Knapp, J., 2017. Detection of *Echinococcus multilocularis* and other foodborne parasites in fox, cat and dog faeces collected in kitchen gardens in a highly endemic area for alveolar echinococcosis. *Parasite* 24, 29.
- Raoul, F., Deplazes, P., Nonaka, N., Piarroux, R., Vuitton, D., Giraudoux, P., 2001. Assessment of the epidemiological status of *Echinococcus multilocularis* in foxes in France using ELISA coprotests on fox faeces collected in the field. *Int. J. Parasitol.* 31, 1579–1588.
- Raoul, F., Hegglin, D., Giraudoux, P., 2015. Trophic ecology, behaviour and host population dynamics in *Echinococcus multilocularis* transmission. *Vet. Parasitol.* 213, 162–171.
- Robardet, E., Giraudoux, P., Caillot, C., Augot, D., Boue, F., Barrat, J., 2011. Fox defecation behaviour in relation to spatial distribution of voles in an urbanised area: an increasing risk of transmission of *Echinococcus multilocularis*? *Int. J. Parasitol.* 41, 145–154.

- Robin, X., Turck, N., Hainard, A., Tiberti, N., Lisacek, F., Sanchez, J.-C., Müller, M., 2011. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics* 12, 77.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnol. Read. Mass* 24, 104–108.
- Scott, D.M., Berg, M.J., Tolhurst, B.A., Chauvenet, A.L.M., Smith, G.C., Neaves, K., Lochhead, J., Baker, P.J., 2014. Changes in the distribution of red foxes (*Vulpes vulpes*) in urban areas in Great Britain: findings and limitations of a media-driven nationwide survey. *PLoS ONE* 9, e99059.
- Štefanić, S., Shaikenov, B.S., Deplazes, P., Dinkel, A., Torgerson, P.R., Mathis, A., 2004. Polymerase chain reaction for detection of patent infections of *Echinococcus granulosus* (“sheep strain”) in naturally infected dogs. *Parasitol. Res.* 92, 347–351.
- Stieger, C., Heggin, D., Schwarzenbach, G., Mathis, A., Deplazes, P., 2002. Spatial and temporal aspects of urban transmission of *Echinococcus multilocularis*. *Parasitology* 124, 631–640.
- Trachsel, D., Deplazes, P., Mathis, A., 2007. Identification of taeniid eggs in the faeces from carnivores based on multiplex PCR using targets in mitochondrial DNA. *Parasitology* 134, 911–920.
- Tylkowska, A., Pilarczyk, B., Pilarczyk, R., Zyśko, M., Tomza-Marciniak, A., 2019. Presence of tapeworms (Cestoda) in Red Fox (*Vulpes Vulpes*) in North-western Poland, with particular emphasis on *Echinococcus Multilocularis*. *J. Vet. Res.* 63, 71–78.
- Umhang G., Comte, S., Raton, V., Hormaz, V., Boucher, J.-M., Favier, S., Combes, B., Boué, F., 2014. *Echinococcus multilocularis* infections in dogs from urban and peri-urban areas in France. *Parasitol. Res.* 113, 2219–2222.
- Umhang, G., Bastien, M., Renault, C., Faisse, M., Caillot, C., Boucher, J.-M., Hormaz, V., Poulle, M.-L., Boué, F., 2017. A flotation/sieving method to detect *Echinococcus multilocularis* and *Toxocara* spp. eggs in soil by real-time PCR. *Parasite* 24, 28.
- Umhang, G., Forin-Wiart, M.-A., Hormaz, V., Caillot, C., Boucher, J.-M., Poulle, M.-L., Boué, F., 2015. *Echinococcus multilocularis* detection in the intestines and feces of free-ranging domestic cats (*Felis s. catus*) and European wildcats (*Felis s. silvestris*) from northeastern France. *Vet. Parasitol.* 214, 75–79.
- Umhang, G., Knapp, J., Hormaz, V., Raoul, F., Boué, F., 2014. Using the genetics of *Echinococcus multilocularis* to trace the history of expansion from an endemic area. *Infect. Genet. Evol.* 22, 142–149.

- Umhang, G., Raton, V., Comte, S., Hormaz, V., Boucher, J.-M., Combes, B., Boué, F., 2012. *Echinococcus multilocularis* in dogs from two French endemic areas: No evidence of infection but hazardous deworming practices. *Vet. Parasitol.* 188, 301–305.
- Valot, B., Knapp, J., Umhang, G., Grenouillet, F., Millon, L., 2015. Genomic characterization of EmsB microsatellite loci in *Echinococcus multilocularis*. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 32, 338–341.
- Vaniscotte, A., Raoul, F., Poulle, M.L., Romig, T., Dinkel, A., Takahashi, K., Guislain, M.H., Moss, J., Tiaoying, L., Wang, Q., Qiu, J., Craig, P.S., Giraudoux, P., 2011. Role of dog behaviour and environmental fecal contamination in transmission of *Echinococcus multilocularis* in Tibetan communities. *Parasitology* 138, 1316–1329.
- Veit, P., Bilger, B., Schad, V., Schäfer, J., Frank, W., Lucius, R., 1995. Influence of environmental factors on the infectivity of *Echinococcus multilocularis* eggs. *Parasitology* 110, 79–86.

5. Fox coprogenetics: infection and contribution of individuals to *Echinococcus multilocularis* environmental contamination

Abdou Malik Da Silva^{a,*}, Eve Afonso^a, Francis Raoul^a, Patrick Giraudoux^a, Marina Merguey, Gérald Umhang^b, Sandra Courquet^{a,c}, Dominique Rieffel^a, Laurence Millon^{a,c} and Jenny Knapp^{a,c}

^a Chrono-Environnement, UMR UBFC/CNRS 6249, University of Bourgogne Franche-Comté, 25030 Besançon, France

^b ANSES Nancy laboratory for Rabies and Wildlife, National Reference Laboratory for *Echinococcus* spp., Wildlife Surveillance and Eco-epidemiology unit, Technopole Agricole et Vétérinaire, 54220 Malzéville, France

^c Department of Parasitology-Mycolology, University Hospital of Besançon, 25030 Besançon, France

*: Corresponding author

Phone number: +33 3 63 08 22 39

E-mail address: abdou_malik.da_silva@univ-fcomte.fr

Summary

Key parasite transmission parameters are difficult to obtain from wild animals, as they can be elusive. For *Echinococcus multilocularis*, the causative agent of alveolar echinococcosis (AE), red fox is responsible for most of the environmental contamination in Europe. Genetic copro-sampling appears to be a feasible alternative to gain information about faecal deposition of individuals. We first tested the feasibility of individual identification and sexing by obtaining reliable genotypes for 14 microsatellite and one sex loci from DNA in hair and faecal samples taken from caged red foxes of both sexes. Then, using faecal genotyping and molecular parasitological analyses, we assessed individual *E. multilocularis* prevalence and the individual contribution of foxes in *E. multilocularis* environmental contamination in an area endemic for AE in the Eastern part of France. Individual *E. multilocularis* prevalence based on genotyped faeces was compared to the global faecal prevalence. Of 386 fox faeces collected, we successfully genotyped 124/180 samples (68.9%) corresponding to 45 unique individual foxes of which 26 were associated with at least one scat tested positive for *E. multilocularis*. Individual *E. multilocularis* prevalence (57.78 %, 95% CI: 42.15 – 72.34) was significantly higher than the global faecal prevalence (20.47%, 95% CI: 16.55 – 24.84). Only approx. 35% (9/26) of infected individuals had deposited a large proportion (60%) of faeces tested positive for *E. multilocularis*. Our findings indicate that combining faecal genotyping with parasitological analyses can provide a reliable estimate of *E. multilocularis* in foxes avoiding trapping individuals. Identification of a few individuals likely to be super-spreaders for *E. multilocularis* environmental contamination is crucial to improve the understanding of parasite transmission ecology in high endemicity areas and to optimise the effectiveness of prevention and control measures in the field.

Keywords: Foxes, *Echinococcus multilocularis*, faecal genotyping, rural settings, prevalence, environmental contamination

5.1. Introduction

Wildlife parasites are increasingly studied because of their importance in the ecology of mammals (Marathe et al. 2002) and, particularly for their public health importance as zoonoses (Thompson 2013). However, understanding the transmission systems of multihost parasites require reliable estimation of key parameters such as parasite prevalence and host abundance or densities, which are difficult to obtain from wild animals (Pedersen et al. 2005, Wobeser 2007), as they can be nocturnal, secretive and wide ranging (Prugh et al. 2005, Liccioli et al. 2015).

With regard to the trophically transmitted parasite *Echinococcus multilocularis*, the causative agent of alveolar echinococcosis (AE), the life cycle is mainly sylvatic based on predator-prey interaction between wild and domestic carnivores as definitive hosts (Hegglin et al. 2015), and small rodents as intermediate hosts (Oksanen et al. 2016, Beerli et al. 2017). The red fox, *Vulpes vulpes* (order Carnivora, family Canidae) is currently the main definitive host in the Palearctic Eurasian region (Eckert and Deplazes 2004) and is responsible for most of the environmental contamination with *E. multilocularis* eggs in both rural and urban settlements in Europe (Hegglin and Deplazes 2013). Foxes are not static and known for their propensity to disperse sometimes over long distances, with spatiotemporal variation in dispersal patterns, which are determined by population density, age and sex of individuals or degree of human activity and control on their territory (Walton et al. 2017, 2018, Hagenlund et al. 2019, Zecchin et al. 2019). Juveniles foxes, significantly more infected with *E. multilocularis* worms than adults (Raoul et al. 2001, Tackmann et al. 2001, Fischer et al. 2005, Robardet et al. 2008), are likely to disperse and thus increase the risk of spreading their pathogens (Soulsbury et al. 2008, Gras et al. 2018, Gecchele et al. 2020). As a result, the fox population and the prevalence of *E. multilocularis* infection in foxes are both expanding in the endemic areas, and regions previously considered free are now infected (Torgerson and Budke 2003, Deplazes et al. 2017). Therefore, understanding the fox population structure and dynamics and reliable estimates of the parasite prevalence in this main host may help to predict the dispersal patterns of *E. multilocularis*. This may enable the design and implementation of appropriate control or prevention measures toward human exposure to the parasite.

For *E. multilocularis* detection in foxes, post-mortem diagnosis by necropsy, examination of intestinal content methods, e.g. Sedimentation and Counting Technique (SCT), Intestinal Scraping Technique (IST), Segmental Sedimentation and Counting Technique (SSCT), and

morphological identification of adult parasitic stage under microscope is considered as the gold-standard methodology (Eckert 2003, Umhang et al. 2011). However, the analysis of faecal sample for *E. multilocularis* transmission ecological surveys seems appropriate, as it reflects environmental contamination with *E. multilocularis* eggs, thus the source of intermediate host contamination and human exposure. Moreover, this is a non-invasive approach allowing the preservation of animal populations (Conraths and Deplazes 2015, Knapp et al. 2018, Da Silva et al. 2020). Moreover, approaches combining genetic identification by faecal genotyping and parasitological analysis avoid potential biases associated with parasite prevalence estimates from copro-samples of unidentified animals (Marathe et al. 2002, Zhang et al. 2011). Approaches based on host genetics allow to determine population size, dynamics and structure, such as sex ratio and genetic diversity (Prugh et al. 2005, Valière et al. 2007, Liccioli et al. 2015). Although subject to many pitfalls (e.g. genotyping errors) and higher cost (Taberlet et al. 1996, Taberlet and Luikart 1999, Valière et al. 2007), such an integrated approach was successfully introduced in coyotes in an urban setting with high *E. multilocularis* prevalence and resulted to assess key epidemiological parameters (Liccioli et al. 2015).

Echinococcus multilocularis prevalence in foxes was estimated at over 50% in French regions belonging to the historically endemic areas (Raoul et al. 2001, Combes et al. 2012). Environmental contamination by *E. multilocularis* via fox faeces is generally clustered in micro-foci with seasonal fluctuation probably due to changes in fox activity patterns and defecation behaviour (Giraudoux et al. 2002, Robardet et al. 2011, Raoul et al. 2015, Knapp et al. 2018, Da Silva et al. 2020). Specific behaviours related to the defecation of only a few individuals (for instance, faecal over-marking of territory, extensive foraging, etc.) in the local fox population may be critical for spatial aggregation of *E. multilocularis*, as the distribution of the parasite is highly heterogeneous within foxes (Raoul et al., 2001; Fischer et al., 2005). However, no previous studies have assessed the individual contribution of foxes to *E. multilocularis* environmental contamination. In fact, direct observation or trapping-based capture-mark-recapture methods are inadequate for the study of internal parasites in wild animals. Hence, non-invasive faecal genetic sampling appears to be a feasible alternative to gain information about faecal deposition of individuals and to monitor variations of individual *E. multilocularis* infection in foxes (Zhang et al. 2011, Liccioli et al. 2015).

Herein, we aimed to assess key parameters of individual *E. multilocularis* infection in red foxes within a historic endemic area of AE. Specifically, we used faecal genotyping in a capture-recapture sampling, combined with molecular parasitological analyses: i) to estimate overall

individual *E. multilocularis* prevalence in the fox population, and ii) to assess the individual contribution of foxes in *E. multilocularis* environmental contamination. To test the reliability of individual identification and sexing of foxes, we first screened and optimised amplification for 14 microsatellite loci and one sex marker from DNA extracted from hair and faecal samples from caged red foxes of both sexes. Then, the protocol developed was used to identify and to sex individual genotypes from fox faeces collected in the study area in order to estimate the population structure, dynamics (size, sex-ratio, individual turnover), and genetic variation across sampling periods.

5.2. Materials and methods

Fox sample collection for optimisation step

For the screening and optimisation step, 20 hair samples and 20 faecal samples taken in pairs from caged red foxes of both sexes ($n = 20$; 10 females, 10 males) were provided by the experimental station of the French National Reference Laboratory (NRL) at the ANSES laboratory (Atton, Meurthe-et-Moselle, France). The faecal samples were collected immediately after deposition in the animal cages. All samples were placed separately in individual sealed bags to avoid cross-contamination between samples and were frozen at -20°C until laboratory analyses.

Study area and field sampling

This study was conducted from March 2017 to January 2020 in an area of 318 ha of grassland mostly including Les Alliés village ($006^{\circ}26'46''\text{E}$, $46^{\circ}56'53''\text{N}$, **Figure 18**) in Eastern part of France, close to the Swiss border, at an average altitude of 971 m above sea level. This site was located in a historic endemic area of *E. multilocularis* (Combes et al. 2012, Piarroux et al. 2013, 2015), with a density of 25 inhabitants per km^2 . The study site is characterized by a proportion of permanent grassland to total land of 52% (See the 2010 General Agriculture Census (RGA) from the Ministry of Agriculture) and a continental climate, with long, cold, snowy winters. Mean annual temperatures range from -2.2 to 15.1°C with average precipitations of 1,317 mm/year (www.meteofrance.com). A KML file containing the area covered by the study is provided in the supplementary material (**Figure 18**).

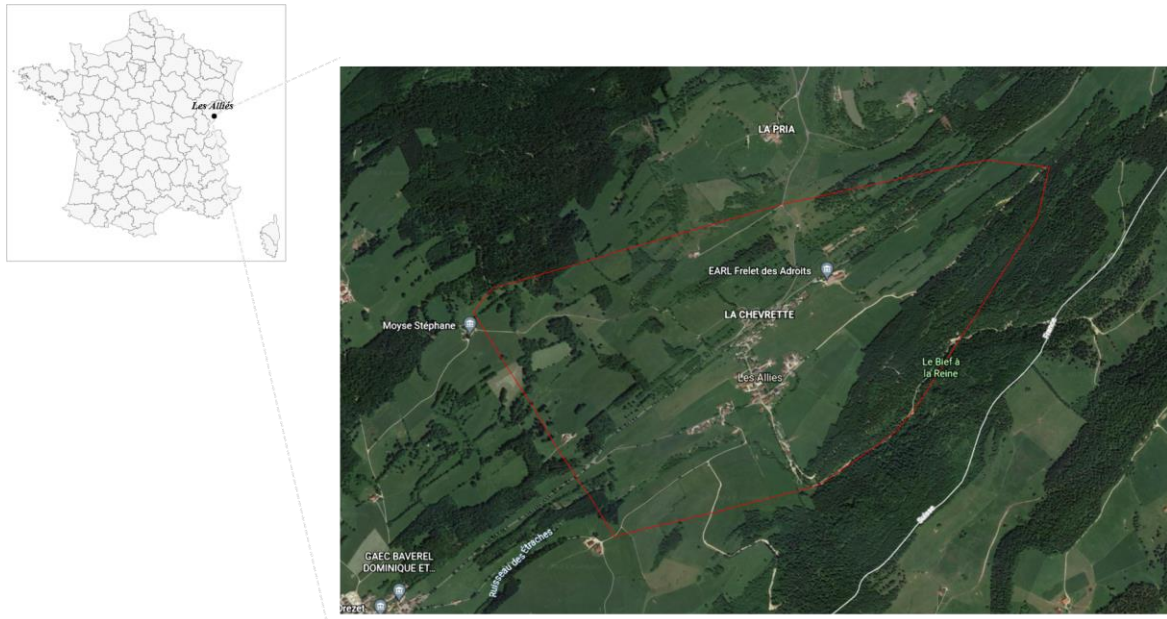


Figure 18 : Screenshot of the visualization of the KML file containing the area covered (red outline).

Copro-samples were collected systematically along a predetermined circuit during two-month sampling intervals (**Figure 19B**), for a total of 17 sampling sessions. When snow cover made it impossible to find faeces (March 2018, January and March 2019), sampling sessions were delayed (see details in **Table 4**). The circuit was visually screened on both sides of the road and all carnivore-like faeces found were collected and geolocated with a Global Positioning System (GPS) tracking device, with a precision of ± 10 m. Faecal samples were collected separately in individual plastic bags and were stored for seven days at -80°C for decontamination to prevent human infection, and then at -20°C before laboratory analyses.

Fox faeces were identified by a host faecal qPCR as described previously by amplifying a fragment of the *Vulpes vulpes cytB* gene for 83 bp PCR products from copro-DNA extracts (Knapp et al. 2016). Copro-DNA extracts attributed to foxes were analysed as described previously in a specific *E. multilocularis*-qPCR for the presence of *E. multilocularis* DNA based on the amplification of a portion of the mitochondrial *rrnL* gene for PCR products of 202 bp (Knapp et al. 2014, 2016). Among 1191 carnivore faeces collected, 386 fox faeces were identified molecularly during the whole study period. From these, 79 fox faeces positive for *E. multilocularis* DNA and a part of negative fox faeces ($n=101$), randomly selected to cover all the 17 sampling sessions (**Table 4**) and to take into account the spatial distribution of faeces in the study area (**Figure 19B**), were included in the genetic analysis.

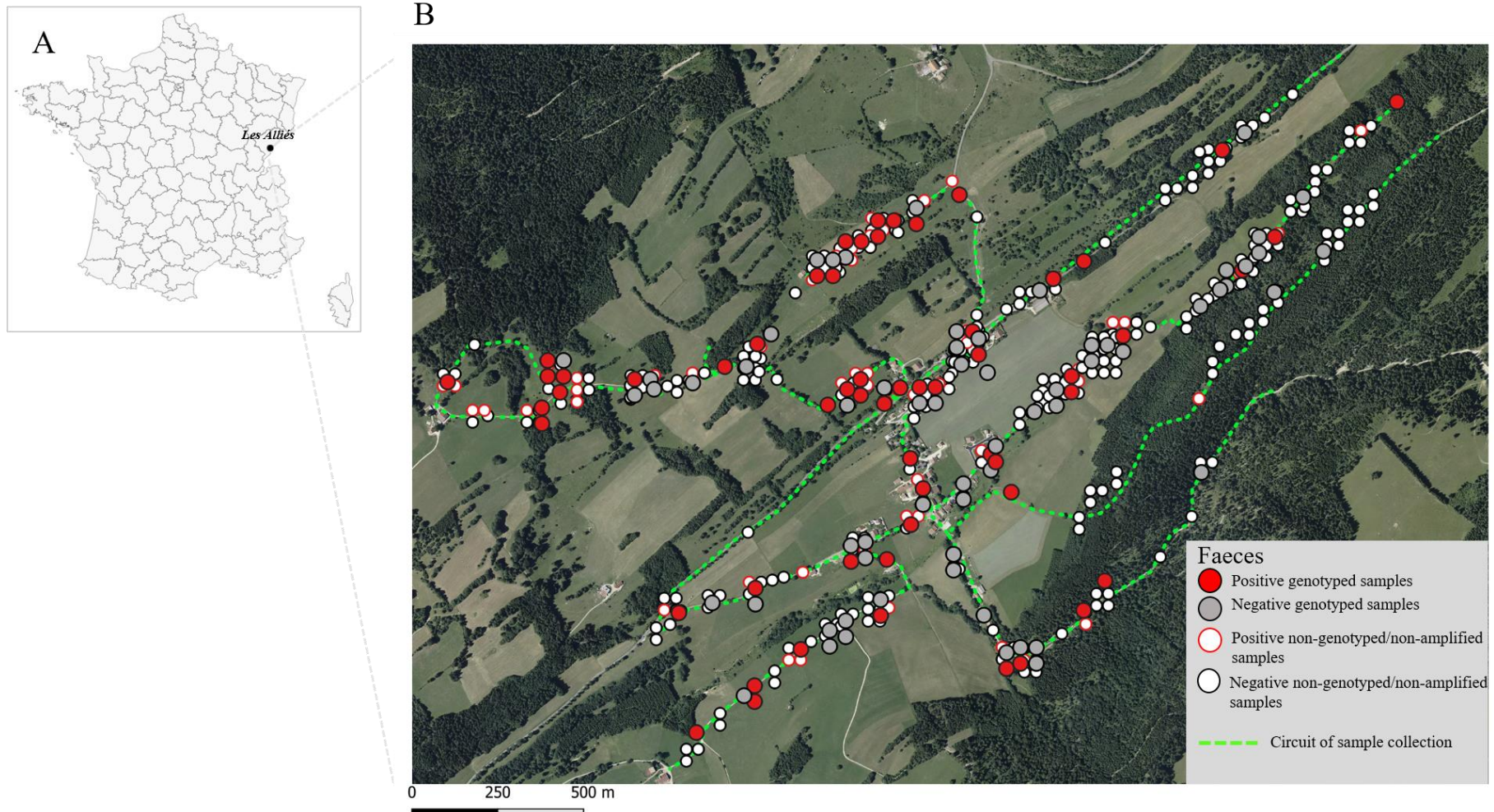


Figure 19 : Map showing the localisation of the study area (a rural town in the eastern part of France (0062604600E, 465605300N)) in France (A) and locations of fox faeces tested for *Echinococcus multilocularis* DNA presence (B).

Table 4 : Number of fox faecal samples collected and successfully genotyped by sampling date.

Sampling date	Number of fox faecal samples identified	Number of <i>E. multilocularis</i> positive samples successfully genotyped/no. samples tested	Number of <i>E. multilocularis</i> negative samples successfully genotyped/no. samples tested
March 2017	41	12/20	10/18
May 2017	30	8/11	5/10
July 2017	32	7/8	4/11
September 2017	18	1/1	3/4
November 2017	25	4/4	7/9
January 2018	34	6/8	6/8
April 2018	34	5/5	3/5
May 2018	9	0/1	1/1
July 2018	18	3/4	4/7
September 2018	21	4/5	4/5
November 2018	27	7/7	7/7
April 2019	21	3/4	4/6
May 2019	8	0/0	1/1
July 2019	13	0/0	0/1
September 2019	40	0/0	1/3
November 2019	2	0/1	0/1
January 2020	13	0/0	4/4
Total	386	60/79 (75.95%)	64/101 (63.37%)

Fox genotyping and sexing

Genomic DNA was extracted from hair root using the Qiagen DNeasy tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's recommendations.

Faecal DNA was extracted using the QIAmp Fast DNA Stool Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the producer's instructions, modifications made by Puechmaille et al. (2007) and Afonso et al. (2016) and other modifications as detailed below to maximize DNA recovery. Between 700 – 1000 mg of stool were thoroughly mixed with a sterile forceps in 1.6 mL of lysis buffer (ASL) placed individually in a 5-mL tube. The lysis buffer (1 – 1.5 mL) was added for samples that were not fully homogenized. The mixture was incubated 5 min at 70°C and briefly centrifuged. After centrifugation, 1 mL of Inhibitex buffer was added to the supernatant, the suspension was then incubated 1 min at room temperature and centrifuged at 18,800 x g for 6 min. Immediately, 600 µL of the supernatant was transferred into a 2-mL tube containing 25 µL of Proteinase K (Qiagen, Hilden, Germany) and the mixture was supplemented with 600 µL of a lysis buffer (buffer AL). The mixture was incubated 15 min at 70 °C and 600 µL of ethanol (96-100%) was added to the lysate. This step was repeated twice from the centrifuged Inhibitex suspension. The two lysate mixtures were then transferred in a QIAmp spin column by applying a volume of 600 µL and centrifuged 1 min at 20,000 x g each time. The spin column was successively washed with two wash buffers. DNA was eluted in two steps: i) 100 µL of ultra-pure water at 60 °C was added in the column, incubated for 10 min at room temperature and centrifuged 1 min at 20,000 x g; ii) 100 µL of ultra-pure water at 60 °C was added in the column, incubated for 30 min at room temperature, centrifuged 3 min at 20,000 x g, for a final elution of 200 µL. Finally, DNA extracts were dried in a Savant SpeedVac concentrator (Thermo-Finnigan, San Jose, CA, USA) for about 2 h, re-suspended in 20 µL of ultra-pure water.

The concentration of fox DNA in extracts was measured using the host faecal qPCR previously described (Knapp et al. 2016). Three serial dilutions of DNA extracted from a fox tissue sample quantified in a spectrophotometer (5, 0.5 and 0.05 ng/µL) were used to calibrate absolute quantification. Efficiency of the standard curves used to calculate fox DNA concentration was verified (correlation coefficient $R^2 \geq 0.95$). DNA extracts were then stored at – 20 °C until genotyping.

Fourteen canid microsatellite markers – AHT121, AHT137, C01.424, INU055, AHTh171, C08.618, CPH2, FH2010, C04.140, CXX0279, FH2848, REN169O18, CPH11, FH2457 – and one sex marker – K9-AMELO – all previously published (Ostrander et al. 1993, Fredholm and

Winterø 1995, Holmes et al. 1995, Breen et al. 2001, Ichikawa et al. 2002, Moore et al. 2010) with primers-pairs specifically redesigned for red fox DNA amplification by Moore et al. (2010) were used for individual genotyping and molecular sexing (**Table 5**). Forward primers that amplify non-overlapping microsatellite markers were labelled with the same dye (6-FAM, VIC, NED, PET); the sex marker forward primer was labelled with NED (**Table 5**). The 15 loci were initially screened by independent amplifications in simplex reactions from hair and faecal samples of the 20 known-sex red foxes. Then, the primer-pairs that amplify the microsatellite loci were pooled into three multiplex assays (**Table 5**) using the program Multiplex Manager 1.2 (Holleley and Geerts, 2009). Finally, DNA amplifications were performed in the three different multiplex reactions and in simplex reaction for the sex marker (**Table 5**) from hair and faecal samples of the 20 known-sex red foxes and from fox copro-samples collected in the field. Each reaction was carried out on a C1000 Touch thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) in a 10- μ L reaction volume containing 1 μ L of DNA extract (Fox DNA concentration = 0.12 – 56.06 ng/ μ L), 1 \times Multiplex PCR Master Mix (Qiagen), 0.1 μ M of each primer, with 3% DMSO and made up to 10 μ L with ultra-pure water. PCRs were conducted under the following thermal profile: an activation step of 15 min at 95 °C, 40 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 57 °C for 90 s and primer extension at 72 °C for 60 s, followed by a final extension at 60 °C for 30 min. Following amplifications, PCR products of the three multiplex reactions from each sample were mixed at equal final concentrations, and all amplicons were stored at – 20 °C. Alleles were separated according to size in base pairs using a SeqStudio Genetic Analyzer automaton (Applied Biosystems, Foster City, CA) in a reaction containing 0.5 μ L of pooled PCR products or sex marker amplicon, 0.5 μ L of an internal standard (GeneScan 600LIZ; Applied Biosystems, ABI, Waltham, MD, USA) and 9 μ L of Hi-Di™ formamide. Genetic profiles were determined using the module Microsatellite Analysis available on Thermo Fisher Cloud (Applied Biosystems). In order to prevent cross-contamination, DNA extractions, PCRs and the handling of PCR products were performed in separate rooms. In addition, DNA-free extraction controls (extraction from only kit reagents) and negative controls (ultra-pure water instead of DNA extract) were included every three batches of PCR (13 samples were amplified per PCR batch).

A comparative multiple-tubes approach was used to reduce genotyping errors and to determine multilocus genotypes (Taberlet et al. 1996). For each sample and for each simplex or multiplex reaction, at least two PCRs were performed. Consensus genotype was constructed for each locus; an allele was retained if it was present twice in at least two independent replicates.

Samples that showed inconsistencies between replicates or were not amplified after three DNA extractions and six independent amplifications or samples not fully genotyped for the 14 microsatellite loci were discarded.

Table 5 : Genetic diversity of the 14 microsatellite and sex markers selected and used for individual genotyping and molecular sexing of fox faecal samples in the present study.

Loci	Primer sequence	bp	N _A	H _O	H _E	P (HWE)	P _{IDrand}	P _{IDsibs}
<i>Multiplex set 1</i>								
AHT121	F: [FAM] 5'-TATTGCGAATGTCACCTGCTT-3' R: 5'-ATAGATACTCTCTCTCCG-3'	81 - 109	7	0.87	0.81	0.339	0.065	0.363
AHT137	F: [FAM] 5'-TACAGAGCTCTTAACTGGGTCC-3' R: 5'-CCTTGCAAAGTGCATTGCT-3'	135 - 147	6	0.87	0.78	0.948	0.085	0.382
CPH11	F: [PET] 5'-GTTAATGAAACTCCGATGTTTACA-3' R: 5'-GAAAGCCAAGCATGACTAGG-3'	116 - 128	4	0.38	0.36	0.738	0.435	0.679
REN169O18	F: [NED] 5'-TAGCAAAAACCCCAACTCAC-3' R: 5'-ACTGTGTGAGCCAATCCCTT-3'	168 - 194	11	0.78	0.83	0.251	0.048	0.347
FH2010	F: [VIC] 5'-GAATGGAACAGTTGACGATGC-3' R: 5'-CCCCTTACAGCTTCATTTTCC-3'	216 - 228	5	0.73	0.67	0.988	0.175	0.459
<i>Multiplex set 2</i>								
CO1.424	F: [FAM] 5'-AGCCTAGCTTACTGCCCTGG-3' R: 5'-TCCTTTGGTTTTTAGCAGGG-3'	169 - 187	6	0.67	0.62	0.981	0.185	0.484
INU055	F: [FAM] 5'-CCAGGTCTGCCTATCCATCT-3' R: 5'-GCACCACTTTGGGCTCCTTC-3'	200 - 222	10	0.78	0.84	0.232	0.042	0.339
AHTh171	F: [VIC] 5'-AGGTGCAGAGCACTCACTCA-3' R: 5'-CCTCAAACCCAGGTGAAGC-3'	151 - 161	2	0.00	0.04	0.011	0.916	0.957
FH2848	F: [NED] 5'-CAAAACCAACCCATTCACCT-3' R: 5'-GTCACAAGGACTTTTCTCCTA-3'	216 - 242	12	0.78	0.87	0.014	0.030	0.321
FH2457	F: [PET] 5'-AACCTGGTACTTTGAATTTGCA-3' R: 5'-AGAATGGATGGAAGCAAGGA-3'	170 - 218	17	0.71	0.78	0.095	0.058	0.373
<i>Multiplex set 3</i>								
C08.618	F: [VIC] 5'-CAACCCAGGGTGGAAAGC-3' R: 5'-GCCCAGAATCCATTGAGAAA-3'	173 - 187	6	0.60	0.68	0.147	0.141	0.444
CPH2	F: [VIC] 5'-TTCTGTTGTTATTGGCACCA-3' R: 5'-TTCTTGAGAACAGTGTCTTCG-3'	93 - 97	3	0.61	0.56	0.839	0.227	0.501
C04.140	F: [NED] 5'-CAGAGGTGGCATAGGGTGAT-3' R: 5'-TCGAAGCCAGAGAATGACT-3'	138 - 158	10	0.80	0.76	0.372	0.086	0.391
CXX0279	F: [NED] 5'-TGCTCAATGAAATAAGCCAGA-3' R: 5'-GAATTTGATTACTCTGGAAAACCTC-3'	90 - 110	8	0.89	0.82	0.424	0.055	0.353
<i>Sex marker</i>								
K9-AMELO	F: [NED] 5'-GTGCCAGCTCAGCAGCCCGTGGT-3' R: 5'-TCGGAGGCAGAGGTGGCTGTGGC-3'	201 (Y), 215 (X)	2	-	-	-	-	-

F, Forward; R, Reverse; bp, observed allele size in this study (in number of base pairs, bp); N_A, number of alleles; H_O, observed heterozygosity; H_E, expected heterozygosity; P(HWE), P-value associated with deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (P (HWE) at α=0.004); P_{IDrand}, probability of identity per locus for individuals with random mating; P_{IDsibs}, probability of identity per locus for siblings.

Data analysis

Genetic variation, probability of identity and genotyping error rates

We checked genotyping error rates (allelic dropout, ADO; false allele, FA) across amplifications as recommended by Broquet and Petit (2004) using the software GIMLET (Valière 2002) and we tested differences in genotyping success according to seasons using Chi-square tests of homogeneity. Genetic variation was estimated over all loci by assessing the number of alleles observed per locus (N_A), the expected and observed heterozygosities (H_E and H_O), and deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and from linkage equilibrium across all pairs of loci (Bonferroni correction was applied for multiple comparisons; P at $\alpha=0.05/\text{number of tests}$), using the package genepop 1.1.7 (Rousset et al. 2020) in R 3.5.1 (R Core Team 2018). For in field fox faecal samples, inbreeding coefficients (F_{IS}) and their statistical significance were calculated over all multilocus genotypes and between genotypes by sampling year (2017, 2018 and 2019-2020) in SPAGEDI 1.5 (Hardy and Vekemans 2002). Allele frequencies obtained by genotyping samples were used to calculate the probability of identity (P_{ID}), i.e. the ability of our 14 microsatellites to distinguish between individuals (Waits et al. 2001). P_{ID} for populations of individuals with random mating (P_{IDrand} ; Paetkau and Strobeck 1994) and P_{ID} for populations of related individuals (P_{IDsibs} ; Taberlet and Luikart 1999) were determined following the equations provided by Waits et al. (2001) as implemented in the software GIMLET.

Individual identification and estimation of fox population size

Fox faecal samples that showed identical multilocus genotypes or genotypes differed by one or two alleles were considered to originate from a single individual. The R package allelematch (Galpern et al. 2012) was used to perform multiple comparisons between genotypes. For visualisation of individual turnover over sampling years, a Venn diagrams was plotted using the R package VennDiagram (Chen and Boutros 2011). Those observed for a multi-year period were expected to be adults for sure after one year, and the others of uncertain age category (Amaike et al. 2018).

The fox population size during the whole study period and by year sampling was estimated using the DNA-based mark-recapture R package CAPWIRE (Miller et al. 2005, Pennell et al. 2013). This method is a maximum likelihood-based approach designed for the estimation of population size with non-invasive sampling involving multiple observations of the same individuals per sampling session. Two models are implemented in CAPWIRE, the even capture

probability model (ECM) that allows the estimation of the population size in case of equal probability of individual capture and the two innate rates model (TIRM) which estimates the size of a population including individual with different capture probabilities. We first compared the performance of the two models using maximum likelihood estimates and selected the model that better fits our data by using the CAPWIRE-inherent likelihood ratio test (LRT). In addition, the presence of capture heterogeneity in sampling was tested with the R package CMRPopHet (Puechmaille and Petit 2007) by simulating the homogeneity assumption in the sampling process and comparing the observed number of captures with the expected number of captures per individual. Confidence interval (95% CI) of the size estimates was calculated by running 1000 parametric bootstraps.

***Echinococcus multilocularis* faecal and individual prevalences in foxes**

Rank abundance analysis with cumulative percentage of fox faeces tested positive for *E. multilocularis* DNA was used to assess the proportion of unique genotypes in the faecal deposits tested positive for the parasite. As reported by Liccioli et al. (2015), we defined overall individual *E. multilocularis* prevalence based on genotyped faeces as the percentage of individuals (unique genotypes) with at least one scat tested positive for *E. multilocularis* DNA during the whole study period. Faecal prevalence based on non-genotyped faeces was determined by dividing the number of *E. multilocularis*-positive fox faeces by the total number of fox faeces collected. We calculated the overall individual *E. multilocularis* prevalence in foxes via the formula:

$$P_{Em} = N_{Em}/Tot_N \text{ (Liccioli et al. 2015),}$$

where P_{Em} is the overall individual *E. multilocularis* prevalence in the fox population; N_{Em} is the number of unique genotypes with faeces tested positive for *E. multilocularis* DNA at least once during the entire study period and Tot_N the number of unique fox genotypes detected. *Echinococcus multilocularis* faecal and overall individual prevalence in foxes were expressed with their 95% CIs and were compared using Chi-square tests.

We assessed the sampling effort as described by Liccioli et al. (2015) to determine the number of distinct individuals need to be tested and the number of fox faecal samples required to obtain the overall individual *E. multilocularis* prevalence in the fox population at 95% confidence level. The sampling effort based on the fox population estimated, the genotyping success rate and the variability in capture probabilities among individuals was calculated as

$$N_{faeces} = (N_{ind}/G_{sr}) \times \sum_{i=1}^k i \times \text{Freq}_i \text{ (Liccioli et al. 2015),}$$

where N_{faeces} is the number of faecal samples required; N_{ind} , the number of distinct individuals to be tested, calculated on the basis of the estimated prevalence, according to the formula for simple random samples adjusted to finite populations (Thrusfield 2007); G_{sr} , the total genotyping success rate; $Freq_i$, the frequency of individuals or unique genotypes detected i times.

5.3. Results

Validation and optimisation for microsatellite and sex loci

The 20 faecal and 20 hair samples taken from the known-sex red foxes were successfully genotyped and matched for the 14 microsatellite loci and the sex marker with no ambiguous genotypes detected [see Supplementary Table 1 (Annex B) for details]. The allelic dropout rate and false allele rate per-locus per-replicate were both null. All 14 microsatellite loci were polymorphic with a mean of 3.57 alleles per locus (range 2 – 7). Average observed heterozygosity over all loci was 0.43 (range 0.05 – 0.80) and average expected heterozygosity was 0.47 (range 0.05 – 0.78). One pair of loci out of 91 pairwise comparisons exhibited significant linkage disequilibrium ($P \leq 0.0005$): CPH2 and C04.140. Two loci (CPH2, FH2457) were not in Hardy-Weinberg equilibrium with a significant heterozygote deficit (P (HWE) = 0.002 and 0.000, respectively). The probability of identity considering all 14 loci was 1.29×10^{-7} for unrelated individuals (P_{IDrand}) and 6.39×10^{-4} for siblings (P_{IDsibs}).

Field fox faecal sample genotyping

Genotyping success, error rates and probabilities of identity

We obtained consistent genotypes for 60/79 fox faecal samples tested positive for *E. multilocularis* DNA (75.9%, **Table 4**) and for 64/101 selected *E. multilocularis* DNA-negative fox faecal samples (63.4%, **Table 4**) for an overall genotyping success of 68.9% (124/180). We excluded from the analysis 37 samples that were not amplified and 19 with incomplete genotyping results. Genotyping success varied significantly across seasons ($\chi^2=7.13$; d.f. = 2; $P=0.028$): the amplification success ranged from 80.6% for fox faeces collected during the cold seasons (September – January), to 63.4% for those collected in spring (March – May) and 58.1% for those collected in summer (July).

The average per-locus per-replicate allelic dropout rate was 0.056 (± 0.039), while the false allele rate was null. The 14 microsatellite loci used for the genotyping analyses were polymorphic with a mean of 7.6 alleles per locus (range 2 – 17, **Table 5**). Average observed

heterozygosity was 0.67 (range 0.00 – 0.89, **Table 5**) and average expected heterozygosity was 0.68 (range 0.04 – 0.87, Table 7). Tests by locus showed no deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium (P (HWE) at $\alpha=0.004$; **Table 5**). However, test of linkage disequilibrium showed significant correlations between two pairs of loci: AHT137 and FH2457, AHT137 and CXX0279. The overall inbreeding coefficient in the studied population was low and not significantly differed from zero ($F_{IS}=0.011$; $P = 0.544$). However, significant heterozygosity deficiency with a significant positive inbreeding coefficient ($F_{IS}=0.088$; $P = 0.044$) was detected for multilocus genotypes in the third year sampling (2019 – 2020) although it was not detected among genotypes in 2017 and 2018 (**Table 6**).

The P_{IDrand} per locus ranged from 0.011 to 0.636 (**Table 5**) for a cumulative P_{IDrand} of 3.87×10^{-14} , i.e. with our 14 loci set the minimal number of unrelated individuals ($1/P_{IDrand}$) that could be discriminated was above 2.5×10^{13} . When assuming full siblings, the P_{ID} per locus ranged from 0.321 to 0.957 (**Table 5**) for an overall P_{IDsibs} of 8.68×10^{-6} , i.e. in the extreme situation of close relatedness among foxes, with our microsatellite panel the minimal number of individuals ($1/P_{IDsibs}$) that could discriminated was above 115,000.

Table 6 : Number of individual foxes (unique genotypes), genetic variation and population sizes estimated by using CAPWIRE R package during the whole study period and annually in a rural town in the eastern part of France, between March 2017 and January 2020.

Sampling period	No. individuals identified	Mean no. of faeces/individual (\pm SD)	A (\pm SD)	H _O (\pm SD)	H _E (\pm SD)	F _{IS}	P (F _{IS})	CAPWIRE estimated Population size N (95% CI)
2017	24	2.54 (\pm 2.38)	6.57(\pm 3.52)	0.69(\pm 0.24)	0.68(\pm 0.24)	- 0.007	0.809	34 (28 – 46)
2018	24	2.08 (\pm 1.10)	6.21(\pm 3.33)	0.66(\pm 0.26)	0.66(\pm 0.24)	0.003	0.899	29 (24 – 35)
2019 - 2020	11	1.18 (\pm 0.40)*	5.79(\pm 2.26)	0.64(\pm 0.23)	0.70(\pm 0.19)	0.088	0.044	-
Total	45	2.76 (\pm 2.67)	7.64(\pm 4.03)	0.67(\pm 0.24)	0.68(\pm 0.23)	0.011	0.546	67 (56 – 78)

*Value below the threshold recommended by Miller et al. (2005) for a reliable estimate of the population size; SD, Standard deviation. A, mean number of alleles; H_O, average observed heterozygosity; H_E, average expected heterozygosity; F_{IS}, inbreeding coefficient; P (F_{IS}), P-value associated with statistical significance of F_{IS} based on 5000 randomisations.

Individual dynamics and population size

From the 124 successfully genotyped fox faeces, we identified 45 unique multilocus genotypes (or individuals). We were able to assign sex to 120 samples, the sex marker failed to amplify for the other four. Of the 45 unique genotypes, 27 were classified as male and 18 as female [Supplementary Table 2 (Annex C)], for an overall sex ratio of 0.6, which was not significantly different from 0.5 ($\chi^2=0.54$; d.f. = 1, $P=0.462$). We identified 24 unique genotypes more than once, with a significant difference between the mean number of multiple occurrences of female (mean = 6 ± 3.71 , n=10) and male (mean = 3.07 ± 1.21 , n=14) genotypes (non-parametric Mann-Whitney test, $W = 29.5$, $P = 0.036$). Multiple occurrence genotypes accounted for 7/15 and 5/12 captured in 2017 and 2018 respectively, while 10 genotypes were captured during two consecutive years (7 in 2017 – 2018 and 3 in 2018 – 2019/2020) and 2 during the three years of the study (**Figure 20**). Hence, excluding foxes observed firstly in the last sampling year, the percent of individuals observed in a single-year was significantly higher than that of individuals observed for a multi-year period (60.00 % [95% CI: 44.33 – 74.30] *versus* 26.67 % [95% CI: 14.60 – 41.94] respectively, $\chi^2=17.78$; d.f. = 1; $P = 0.003$). The number of copro-samples per individual ranged from one to 15, with an average number of 2.76 (± 2.67) which should be suitable to achieve estimates at 10% of the true population size (Miller et al. 2005). The comparison of the two models TRIM and ECM showed that the recapture probability was significantly different among individuals for the whole study period and for the first year (2017) (LRT, $P < 0.001$). TRIM was then used to calculate the fox population size, with estimates of 67 individuals (95% CI: 56 – 78) during the whole study and 29 (95% CI: 24 – 35) in 2017 (**Table 6**). In contrast, recapture probability did not differ among individuals in 2018 (LRT, $P = 0.594$), thus, ECM was chosen as the best-fitting model, with an estimated size of 29 individuals (95% CI: 24 – 35). In 2019 – 2020, the sample size was below the threshold recommended by Miller et al. (2005) (mean 2 – 2.5 observations per individual) for a reliable estimate of the population size (**Table 6**). Sampling heterogeneity for the entire study data and for 2017 and homogeneity for 2018 were confirmed in the Puechmaille and Petit (2007)'s test, corroborating the results of CAPWIRE-inherent likelihood ratio test (LRT).

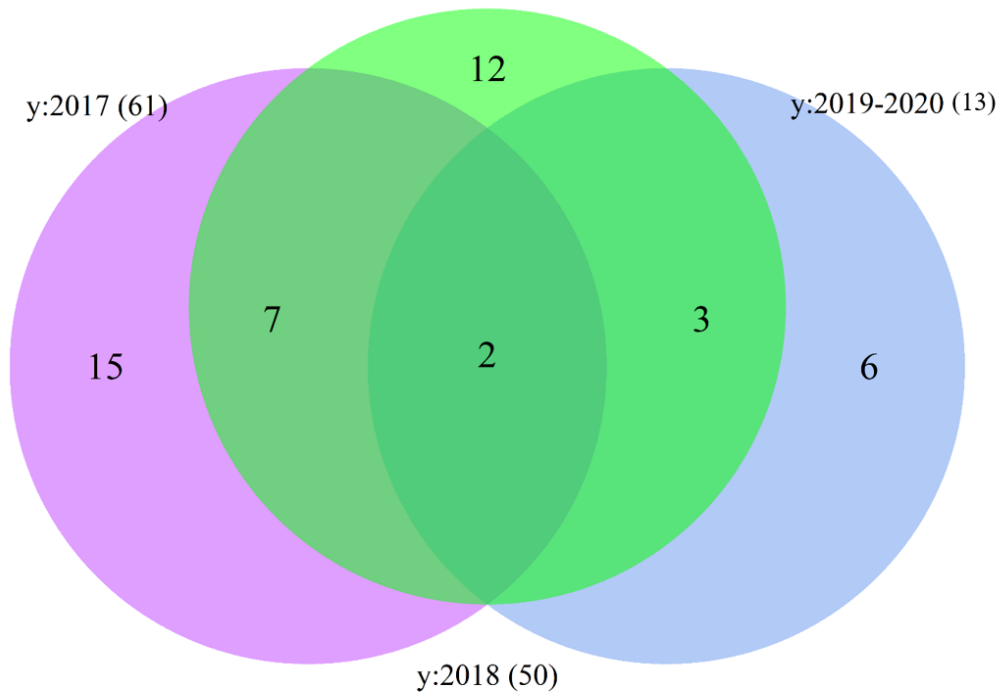


Figure 20 : Venn diagram of fox genotypes identified by sampling year. In brackets, number of successfully genotyped fox faeces; y, sampling years.

***Echinococcus multilocularis* faecal and individual prevalences in foxes**

Of the 45 genotypes identified, at least one *E. multilocularis*-positive scat belonged to 26 unique genotypes (15 males and 11 females) with an average number of 2.31 (± 1.87) positive faeces/genotype. Only 34.6% (9/26) of positive individuals deposited 60% of the faeces positive for *E. multilocularis* DNA (**Figure 21**). The overall individual *E. multilocularis* prevalence, based on genotyped faeces, in foxes during the study period (57.78 % [95% CI: 42.15 – 72.34]) was significantly higher than the global faecal prevalence (20.47% [95% CI: 16.55 – 24.84]) ($\chi^2=28.46$; d.f. = 1; $P < 0.001$). With a parasite prevalence estimated at 57.78 % and a population estimated at 67 individuals (95% CI: 57 – 78), approx. 39 individuals (95% CI: 35 – 42) should be tested to estimate the prevalence at 95% confidence level and 10% precision. Based on our genotyping success rate and the variability in capture probabilities among individuals in our sampling process, the number of faecal samples computed and required to reliably estimate the

E. multilocularis prevalence in fox population (95% confidence, 10% precision) in our study area was between 122 and 146.

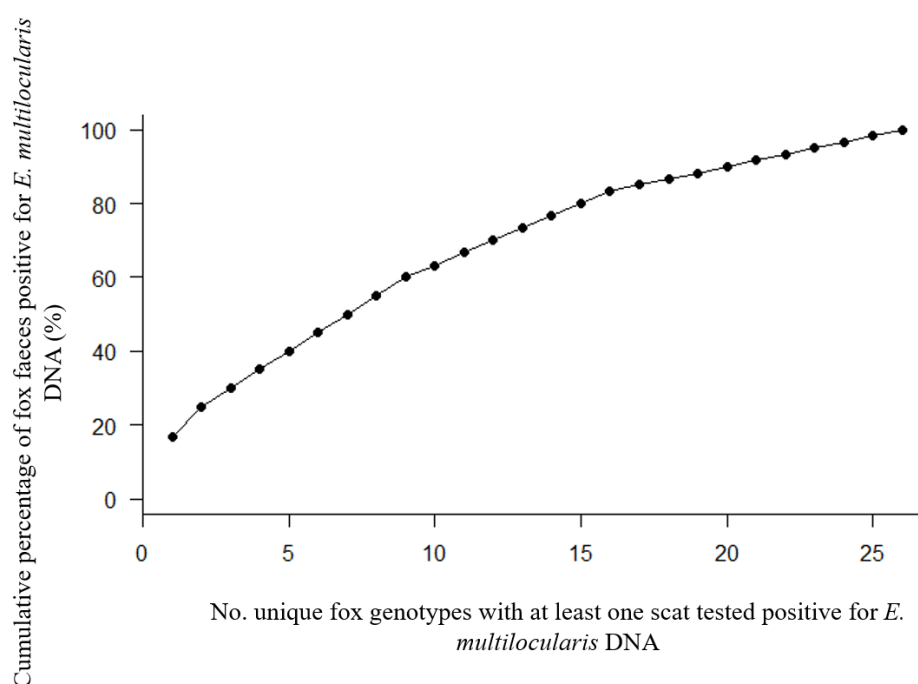


Figure 21 : Rank abundance curve for the fox genotypes identified in this study.

5.4. Discussion

In the present study, by using a stringent comparative multiple-tubes approach and optimising our protocol prior to field-collected sample analyses, we assume genotyping errors were substantially minimised. Applying genetic and molecular parasitological analyses to fox faeces collected during several sampling sessions provided insights into estimating individual *E. multilocularis* prevalence in foxes and charactering the contribution of some fox individuals to environmental contamination with *E. multilocularis*. Furthermore, faecal genotyping allowed the assessment of key parameters such as the size and genetic structure of fox population and the monitoring of individuals during the three years of the study.

Of the faecal and hair samples from caged red foxes of both sexes, all 14 microsatellite markers were consistent with unambiguous profiles, which is likely due to the use of samples not subject to environmental hazards and DNA degradation (Kovach et al. 2003, Santini et al. 2007, Nonaka et al. 2009). Interestingly, although the low number of known-sex red foxes tested (n=20), all loci used were polymorphic with a $P_{ID_{sibs}}$ below the recommended 0.01 threshold necessary to prevent the shadow effect (i.e. underestimating the real number of unique

genotypes, see Mills et al. 2000). This discrimination power is largely sufficient to ensure the correct identification of the individuals. When taking into account the number of field-collected fox faeces successfully amplified for the 14 loci, the cumulative probabilities of identity were 10^3 (for full siblings) to 10^{11} (in the case of unrelated individuals) times lower than the minimum recommended threshold (Waits et al. 2001), showing the high efficiency of our microsatellite panel to distinguish individuals in fox populations. The overall genotyping success rate (68.9%) in our study was close to those previously obtained in studies using faecal DNA from foxes (average success rates, approx. 64 – 78%, Oishi et al. 2010, Amaike et al. 2018). Liccioli et al. (2015) obtained genotypes with only a 33.4% success rate in coyote faeces collected in a North American urban landscape, Calgary, with the highest rate in cold seasons, as we reported in the present study. Our high success rate was probably due to extensive modifications of the extraction method in order to obtain high amounts of fox DNA relevant for genotyping (Morin et al. 2001, Reddy et al. 2012), while suitable environmental conditions (for instance, cold temperature, low sunlight level, low humidity) for DNA preservation may explain the high amplification success of the samples collected in September – January (Nsubuga et al. 2004, Santini et al. 2007). Moreover, we had low genotyping error rates (mean ADO ~6%, mean FA 0%), which are within the lowest range of rates found in previous studies based on non-invasive sampling (Puechmaille and Petit 2007, Valière et al. 2007). Our analysis protocol is therefore highly effective in reducing the expected number of incorrect genotypes.

Non-invasive genetic estimates require, in particular, a sufficient sample size that reflects structure and size of the population studied to provide reliable results. We identified overall 45 individuals ranged from 24 for the first two years to only 11 in the third year. As deviations from Hardy-Weinberg equilibrium did not occur in the population, we can conclude that in the studied area foxes exhibited weak genetic differentiation and genetic diversity has not decreased significantly. Other previous studies based on conventional methods (e.g. post-mortem examination of carcasses), in extended study areas, reported the presence of a single fox population with faint genetic structuring (Edwards et al. 2012, Norén et al. 2015, Basto et al. 2016), likely due to the fact that foxes are known as non-migrants but only highly mobile (Zecchin et al. 2019). However, a significant positive inbreeding coefficient was found among individuals in the third year sampling, possibly indicating the presence of related individuals (no random mating) and a declining population. The latter may be due to anthropogenic pressures and biotic changes or parasitic disease outbreaks such as sarcoptic mange (Jacquot et al. 2013, Hagenlund et al. 2019). The low number of fox faeces found in the third year reinforces

this assumption of population decline (97 for 2019-2020 versus 146 and 143 for 2017 and 2018 respectively, see **Table 4**). However, this significant positive inbreeding coefficient should be interpreted with caution, as very few samples were successfully genotyped for this period (**Table 4**).

As recommended by Miller et al. (2005), we had a suitable overall average number of samples per individual to estimate fox population parameters in the study area. Moreover, we assume both sexes were sampled equally, as the overall male to total sexed individuals was not different from a situation of full equality between the two sexes (0.5). Nevertheless, the average number of multiple occurrences of fox females was significantly higher than that of males, suggesting that the two sexes defecated unequally. Little data are available on the likelihood of finding faeces from different sex or age groups (Smith et al. 2006). Faecal distribution may be different between the two sexes according to the biological seasons (breeding, pup-rearing and dispersal) determined in the species (Murdoch et al. 2010). For instance, it may be likely to find faeces from adult females during the pup-rearing season (April – August), when adult females forage for pup feeding. Conversely, female faeces may be scarce during the breeding season (January – March) when females and pups remain in or around dens fed by the male.

Based on estimated population size, our study sampled a sufficient number of copro-samples and individuals to provide an accurate estimate of individual *E. multilocularis* prevalence in foxes, which was 57.78%. This prevalence was within the range of approx. 52 – 64% in previous works using fox autopsies in or near the same high endemicity area (Raoul et al. 2001, Combes et al. 2012). This high individual prevalence could be explained by the large proportion of foxes suspected of being not adults in our sample, juveniles being more susceptible to *E. multilocularis* infection (Tackmann et al. 2001, Fischer et al. 2005, Robardet et al. 2008, Conraths and Deplazes 2015). Interestingly, this overall individual *E. multilocularis* infection rate based on genotyped faeces was inconsistent with the overall faecal prevalence in foxes, showing sampling bias caused by multiple sampling of individuals. The most likely reason for this bias was that multiple faecal samples (either positive or negative for *E. multilocularis* DNA) were collected from a few infected individuals. Liccioli et al. (2015) reported consistent results between faecal *E. multilocularis* prevalence in genotyped coyotes and those obtained from non-genotyped faeces in the Calgary Metropolitan Area. The probability of sampling faeces from the same individual is certainly variable depending on the behaviour of wild animals (e.g. social dominance, territorial faecal marking, see Barja 2009, Liccioli et al. 2015) in different landscapes. In fact, according to our data, only approx. 35% of infected individuals

had deposited a large proportion (60%) of faeces tested positive for *E. multilocularis*. These potential super-spreaders are probably the most significant for environmental contamination and human exposure to *E. multilocularis* (Liccioli et al. 2015).

Sampling bias is commonly found in non-invasive studies that estimate prevalence based on the number of infected samples rather than infected individuals (Zhang et al. 2011). Our findings indicate that combining faecal genotyping with parasitological analyses not only avoided potential bias and provided a reliable estimate of *E. multilocularis* in foxes, but also allowed the assessment of key eco-epidemiological parameters (e.g., population structure, size and dynamics) without the need to observe or trap individuals. It appears that copro-samples collected during the months favourable for *E. multilocularis* infection (September – January in this study; Combes et al. 2012, Liccioli et al. 2015) are more suitable for genotyping success. With regard to *E. multilocularis*, non-invasive studies could thus be optimized for cost and efficiency by conducting frequent copro-sample collection during these seasons. We highlight the relevance of planning future studies on the dynamics of *E. multilocularis* egg excretion in both wild and domestic hosts in order to detect spatio-temporal variations in infection and to assess the subsequent zoonotic transmission risks (Liccioli et al. 2015). For instance, upper fox densities estimated using roadside counts and distance sampling in the ZELAC, an area at less than 10 km from our study area, were comprised between 1.2 and 3 individuals/km² (Giraudoux et al. 2020). Here, we found that 29-34 individuals were frequenting the area over a year, hence between 9.1-10.7 individuals/km² (67 over three years, 21 individuals/km²). Distance sampling, carried out on a short duration of 2-3 hours in a night is more likely to underestimate the fox number visiting the area, compared to genetic methods based on copro-samples. Combining host individual identification with non-invasive genetic of *E. multilocularis* eggs could provide insights into potential links between sylvatic and domestic or peri-domestic cycles and the parasite expansion patterns (Knapp et al., in prep.) Importantly, the major potential of faecal genotyping is the ability to assess the patterns of environmental contamination related to the parasite shedding among individuals. Indeed, one of the main outcomes of the present study was to identify a few individuals likely to be super-spreaders for *E. multilocularis* environmental contamination in a relatively small area of high prevalence. The latter information is crucial to improve the understanding of *E. multilocularis* transmission ecology in highly endemic areas and to optimise the effectiveness of prevention or control measures (e.g., baiting programmes) on the field.

Acknowledgements: This work was funded by the Franche-Comte Region (Grant N°XXX). We are grateful to Bénédicte Rognon from the Biomnigene platform for technical assistance.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Reference

- Afonso, E.; Tournant, P.; Foltête, J.-C.; Giraudoux, P.; Baurand, P.-E.; Roué, S.; et al. 2016. Is the lesser horseshoe bat (*Rhinolophus hipposideros*) exposed to causes that may have contributed to its decline? A non-invasive approach. *Global Ecology and Conservation* 8: 123–137.
- Amaike, Y.; Murakami, T.; Masuda, R. 2018. Low genetic diversity in an isolated red fox (*Vulpes vulpes*) population on Mt. Hakodate, Japan, revealed by microsatellite analyses of fecal samples. *Mammal Study* 43: 141–152.
- Barja, I. 2009. Decision making in plant selection during the faecal-marking behaviour of wild wolves. *Animal Behaviour* 77: 489–493.
- Basto, M.P.; Santos-Reis, M.; Simões, L.; Grilo, C.; Cardoso, L.; Cortes, H.; et al. 2016. Assessing Genetic Structure in Common but Ecologically Distinct Carnivores: The Stone Marten and Red Fox. *PLOS ONE* 11: e0145165.
- Beerli, O.; Guerra, D.; Baltrunaite, L.; Deplazes, P.; Hegglin, D. 2017. *Microtus arvalis* and *Arvicola scherman*: Key Players in the *Echinococcus multilocularis* Life Cycle. *Frontiers in Veterinary Science* 4.
- Breen, M.; Jouquand, S.; Renier, C.; Mellersh, C.S.; Hitte, C.; Holmes, N.G.; et al. 2001. Chromosome-Specific Single-Locus FISH Probes Allow Anchorage of an 1800-Marker Integrated Radiation-Hybrid/Linkage Map of the Domestic Dog Genome to All Chromosomes. *Genome Research* 11: 1784–1795.
- Broquet, T.; Petit, E. 2004. Quantifying genotyping errors in noninvasive population genetics. *Molecular Ecology* 13: 3601–3608.
- Chen, H.; Boutros, P.C. 2011. VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics* 12: 35.
- Combes, B.; Comte, S.; Raton, V.; Raoul, F.; Boué, F.; Umhang, G.; et al. 2012. Westward Spread of *Echinococcus multilocularis* in Foxes, France, 2005–2010. *Emerging Infectious Diseases* 18: 2059–2062.
- Conraths, F.J.; Deplazes, P. 2015. *Echinococcus multilocularis*: Epidemiology, surveillance and state-of-the-art diagnostics from a veterinary public health perspective. *Veterinary Parasitology* 213: 149–161.
- Da Silva, A.M.; Courquet, S.; Raoul, F.; Rieffel, D.; Giraudoux, P.; Millon, L.; et al. 2020. Assessment of the exposure to *Echinococcus multilocularis* associated with carnivore

- faeces using real-time quantitative PCR and flotation technique assays. *International Journal for Parasitology* 50: 1195–1204.
- Deplazes, P.; Rinaldi, L.; Alvarez Rojas, C.A.; Torgerson, P.R.; Harandi, M.F.; Romig, T.; et al. 2017. Global Distribution of Alveolar and Cystic Echinococcosis. *Advances in Parasitology* 95: 315–493.
- Eckert, J. 2003. Predictive values and quality control of techniques for the diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in definitive hosts. *Acta Tropica* 85: 157–163.
- Eckert, J.; Deplazes, P. 2004. Biological, Epidemiological, and Clinical Aspects of Echinococcosis, a Zoonosis of Increasing Concern. *Clinical Microbiology Reviews* 17: 107–135.
- Edwards, C.J.; Soulsbury, C.D.; Statham, M.J.; Ho, S.Y.W.; Wall, D.; Dolf, G.; et al. 2012. Temporal genetic variation of the red fox, *Vulpes vulpes*, across western Europe and the British Isles. *Quaternary Science Reviews* 57: 95–104.
- Fischer, C.; Reperant, L.A.; Weber, J.M.; Hegglin, D.; Deplazes, P. 2005. *Echinococcus multilocularis* infections of rural, residential and urban foxes (*Vulpes vulpes*) in the canton of Geneva, Switzerland. *Parasite* 12: 339–346.
- Fredholm, M.; Winterø, A.K. 1995. Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the Canidae family. *Mammalian Genome* 6: 11–18.
- Galpern, P.; Manseau, M.; Hettinga, P.; Smith, K.; Wilson, P. 2012. Allelematch: an R package for identifying unique multilocus genotypes where genotyping error and missing data may be present. *Molecular Ecology Resources* 12: 771–778.
- Gecchele, L.V.; Pedersen, A.B.; Bell, M. 2020. Fine-scale variation within urban landscapes affects marking patterns and gastrointestinal parasite diversity in red foxes. *Ecology and Evolution* 10: 13796–13809.
- Giraudoux, P.; Delattre, P.; Takahashi, K.; Raoul, F.; Quere, J.P.; Craig, P.; et al. 2002. Transmission ecology of *Echinococcus multilocularis* in wildlife: what can be learned from comparative studies and multiscale approaches? In: *Cestode Zoonoses: Echinococcosis and Cysticercosis: An Emergent and Global Problem*, IOS Press ed. Craig P. and Pawlowski Z., Amsterdam, p.251–266.
- Giraudoux, P.; Levret, A.; Afonso, E.; Coeurdassier, M.; Couval, G. 2020. Numerical response of predators to large variations of grassland vole abundance and long-term community changes. *Ecology and Evolution* 10, 14221–14246.

- Gras, P.; Knuth, S.; Börner, K.; Marescot, L.; Benhaiem, S.; Aue, A.; et al. 2018. Landscape Structures Affect Risk of Canine Distemper in Urban Wildlife. *Frontiers in Ecology and Evolution* 6.
- Hagenlund; Linløkken; Østbye; Walton; Odden; Samelius; et al. 2019. Genetic Structure and Gene flow in Red Foxes (*Vulpes vulpes*) in Scandinavia: Implications for the Potential Future Spread of *Echinococcus multilocularis* Tapeworm. *Applied Sciences* 9: 5289.
- Hardy, O.J.; Vekemans, X. 2002. spagedi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2: 618–620.
- Heggin, D.; Deplazes, P. 2013. Control of *Echinococcus multilocularis*: Strategies, feasibility and cost–benefit analyses. *International Journal for Parasitology* 43: 327–337.
- Heggin, D.; Bontadina, F.; Deplazes, P. 2015. Human–wildlife interactions and zoonotic transmission of *Echinococcus multilocularis*. *Trends in Parasitology* 31: 167–173.
- Holleley, C.E.; Geerts, P.G. 2009. Multiplex Manager 1.0: a cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. *BioTechniques* 46: 511–517.
- Holmes, N.G.; Dickens, H.F.; Parker, H.L.; Binns, M.M.; Mellersh, C.S.; Sampson, J. 1995. Eighteen canine microsatellites. *Animal Genetics* 26: 132–133.
- Ichikawa, Y.; Takahashi, Y.; Tsumagari, S.; Takeishi, M.; Ishihama, K.; Morita, M.; et al. 2002. Identification and characterization of 40 dinucleotide microsatellites in the dog genome. *Animal Genetics* 33: 400–401.
- Jacquot, M.; Coeurdassier, M.; Couval, G.; Renaude, R.; Pleydell, D.; Truchetet, D.; et al. 2013. Using long-term monitoring of red fox populations to assess changes in rodent control practices. *Journal of Applied Ecology* 50: 1406–1414.
- Knapp, J.; Umhang, G.; Poulle, M.-L.; Millon, L. 2016. Development of a Real-Time PCR for a Sensitive One-Step Coprodiagnosis Allowing both the Identification of Carnivore Feces and the Detection of *Toxocara* spp. and *Echinococcus multilocularis*. *Applied and Environmental Microbiology* 82: 2950–2958.
- Knapp, J.; Millon, L.; Mouzon, L.; Umhang, G.; Raoul, F.; Ali, Z.S.; et al. 2014. Real time PCR to detect the environmental faecal contamination by *Echinococcus multilocularis* from red fox stools. *Veterinary Parasitology* 201: 40–47.
- Knapp, J.; Giraudoux, P.; Combes, B.; Umhang, G.; Boué, F.; Said-Ali, Z.; et al. 2018. Rural and urban distribution of wild and domestic carnivore stools in the context of *Echinococcus multilocularis* environmental exposure. *International Journal for Parasitology* 48: 937–946.

- Kovach, A.I.; Litvaitis, M.K.; Litvaitis, J.A. 2003. Evaluation of Fecal mtDNA Analysis as a Method to Determine the Geographic Distribution of a Rare Lagomorph. *Wildlife Society Bulletin (1973-2006)* 31: 1061–1065.
- Liccioli, S.; Rogers, S.; Greco, C.; Kutz, S.J.; Chan, F.; Ruckstuhl, K.E.; et al. 2015. Assessing individual patterns of *Echinococcus multilocularis* infection in urban coyotes: non-invasive genetic sampling as an epidemiological tool. *Journal of Applied Ecology* 52: 434–442.
- Marathe, R.R.; Goel, S.S.; Ranade, S.P.; Jog, M.M.; Watve, M.G. 2002. Patterns in abundance and diversity of faecally dispersed parasites of tiger in Tadoba National Park, central India. *BMC Ecology* 2: 6.
- Miller, C.R.; Joyce, P.; Waits, L.P. 2005. A new method for estimating the size of small populations from genetic mark-recapture data. *Molecular Ecology* 14: 1991–2005.
- Mills, L.S.; Ciatta, J.J.; Lair, K.P.; Schwartz, M.K.; Tallmon, D.A. 2000. Estimating Animal Abundance Using Noninvasive DNA Sampling: Promise and Pitfalls. *Ecological Applications* 10: 13.
- Moore, M.; Brown, K.S.; Sacks, N.B. 2010. Thirty-one short red fox (*Vulpes vulpes*) microsatellite markers. *Molecular Ecology Resources* 10: 404–408.
- Morin, P.A.; Chambers, K.E.; Boesch, C.; Vigilant, L. 2001. Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). *Molecular Ecology* 10: 1835–1844.
- Murdoch, J.D.; Munkhzul, T.; Buyandelger, S.; Reading, R.P.; Sillero-Zubiri, C. 2010. Seasonal food habits of corsac and red foxes in Mongolia and the potential for competition. *Mammalian Biology* 75: 36–44.
- Nonaka, N.; Sano, T.; Inoue, T.; Teresa Armua, M.; Fukui, D.; Katakura, K.; et al. 2009. Multiplex PCR system for identifying the carnivore origins of faeces for an epidemiological study on *Echinococcus multilocularis* in Hokkaido, Japan. *Parasitology Research* 106: 75–83.
- Norén, K.; Statham, M.J.; Ågren, E.O.; Isomursu, M.; Flagstad, Ø.; Eide, N.E.; et al. 2015. Genetic footprints reveal geographic patterns of expansion in Fennoscandian red foxes. *Global Change Biology* 21: 3299–3312.
- Nsubuga, A.M.; Robbins, M.M.; Roeder, A.D.; Morin, P.A.; Boesch, C.; Vigilant, L. 2004. Factors affecting the amount of genomic DNA extracted from ape faeces and the

- identification of an improved sample storage method. *Molecular Ecology* 13: 2089–2094.
- Oishi, T.; Uruguchi, K.; Masuda, R. 2010. Non-Invasive Genetic Identification of the Red Fox *Vulpes vulpes* in the Shiretoko National Park, Eastern Hokkaido, Japan. *Mammal Study* 35: 201–207.
- Oksanen, A.; Siles-Lucas, M.; Karamon, J.; Possenti, A.; Conraths, F.J.; Romig, T.; et al. 2016. The geographical distribution and prevalence of *Echinococcus multilocularis* in animals in the European Union and adjacent countries: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors* 9.
- Ostrander, E.A.; Sprague, G.F.; Rine, J. 1993. Identification and Characterization of Dinucleotide Repeat (CA)_n Markers for Genetic Mapping in Dog. *Genomics* 16: 207–213.
- Paetkau, D.; Strobeck, C. 1994. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Molecular Ecology* 3: 489–495.
- Pedersen, A.B.; Altizer, S.; Poss, M.; Cunningham, A.A.; Nunn, C.L. 2005. Patterns of host specificity and transmission among parasites of wild primates. *International Journal for Parasitology* 35: 647–657.
- Pennell, M.W.; Stansbury, C.R.; Waits, L.P.; Miller, C.R. 2013. Capwire: a R package for estimating population census size from non-invasive genetic sampling. *Molecular Ecology Resources* 13: 154–157.
- Piarroux, M.; Piarroux, R.; Knapp, J.; Bardonnnet, K.; Dumortier, J.; Watelet, J.; et al. 2013. Populations at Risk for Alveolar Echinococcosis, France. *Emerging Infectious Diseases* 19: 721–728.
- Piarroux, M.; Gaudart, J.; Bresson-Hadni, S.; Bardonnnet, K.; Faucher, B.; Grenouillet, F.; et al. 2015. Landscape and climatic characteristics associated with human alveolar echinococcosis in France, 1982 to 2007. *Eurosurveillance* 20: 21118.
- Prugh, L.R.; Ritland, C.E.; Arthur, S.M.; Krebs, C.J. 2005. Monitoring coyote population dynamics by genotyping faeces. *Molecular Ecology* 14: 1585–1596.
- Puechmaille, S.J.; Petit, E.J. 2007. Empirical evaluation of non-invasive capture–mark–recapture estimation of population size based on a single sampling session. *Journal of Applied Ecology* 44: 843–852.
- Puechmaille, S.J.; Mathy, G.; Petit, E.J. 2007. Good DNA from bat droppings. *Acta Chiropterologica* 9: 269–276.

- R Core Team. 2018. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, .
- Raoul, F.; Hegglin, D.; Giraudoux, P. 2015. Trophic ecology, behaviour and host population dynamics in *Echinococcus multilocularis* transmission. *Veterinary Parasitology* 213: 162–171.
- Raoul, F.; Deplazes, P.; Nonaka, N.; Piarroux, R.; Vuitton, D.A.; Giraudoux, P. 2001. Assessment of the epidemiological status of *Echinococcus multilocularis* in foxes in France using ELISA coprotests on fox faeces collected in the field. *International Journal for Parasitology* 31: 1579–1588.
- Reddy, P.A.; Bhavanishankar, M.; Bhagavatula, J.; Harika, K.; Mahla, R.S.; Shivaji, S. 2012. Improved Methods of Carnivore Faecal Sample Preservation, DNA Extraction and Quantification for Accurate Genotyping of Wild Tigers. *PLOS ONE* 7: e46732.
- Robardet, E.; Giraudoux, P.; Caillot, C.; Boue, F.; Cliquet, F.; Augot, D.; et al. 2008. Infection of foxes by *Echinococcus multilocularis* in urban and suburban areas of Nancy, France: influence of feeding habits and environment. *Parasite* 15: 77–85.
- Robardet, E.; Giraudoux, P.; Caillot, C.; Augot, D.; Boue, F.; Barrat, J. 2011. Fox defecation behaviour in relation to spatial distribution of voles in an urbanised area: An increasing risk of transmission of *Echinococcus multilocularis*? *International Journal for Parasitology* 41: 145–154.
- Rousset, F.; Lopez, J.; Belkhir, K. 2020. *Genepop: Population Genetic Data Analysis Using Genepop*. .
- Santini, A.; Lucchini, V.; Fabbri, E.; Randi, E. 2007. Ageing and environmental factors affect PCR success in wolf (*Canis lupus*) excremental DNA samples. *Molecular Ecology Notes* 7: 955–961.
- Smith, D.A.; Ralls, K.; Hurt, A.; Adams, B.; Parker, M.; Maldonado, J.E. 2006. Assessing reliability of microsatellite genotypes from kit fox faecal samples using genetic and GIS analyses. *Molecular Ecology* 15: 387–406.
- Soulsbury, C.D.; Baker, P.J.; Iossa, G.; Harris, S. 2008. Fitness costs of dispersal in red foxes (*Vulpes vulpes*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 62: 1289–1298.
- Taberlet, P.; Luikart, G. 1999. Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 41–55.
- Taberlet, P.; Griffin, S.; Goossens, B.; Questiau, S.; Manceau, V.; Escaravage, N.; et al. 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* 24: 3189–3194.

- Tackmann, K.; Löschner, U.; Mix, H.; Staubach, C.; Thulke, H.H.; Ziller, M.; et al. 2001. A field study to control *Echinococcus multilocularis*-infections of the red fox (*Vulpes vulpes*) in an endemic focus. *Epidemiology and Infection* 127: 577–587.
- Thompson, R.C.A. 2013. Parasite zoonoses and wildlife: One health, spillover and human activity. *International Journal for Parasitology* 43: 1079–1088.
- Thrusfield, M.V. 2007. *Veterinary epidemiology*. Blackwell Science, Oxford; Ames, Iowa, .
- Torgerson, P.R.; Budke, C.M. 2003. Echinococcosis--an international public health challenge. *Research in Veterinary Science* 74: 191–202.
- Umhang, G.; Woronoff-Rhen, N.; Combes, B.; Boué, F. 2011. Segmental Sedimentation and Counting Technique (SSCT): An adaptable method for qualitative diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in fox intestines. *Experimental Parasitology* 128: 57–60.
- Valière, N. 2002. GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes* 2: 377–379.
- Valière, N.; Bonenfant, C.; Toïgo, C.; Luikart, G.; Gaillard, J.-M.; Klein, F. 2007. Importance of a pilot study for non-invasive genetic sampling: genotyping errors and population size estimation in red deer. *Conservation Genetics* 8: 69–78.
- Waits, L.P.; Luikart, G.; Taberlet, P. 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology* 10: 249–256.
- Walton, Z.; Samelius, G.; Odden, M.; Willebrand, T. 2017. Variation in home range size of red foxes *Vulpes vulpes* along a gradient of productivity and human landscape alteration. *PLoS ONE* 12.
- Walton, Z.; Samelius, G.; Odden, M.; Willebrand, T. 2018. Long-distance dispersal in red foxes *Vulpes vulpes* revealed by GPS tracking. *European Journal of Wildlife Research* 64.
- Wobeser, G.A. 2007. *Investigation and management of disease in wild animals*. In: *The Language of Science*. Plenum Press, New York, 265p.
- Zecchin, B.; De Nardi, M.; Nouvellet, P.; Vernesi, C.; Babbucci, M.; Crestanello, B.; et al. 2019. Genetic and spatial characterization of the red fox (*Vulpes vulpes*) population in the area stretching between the Eastern and Dinaric Alps and its relationship with rabies and canine distemper dynamics. *PLOS ONE* 14: e0213515.
- Zhang, L.; Yang, X.; Wu, H.; Gu, X.; Hu, Y.; Wei, F. 2011. The parasites of giant pandas: individual-based measurement in wild animals. *Journal of Wildlife Diseases* 47: 164–171.

6. Résultats complémentaires : Distribution spatiale des fèces de renards identifiées individuellement

En parallèle à l'évaluation de la contribution individuelle des renards dans le dépôt des fèces positives pour *E. multilocularis*, nous nous sommes intéressés à l'implication des individus dans la surdispersion spatiale des fèces porteuses du parasite. Pour un même individu, il s'est agi de savoir s'il existe : i) une structuration dans l'utilisation de l'habitat à travers le dépôt des fèces par la détermination d'un domaine vital minimum ; ii) si le domaine vital minimum était situé partiellement ou totalement dans le cluster des fèces testées positives pour le parasite. Ces analyses peuvent servir à s'assurer de la fiabilité des génotypes identifiés, par la vérification de la cohérence géographique des emplacements des échantillons fécaux appartenant à un même individu (par exemple, voir Smith *et al.*, 2006). Leur importance majeure réside dans la possibilité de caractériser plus finement la contribution individuelle des HD aux variations spatiales de la contamination environnementale par *E. multilocularis*.

Les calculs et les analyses de cette partie sont basés sur les données d'identification des fèces des renards issues de la **Première Partie, Chapitre 5**. Tout d'abord, les distances moyennes, minimales et maximales (en m) ont été déterminées entre les emplacements de toutes les fèces et entre les fèces appartenant à un même individu. Nous avons ensuite examiné la distribution des distances en comparant les distances moyennes entre les fèces des mêmes individus avec la distance moyenne entre toutes les fèces de renards en utilisant le test non paramétrique de Wilcoxon-Mann Whitney. Pour les individus avec des emplacements de fèces non alignés et suffisamment dispersés, nous avons déterminé les surfaces (en ha) des polygones convexes incluant les fèces afin d'évaluer la taille minimale du domaine vital. La surdispersion de la prévalence fécale d'*E. multilocularis* a été déterminée en testant la distribution aléatoire des fèces de renards détectées positives pour le parasite (n=79/386, voir **Partie 1.5.2**) en utilisant la statistique de balayage spatial développée par Kulldorff et Nagarwalla (1995) précédemment décrite (**Partie 1.4.2.6**). Par la suite, les clusters de surdispersion des fèces et les polygones convexes incluant les fèces des mêmes individus ont été cartographiés sur des orthophotographies (BD Ortho version de l'Institut Géographique National avec une résolution de 50 cm comme fond). Les calculs de distance et les polygones convexes ont été effectués avec les packages R Sp version 1.4-5 (Pebesma *et al.*, 2021) et rgeos version 0.5-5 (Bivand *et al.*, 2020). Les représentations graphiques ont été générées à l'aide du système d'information géographique QGIS version 3.2.3-Bonn (QGIS Development Team, 2018. QGIS Geographic

Information System. <http://www.qgis.com>). Enfin, la fonction « Overlap Analysis Feature » disponible dans QGIS v3.2.3 a servi : i) pour le calcul des pourcentages de superposition des polygones convexes des fèces des mêmes individus (domaines vitaux minimums) avec le cluster de surdispersion des fèces positives ; et ii) pour déterminer les chevauchements entre les domaines vitaux minimums.

L'analyse des localisations des fèces a montré que les distances moyennes entre les fèces des mêmes individus étaient significativement plus faibles que celles de toutes les fèces (**Table 7**). Ainsi, les fèces appartenant aux mêmes individus ont été déposées à une distance relativement proche les unes des autres (**Table 7**), malgré le fait que les échantillons aient été collectés à des sessions différentes parfois distantes de plusieurs mois. Nous pouvons alors supposer que les individus n'ont pas déposé aléatoirement les fèces et qu'il pourrait exister une structuration de territoires sur la zone d'étude. L'évaluation de la taille minimale du domaine vital par le tracé des polygones convexes englobant les fèces n'a pu être réalisée que pour 11 individus (**Table 7**) sur les 24 renards identifiés ayant déposé plus d'une déjection au cours des trois années de l'étude (voir **Partie 1.5.3**). Parmi ces individus, 10 avaient déposé au moins un échantillon testé positif pour le parasite (**Table 7**). Le domaine vital minimal de trois d'entre eux n'était pas inclus dans le cluster de surdispersion des fèces positives, tandis que celui de 7 individus l'était partiellement ou totalement avec des pourcentages de superposition variant de 5 à 100% (**Figure 22**). Toutefois, le nombre de chevauchement des domaines vitaux minimums est maximal (6/8) au centre de la commune (**Figure 22**), en raison probablement de la disponibilité plus abondante et permanente de la nourriture anthropogénique à cet endroit du site d'étude. Ces résultats suggèrent que le comportement de défécation de quelques individus est crucial dans la distribution spatiale groupée du parasite dans l'environnement.

Table 7 : Distances (in meter) between faecal locations among fox genotypes with multiple occurrences in the study site in France.

Fox genotype ID	No. faecal samples	No. positive faeces	Distance (m) between faecal samples			<i>P</i> *	Area covered (ha)
			minimum	maximum	Mean (\pm SD)		
1	7	5	79.63	1000.44	446.61 (\pm 305.61)	< 0.001	21.52
2	8	3	82.25	1168.35	543.10 (\pm 288.33)	< 0.001	32.98
4	15	10	0.58	816.35	381.42 (\pm 199.79)	< 0.001	30.50
5	3	3	47.64	105.12	70.08 (\pm 30.74)	0.004	-
7	6	3	17.43	561.01	299.66 (\pm 176.92)	< 0.001	6.30
9	4	1	82.58	470.96	334.72 (\pm 160.08)	0.001	5.55
10	6	0	3.528	973.778	519.11 (\pm 317.50)	< 0.001	10.78
11	5	3	131.7	1283.2	811.76 (\pm 443.06)	0.490	35.01
12	3	1	22.76	526.93	354.88 (\pm 287.69)	0.037	-
15	2	1		649.10		0.480	-
16	2	0		609.78		0.437	-
17	2	2		504.30		0.325	-
19	3	2	2.69	119.61	79.75 (\pm 66.74)	0.004	-
20	6	3	17.34	411.25	197.23 (\pm 127.05)	< 0.001	1.32
23	2	1		744.90		0.657	-
24	2	0		633.81		0.471	-
25	5	3	53.1	981.7	614.48 (\pm 309.12)	0.031	21.96
26	3	2	135.2	618.1	432.75 (\pm 260.29)	0.048	3.28
30	5	2	53.44	361.73	173.45 (\pm 99.78)	< 0.001	-
31	3	3	221	370.7	275.17 (\pm 82.97)	0.013	2.44
32	2	2		423.56		0.244	-
33	4	0	8.49	254.47	134.4 (\pm 109.57)	< 0.001	-
38	2	2		496.40		0.317	-
39	2	2		NA		-	-

* *P*-value for comparisons with the mean distance between all fox faeces collected (976.03 ± 543.63 m) using the nonparametric Wilcoxon-Mann Whitney's test. Bold values indicate significance at $P < 0.05$.

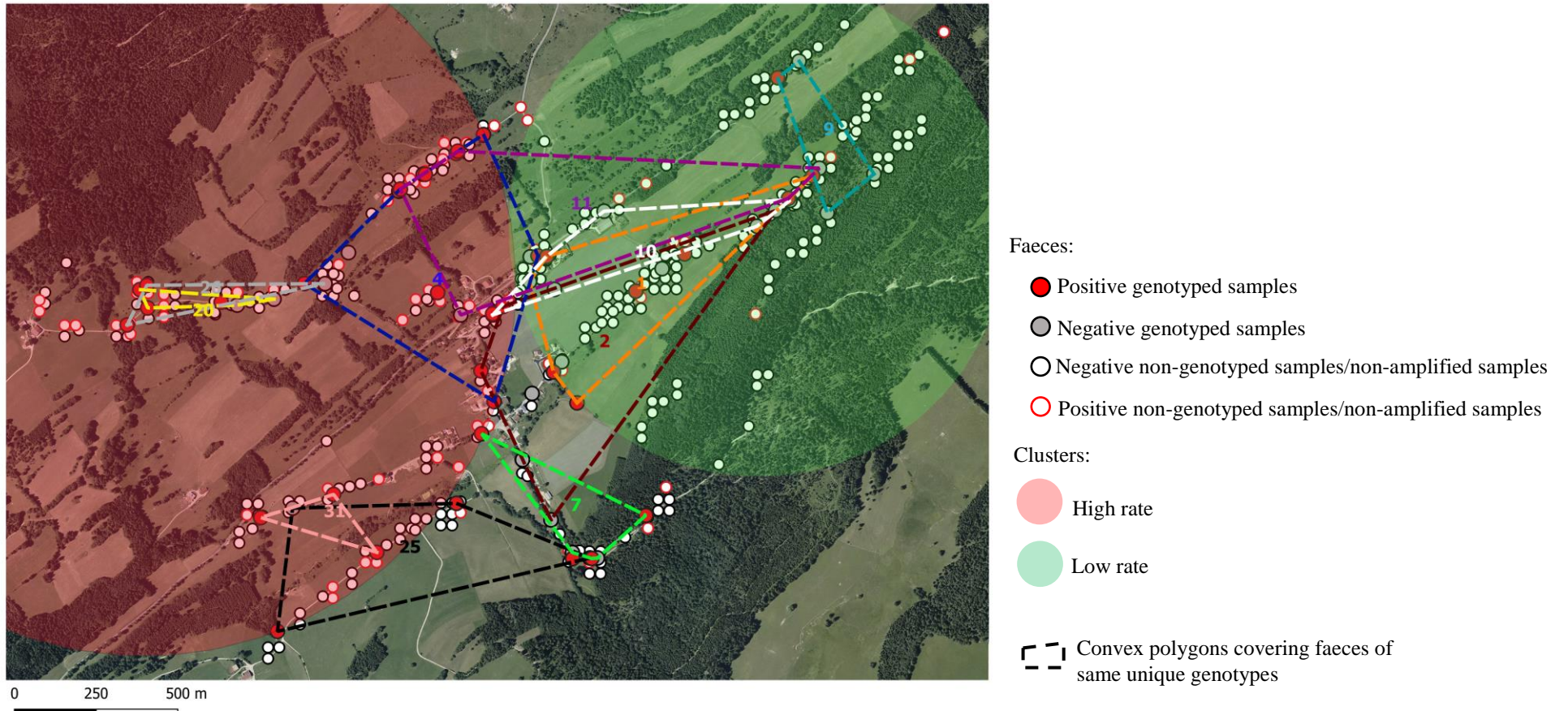


Figure 22 : Maps showing clusters of *E. multilocularis*-positive fox faeces based on Kulldorff statistics on the spatial distribution of fox faeces collected between March 2017 and January and convex polygons covering faecal deposits of fox genotypes identified in an endemic area of alveolar echinococcosis in France. Numbers, genotype ID (only convex polygons of genotypes with non-fully and scattered faeces were mapped with a different colour for each genotype).

7. Conclusion

Les résultats de cette première partie confirment la contribution importante des renards à la contamination environnementale par *E. multilocularis*. Parmi leur population, le cycle local du parasite repose en partie sur quelques individus. Ces données sont non seulement nécessaires pour comprendre la transmission du parasite mais aussi pour ajuster les mesures de prévention sur le terrain, comme par exemple les programmes de distribution d'appâts contenant des anthelminthiques. Cette méthode est considérée comme la plus efficace pour le contrôle d'*E. multilocularis* dans la population des renards (Tsukada *et al.*, 2002a; Hegglin *et al.*, 2003; Hegglin and Deplazes, 2013). Il semblerait que la distribution des vermifuges sur de petits espaces soit plus efficace en termes de coût, de faisabilité et de réduction significative de la contamination environnementale par les œufs du parasite que les campagnes sur de larges échelles (Hegglin *et al.*, 2003; Hegglin and Deplazes, 2013). Nos analyses complémentaires des données d'identification des renards par leurs fèces permettent d'apporter quelques éléments qui pourraient justifier cette hypothèse. En effet, les domaines vitaux minimums des renards infectés se chevauchaient principalement dans la partie centrale de la zone d'étude. Dès lors, le dépôt régulier d'appâts contenant les vermifuges au centre de la commune apparaît plus pertinent pour réduire l'abondance du parasite parmi la population locale des renards et la contamination environnementale par les œufs.

Nos données démontrent le rôle marginal des chiens et chats dans la réalisation du cycle local d'*E. multilocularis* (Hegglin and Deplazes, 2013; Knapp *et al.*, 2018). L'implication de ces derniers dans le maintien d'un cycle domestique du parasite n'est toutefois pas à exclure totalement dans la mesure où les faibles prévalences fécales d'œufs du parasite pourraient être compensées par le dépôt fréquent de grandes quantités de leurs fèces à proximité immédiate de l'homme, contribuant ainsi de façon non négligeable au risque zoonotique du parasite (Eckert *et al.*, 2001c; Deplazes *et al.*, 2011; Hegglin and Deplazes, 2013; Liccioli *et al.*, 2015a). Par ailleurs, la superposition des fèces des renards, chiens et chats – de surcroît au centre du site d'étude, dans l'environnement immédiat de l'homme (voir aussi les résultats de (Knapp *et al.*, 2018) – laisse supposer que les trois HD exploitent le même pool local de rongeurs (Raoul *et al.*, 2015). Il peut en découler une interconnexion entre les cycles sylvatiques et domestiques dans laquelle les renards pourraient jouer potentiellement le rôle de réservoir puisque les œufs du parasite ont été trouvés plus fréquemment dans leurs fèces. Les renards infecteraient alors indirectement les carnivores domestiques via la prédation de la même population de rongeur. Dans notre cas, l'étude génétique des œufs d'*E. multilocularis* isolés des fèces des trois espèces

de carnivores offre l'occasion de traiter cette question, afin d'investiguer dans quelle mesure le cycle synanthropique est entretenu et maintenu par le cycle sylvatique. De plus, l'agrégation des œufs d'*E. multilocularis* est susceptible de persister pendant plusieurs mois dans l'environnement, vu que ces formes libres infectieuses peuvent survivre pendant plusieurs mois dans les conditions climatiques froides habituelles du site d'étude (Veit *et al.*, 1995). Ceci peut contribuer à perpétuer le cycle local du parasite en maintenant un niveau de pression d'infection de longue durée sur les HI et même pour l'homme en cas de comportements favorables au contact avec le parasite présent dans les matrices environnementales (Burlet *et al.*, 2011). Toutefois, peu d'informations sont disponibles sur la persistance d'*E. multilocularis* dans l'environnement en rapport avec la distribution spatiale des fèces des HD.

Deuxième partie : Circulation d'*Echinococcus multilocularis*
entre les hôtes sauvages et domestiques par l'étude de la
diversité génétique du parasite à une échelle locale

1. Introduction

Dans cette deuxième partie, nous avons entrepris l'étude des liens potentiels entre le cycle sauvage d'*E. multilocularis* entretenu par les renards et le cycle domestique du parasite avec comme HD les carnivores domestiques. Il s'est agi d'étudier l'hypothèse selon laquelle les renards joueraient le rôle de réservoir pour le cycle local d'*E. multilocularis*, compte tenu de la forte prévalence fécale des œufs et de la superposition spatiale de leurs fèces avec celles des chiens et chats que nous avons rapportées dans la partie précédente de nos travaux.

1.1. Contexte

Les parasites ayant la capacité de circuler entre les populations des animaux sauvages et domestiques sont particulièrement préoccupants et accroissent les risques d'infections pour l'homme (Polley, 2005; Otranto *et al.*, 2015b). La circulation des parasites entre ces deux types de populations dépend de nombreux paramètres écologiques propres à une zone donnée. La plupart des carnivores sauvages peuvent exploiter de grands territoires et parcourir de larges distances et leur établissement dans une zone donnée peut permettre le transfert de parasites aux populations d'animaux domestiques plus proches de l'homme et donc favorisant l'établissement et la perpétuation de cycles parasitaires synanthropiques (Antolová *et al.*, 2004; Traversa, 2012; Otranto *et al.*, 2015b).

En ce qui concerne *E. multilocularis*, l'expansion des populations de renard roux et la colonisation d'autres zones favorisent probablement l'accroissement de l'aire d'occurrence du parasite (Tackmann *et al.*, 1998; Vervaeke *et al.*, 2006; Hegglin *et al.*, 2015). Ceci contribue à augmenter le risque d'infection notamment des chiens car ils peuvent potentiellement chasser la même population locale de rongeurs HI sensibles au parasite (Deplazes *et al.*, 2011). De plus, l'habitude fréquente des chiens à fouiller ou à se rouler dans les fèces de renards peut contaminer leur pelage (Deplazes *et al.*, 2011). Par voie de conséquences le risque de transmission à l'homme peut être substantiellement élevé étant donné les liens étroits entre les humains et les chiens. Bien que les chats domestiques ne soient pas considérés comme pertinents dans le maintien du cycle d'*E. multilocularis* (Kapel *et al.*, 2006), ils pourraient cependant affecter la circulation du parasite en entrant en compétition avec les renards dans la prédation des rongeurs sensibles infectés à proximité des humains (Hegglin *et al.*, 2015). Ceci en raison du fait que les campagnols des genres *Arvicola* et *Microtus* peuvent être les principales proies des chats (Forin-Wiart, 2014; Forin-Wiart *et al.*, 2018). Toutefois, les risques potentiels de transmission croisée entre les carnivores sauvages et domestiques sont particulièrement

difficiles à identifier car le cycle du parasite implique souvent un large éventail d'HI (Eckert *et al.*, 2001c; Otranto *et al.*, 2015a; Raoul *et al.*, 2015; Beerli *et al.*, 2017). Les possibilités de transfert du parasite entre différentes espèces d'HD peuvent être évaluées par l'identification des variants génétiques circulant entre leurs populations. La complexité des profils EmsB a permis l'utilisation de ce microsatellite hautement discriminant à différentes échelles – continentale, régionale, locale – dans divers travaux à partir de vers du parasite isolés d'intestins de renards ou des échantillons de métacestode de rongeurs autopsiés ou de lésions humaines issues de la chirurgie, afin de comprendre l'origine et l'expansion du parasite en Europe (Knapp *et al.*, 2008, 2009, 2019, 2020, 2021; Umhang *et al.*, 2014b, 2017a, 2021). Aucune étude antérieure n'a fourni cependant de données sur la diversité génétique du parasite à une échelle donnée concomitamment chez les trois principales espèces d'HD dans le contexte européen. En effet, cela nécessiterait d'avoir recours aux méthodes noninvasives indispensables pour les études du parasite chez les carnivores domestiques.

1.2. Objectifs

Dans ce contexte, une étude exploratoire a été conduite afin de développer et d'appliquer une méthode de génotypage EmsB à partir des œufs d'*E. multilocularis* isolés des fèces de carnivores – renards, chiens et chats – collectées sur la commune des Alliés de mars 2017 à janvier 2020. Cette problématique est traitée dans l'article intitulé :

- Jenny Knapp, **Abdou Malik Da Silva**, Sandra Courquet and Laurence Million. 2021. **Assessment of the genetic diversity of *Echinococcus multilocularis* from copro-isolated eggs.** *Pathogens* 10 (10): 1296. (DOI: [10.3390/pathogens10101296](https://doi.org/10.3390/pathogens10101296)).

2. Méthodologie

Toutes les fèces identifiées pour les espèces émettrices et testées positives à l'ADN d'*E. multilocularis* ont été soumises à la technique de concentration au sucrose préalablement décrite dans la **Partie 1.4** pour concentrer, observer et compter les œufs de Taeniidae au microscope. Afin de pallier l'insuffisance de quantité d'ADN du parasite pouvant potentiellement être un facteur limitant du génotypage, des lots doubles de 1, 5 et 10 œufs ont été constitués par échantillon si un nombre suffisant d'œufs étaient disponibles. L'ADN a été extrait de ces lots et testé non seulement pour la présence d'*E. multilocularis* mais aussi d'*E. granulosus* et des *Taenia* sp. puis l'identification de l'espèce est confirmée par séquençage (Trachsel *et al.*, 2007; Knapp *et al.*, 2016a), afin de détecter de potentielles infestations par d'autres Taeniidae. Ces lots ont été ensuite soumis à l'amplification d'EmsB puis les fragments isolés et leurs intensités

de fluorescence ont été utilisés pour comparer la qualité du génotypage entre les duplicatas des lots à l'aide d'un coefficient de corrélation de Pearson ($r > 0,75$; 0,80 et 0,9). Les profils EmsB reproductibles entre duplicatas ont servi pour l'étude de la diversité génétique du parasite au sein et entre les différentes populations d'hôtes à cette échelle locale. De plus, ces profils ont été comparés à ceux d'échantillons d'*E. multilocularis* de patients et de vers de renards français et suisses génotypés et disponibles dans la base de données EWET (EmsB Website for *Echinococcus* Typing) (Knapp *et al.*, 2017).

3. Résultats principaux

Après concentration, les œufs de Taeniidae ont été observés substantiellement – au moins 5 œufs par 100 μ l de culot de flottaison – dans 19 des fèces testées positives au préalable à l'ADN d'*E. multilocularis*, correspondant à 15 copro-échantillons de renards, 3 de chiens et 1 de chat. Au total, 112 lots d'œufs de Taeniidae ont été constitués dont 102 ont été confirmés exclusivement pour la présence d'ADN d'*E. multilocularis*. Le tri qualitatif au coefficient de corrélation $r > 0,9$ a montré que les profils EmsB apparaissaient identiques entre les duplicatas de 47 lots d'œufs dont la quasi-totalité était des isolats de 5 et 10 œufs. Au total, trois profils EmsB (Gr1, Gr2 et Gr3) ont été identifiés de ces lots isolés de 16 copro-échantillons. Ces profils étaient associés à des variants du parasite décrits précédemment dans la zone de l'étude ou de régions suisses proches. Les trois profils EmsB étaient retrouvés dans les fèces de renards alors que les fèces de chiens et l'excrément de chat présentaient deux des trois profils.

4. Assessment of the genetic diversity of *Echinococcus multilocularis* from copro-isolated eggs

Jenny Knapp ^{1,2,*}, Abdou Malik Da Silva ², Sandra Courquet ^{1,2} and Laurence Millon ^{1,2}

¹ Department of Parasitology-Mycolology, National Reference Centre for Echinococcoses, University Hospital of Besançon, Besançon, France; jknapp@univ-fcomte.fr

² UMR CNRS 6249 Laboratoire Chrono-environnement, Université Bourgogne-Franche-Comté, 16 Route de Gray, Besançon, France; lmillon@chu-besancon.fr

* Correspondence: jknapp@univ-fcomte.fr; Tel.: +33 370 632 106

Pathogens 10 (10), 1296 (2021).

DOI: [10.3390/pathogens10101296](https://doi.org/10.3390/pathogens10101296)



Article

Assessment of the Genetic Diversity of *Echinococcus multilocularis* from Copro-Isolated Eggs

Jenny Knapp ^{1,2,*}, Abdou Malik Da Silva ², Sandra Courquet ^{1,2} and Laurence Millon ^{1,2}

¹ Department of Parasitology-Mycolology, National Reference Centre for Echinococcoses, University Hospital of Besançon, 25030 Besançon, France; sandra.courquet@univ-fcomte.fr (S.C.); lmillon@chu-besancon.fr (L.M.)

² UMR CNRS 6249 Laboratoire Chrono-Environnement, UMR CNRS 6249 Université Bourgogne-Franche-Comté, 16 Route de Gray, 25030 Besançon, France; abdou_malik.da_silva@univ-fcomte.fr

* Correspondence: jknapp@univ-fcomte.fr; Tel.: +33-370-632-106

Abstract:

The genetic diversity of the parasite *Echinococcus multilocularis*, the infectious agent of alveolar echinococcosis, is generally assessed on adult worms after fox necropsy. We aimed to investigate *E. multilocularis* polymorphism through the microsatellite EmsB marker using a noninvasive approach. We tested batches of isolated eggs (1, 5, and 10) from 19 carnivore feces samples collected in a rural town located in a highly endemic area in France to determine the best strategy to adopt using a minimal quantity of parasite DNA while avoiding genetic profile overlapping in the analysis. Several molecular controls were performed to formally identify the Taeniidae eggs. In total, 112 egg-batches were isolated and 102 EmsB electrophoregrams were obtained in duplicate. Quality sorting was performed through the Pearson correlation coefficient (r) between each EmsB duplicate. Forty-nine batches with $r > 0.9$ remained in the analysis, mainly 5- or 10-egg batches. Three EmsB profiles were emphasized by hierarchical clustering and matched those from human lesions and adult worms previously genotyped and collected in the same area. We show that the genetic diversity of the parasite can be assessed from isolated *E. multilocularis* eggs in a spatiotemporal context using a noninvasive approach.

Keywords:

Echinococcus multilocularis; Taeniidae egg; EmsB marker; molecular epidemiology; genetic diversity.

4.1. Introduction

Echinococcus multilocularis is a cestode responsible for alveolar echinococcosis disease. This parasite involves carnivores and herbivores in its life cycle, the red fox *Vulpes vulpes* being the main definitive host in Europe, and rodent micro-mammals as intermediate hosts [2]. Domestic animals, such as dogs (*Canis lupus familiaris*) and cats (*Felis catus*), can harbor the parasite, to a lesser extent [3], but can constitute a true threat in the spreading and transmission of the pathogen. Humans are involved in the life cycle and constitute a dead-end host for the parasite in the absence of predation. The infection is due to the accidental ingestion of eggs released in canid feces. Moreover, the presence of *E. multilocularis* eggs in cat feces collected in the field was previously demonstrated [4,5]. AE develops mostly in the liver, mimicking cancer, and can be lethal in untreated or inadequately treated cases [6]. However, it is now well accepted that only 1% of people who ingest the parasite actually develop the disease [7].

In definitive hosts, the parasite attaches to the wall of the small intestine wall using its double hanging system (two rows of hooks and four muscular suckers on the scolex) [8]. The parasite body consists of reproductive units, the proglottids, containing eggs, the reproduction of the parasite being mainly hermaphroditic. The terminal proglottid contains fertilized eggs, which are hexacanth embryos surrounded by several layers, ensuring its resistance out-side when released from the host with the feces. Oncospheres, which represent the first larval stage, are released from eggs through the action of proteolytic enzymes in the digestive system of intermediate hosts [8]. Outside, the eggs are highly resistant to environmental conditions, especially cold (remaining infectious after 240 days at -18°C, killed after 48 h at -80°C) but are sensitive to desiccation (killed after 3 h at 43°C at 85-95% relative humidity) [9]. *Taenia* spp. eggs are microscopically indistinguishable from one another and molecular biology is required to determine the species (Knapp et al., submitted paper).

The parasite is spread in the environment by carnivores from endemic to hitherto *E. multilocularis*-free areas and its emergence or re-emergence is the subject of several recent studies [10]. Assessment of the prevalence in red foxes can be performed through, for example, national epidemiological campaigns [11]. However, fine spatiotemporal studies on the dispersion of the parasite can only be performed through the use of molecular markers [12]. As the parasite is a hermaphroditic species, it shows low genetic diversity [13], especially in the nucleotide genome [14]. However, its geographical dispersion can be assessed from microsatellite analyses. This is true for the tandemly repeated microsatellite EmsB [15].

Approximately 40 copies of this microsatellite is present in the *E. multilocularis* genome (located on chromosome 5) [16] and has been used in a number of studies on intermediate and definitive hosts at different geographical levels [17–26], notably to better understand the origin of the parasite in Europe [27]. It was shown that, at a local scale, the strains detected with an EmsB profile are shared and circulate among intermediate and definitive hosts and can be monitored over several years [26].

However, the samples analyzed in the aforementioned studies were isolated from adult worms following the necropsy of foxes and worm counting techniques were used, such as the segmental sedimentation and counting technique (SSCT) [28], or they were isolated from metacestode samples from micro-mammals or other intermediate hosts, necropsied animals, or surgery for humans. Necropsy is clearly not an option for studies conducted on domestic animals or pets. The aim of the present study was 1/ to develop a high-quality EmsB genotyping method that can be performed on *E. multilocularis* eggs isolated from carnivore stool samples and 2/ to assess the feasibility of conducting a genetic diversity study on *E. multilocularis* from noninvasive environmental sampling. Moreover, we attempted to assess the extent to which domestic or peri-domestic cycles are linked to and maintained by sylvatic cycles through definitive hosts.

4.2. Materials and Methods

4.2.1. Copro-samples, egg isolation and DNA purification

From a collection of faecal samples of carnivores (n=1191) [4], 19 faeces positive for *E. multilocularis* *rrnL* quantitative PCR (qPCR) on DNA stool extracts (QIAmp Fast DNA stool Minikit, Qiagen, Hilden, Germany), were selected for egg isolation [4]. They were sampled in a rural settlement from the Eastern part of France, in a historical endemic area. The host identity was determined by a host faecal PCR test through a qPCR assay, as the presence of *E. multilocularis* DNA and checking the absence of PCR inhibitors [32]. Briefly, the targeted DNA (*E. multilocularis* DNA, host DNA and internal control plasmid) is detected through a 45-cycles qPCR in presence of specific Taqman probes. Presence of *E. multilocularis* DNA was determined for cycle threshold (Cq) < 45, for host DNA Cq < 26, and for the internal control Alea Cq < 37 cycles [32]. The genetic host individual identity was determined by performing a microsatellite analysis, based on 14 microsatellite markers specific to red fox (Da

Silva et al., in prep) and 22 microsatellite markers for dog (Knapp et al., in prep.), one gender target was applied for the two carnivores. Cat faeces were not individually identified.

From the results of the *E. multilocularis* qPCR assays, a sucrose flotation technique was performed, as described in Matsuo and Kimiya (2005) and Escotte-Binet et al. (2019) [34,35]. This sucrose method combined with microscopy observation and qPCR proved to have a sensitivity of 100% for the detection of 10 eggs in 5 g of faeces and the potential recovery of only one egg in 5 g of faeces [4]. Briefly, eggs were concentrated and isolated based on differential specific gravity (SG) between eggs and particles. An amount of 5 g of carnivore faeces was dispersed in 20 ml of 0.1% Tween 80. Eggs contained in the flotation pellets were separated from organic particles. The flotation mixture was centrifuged at 2500g for 10 min and the pellet was re-suspended in distillate water and deposited on a sucrose solution with SG = 1.27. After centrifugation, the supernatants containing the eggs were concentrated in < 1 ml volume. Taeniid eggs were then counted (**Table 8**) and isolated using a Leica DMI3000-B micromanipulator (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), equipped with an inverted microscope in order to identify taeniid eggs at a 400x magnification. Depending of the quantity of available taeniid eggs from the flotation pellets, batches were constituted with 1, 5, 10 eggs or pellet eggs. DNA from egg batches was purified using the QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), after an overnight digestion and following the manufacturer recommendations, and finally eluted in a volume of 50 µl of the provided buffer. Each egg batch was tested for the presence of *E. multilocularis* DNA with the *E. multilocularis*-specific qPCR (part of the mitochondrial *rrnL* gene), as the presence of PCR inhibitors with the internal control test Alea [32]. For one batch per stool or in case of non-amplification of the *rrnL* gene part or EmsB microsatellite, one additional PCR was performed, the multiplex PCR developed by Trachsel et al. [1], distinguishing *E. multilocularis* (395 bp), *E. granulosus* (117 bp) and *Taenia* sp. (267 bp) species. Multiplex PCR amplicons were visualized by electrophoresis, in which 8 µL of the PCR product was loaded onto 1.5% (w/v) agarose gels, stained with 10% SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad, USA) in 1X tris-acetate EDTA solution, run for 30 min at 100 V, and viewed under UV light using a Gel Logic 100 Imaging System and the software Scientific Imaging System v3.6.1 (Kodak, New Haven, CT). For *Taenia* sp. specific band visualized for the multiplex PCR, a confirmation of the species identity was performed through a Sanger sequencing on the PCR products, focused on the Ces5seq primer [1].

Table 8 : Collection of 19 carnivore faeces, details on sampling and flotation, molecular identification of the host and the parasite.

Host ID	Faeces code	Molecular host	Sampling date	No eggs ¹	qPCR Cq value ²			Batch species typing	No of batches per egg-batch type				
					Host	Em rrrL	Alea		1	5	10	pellet	Total
FOX005	17AL039	<i>Vulpes vulpes</i>	20/07/2017	37	25.85	28.66	32.92	<i>Echinococcus multilocularis</i>	2	2	2	1	7
FOX005	17AL040	<i>Vulpes vulpes</i>	20/07/2017	118	22.2	31.24	33.86	<i>Echinococcus multilocularis</i>	2	2	2	0	6
FOX005	17AL041	<i>Vulpes vulpes</i>	20/07/2017	38	22.62	30.08	33.49	<i>Echinococcus multilocularis</i>	2	2	2	0	6
DOG001	17AL095	<i>Canis l. familiaris</i>	16/03/2017	47	21.31	41.04	35.63	<i>Echinococcus multilocularis</i>	2	2	2	0	6
FOX004	17AL224	<i>Vulpes vulpes</i>	23/05/2017	322	24.3	33.76	34.99	<i>Echinococcus multilocularis</i>	2	2	2	1	7
FOX020	17AL225	<i>Vulpes vulpes</i>	23/05/2017	45	23.7	37.59	35.53	<i>Echinococcus multilocularis</i>	2	2	2	0	6
ND	17AL226	<i>Vulpes vulpes</i>	23/05/2017	272	27.53	31.44	34.55	<i>Echinococcus multilocularis</i>	2	2	2	0	6
ND	17AL228	<i>Vulpes vulpes</i>	23/05/2017	75	32.25	33.14	35.37	<i>Echinococcus multilocularis</i>	2	2	2	0	6
FOX004	17AL244	<i>Vulpes vulpes</i>	23/05/2017	42	24.64	36.50	34.90	<i>Echinococcus multilocularis</i>	2	2	2	0	6
FOX017	17AL245	<i>Vulpes vulpes</i>	23/05/2017	39	27.91	39.58	34.81	<i>Echinococcus multilocularis</i>	2	2	2	0	6
CAT001	17AL286	<i>Felis catus</i>	20/07/2017	21	21.57	38.61	33.92	<i>Echinococcus multilocularis</i>	2	2	2	1	7
ND	18AL297	<i>Vulpes vulpes</i>	24/05/2018	5	26.79	37.94	33.56	<i>Echinococcus multilocularis</i>	2	2	1	0	5
DOG010	18AL300	<i>Canis l. familiaris</i>	12/07/2018	9	21.75	38.52	33.71	<i>Echinococcus multilocularis</i>	2	2	1	0	5
FOX031	18AL320	<i>Vulpes vulpes</i>	22/11/2018	30	23.09	38.97	33.11	<i>Echinococcus multilocularis</i>	2	2	2	0	6
FOX031	18AL344	<i>Vulpes vulpes</i>	22/11/2018	27	30.07	37.51	33.22	<i>Echinococcus multilocularis</i>	2	2	2	0	6
FOX032	18AL460	<i>Vulpes vulpes</i>	20/09/2018	796	22.82	31.64	34.59	<i>Taenia crassiceps</i>	1	2	2	0	5
FOX039	18AL599	<i>Vulpes vulpes</i>	22/11/2018	117	23.39	30.09	34.05	<i>Echinococcus multilocularis</i>	2	2	2	0	6
FOX030	19AL127	<i>Vulpes vulpes</i>	11/04/2019	9	27.34	35.72	34.46	<i>Echinococcus multilocularis</i>	2	1	1	0	4
ND	19AL419	<i>Canis l. familiaris</i>	14/11/2019	20	21.06	30.59	33.41	<i>Echinococcus multilocularis</i>	2	2	2	0	6
Total No of batches									37	37	35	3	112

¹ No of taeniid eggs per 100 µL of concentrated flotation supernatant available after the flotation technique. ² qPCR performed on the total DNA extract from carnivore stool

4.2.2. EmsB amplification and fragment size analyses

The EmsB PCR reaction mixture was done in 18 µl final volume with the Multiplex PCR master mix containing 2.8 U of HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen, Hilden, Germany), 0.1 µM of each primer final concentration (EmsB A: 5'-FAM-GTGTGGATGAGTGTGCCATC-3', EmsB C: 5'-CCACCTTCCCTACTG-CAATC-3'), 3% DMSO, and up to 1 µl of purified DNA. PCR were performed in a Biometra T3 thermocycler (Whatman Biometra, Goettingen, Germany) as described by Knapp et al. [36]. For each of these runs, a plasmid construction, the EmsB calibrator [37] was used to allow comparison of the fragment size analyses [25]. Four EmsB patterns are included in the plasmid, corresponding to (CA)₉₋₁₁ (GA)₁₁ repeats respectively, two microsatellites having the same size, with 190 bp, the second with 192 bp and the last one with 194 bp [37]. Each DNA extract was amplified in duplicate.

The fragment size analyses were performed from the dyed PCR products by capillary electrophoresis on a SeqStudio Genetic Analyzer automaton (Applied Biosystems, Foster City, CA). Electrophoregrams obtained from fragment size analyses were analysed online by using the Microsatellite Analysis application available on ThermoFisher Scientific website.

4.2.3. Hierarchical clustering analysis

Peaks and their associated fluorescence intensity heights present on electrophoregrams were noticed. These two parameters were used to (i) compare genotyping quality made on each sample in duplicate and to (ii) study the genetic diversity of the parasite in the study area. A hierarchical clustering analysis was performed, using the Euclidean distance and the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) [23,38], applied on the whole batches tested or after a sort on the Pearson correlation coefficient applied. RStudio software (R version 3.5.1) [39] were used to perform clustering analyses, by using package pvclust [40]. The genetic distance threshold was applied at 0.1, under this threshold two samples are considered to have an identical EmsB profile [36]. (i) In order to compare the quality of the duplicate PCR for each sample, a Pearson correlation coefficient (r) were determined [23] and different levels were applied to determine the relevance of the EmsB PCR duplicates quality (selection of duplicates with $r > 0.75$, > 0.8 , > 0.9 or the whole batches considered and applied to the dendrogram). (ii) The genetic diversity among the samples was assessed by determining the EmsB profiles. For that, three steps were adopted by dendrogram building. First, couples of PCR duplicates were applied to the dendrogram. To be validated, a duplicate PCR has to be

grouped in the same profile. Secondly, for a given sample, the PCR duplicate presenting the higher fluorescence intensity sum was hold back. Third, the selected egg-batches from the present study were compared to French and Swiss *E. multilocularis* samples genotyped and publicly available on the EmsB Website for *Echinococcus* Typing (EWET) project, by adding them to a dendrogram construction [37].

EmsB profiles harboured by individually identified animals were studied by data comparison (Table 8).

4.3. Results

4.3.1. Copro-samples and egg isolation

The total copro-DNA extracts of the 19 carnivore faeces selected for the study, were positive for *E. multilocularis* *rrnL* quantitative PCR with Cq values ranged from 28.66 to 41.04, with a Cq mean of 34.88 (95% confidence interval (CI): 32.99-36.76). No PCR inhibitors were detected (mean Cq Alea: 34.21, CI: 34.62-33.80). After sucrose flotation, 112 batches of 1, 5, 10 eggs and pellets of eggs were isolated from the available specimens, corresponding to a minimum of 602 isolated eggs under microscope. For each stool, a batch (5 or 10 eggs) was tested by using the multiplex Trachsel PCR [1], which confirmed the species of the parasite by a specific band detected on PCR product electrophoreses.

The 112 egg-batches were analysed using the *rrnL* qPCR for species confirmation. Detailed results are presented in the Supplementary data Table S1 (Annex D2) and summarized in the **Figure 23**. A total of 105 batches were positive (Cq value < 45 cycles). The seven remaining batches, originated from four faeces were negative (Cq > 45 cycles). One of these batches was also negative for the multiplex Trachsel and the EmsB PCRs, this sample probably did not contain *E. multilocularis* DNA. The six remaining batches were positive with the multiplex Trachsel PCR, with a band specific to *Taenia* sp., and *Taenia* identification was confirmed by sequencing.

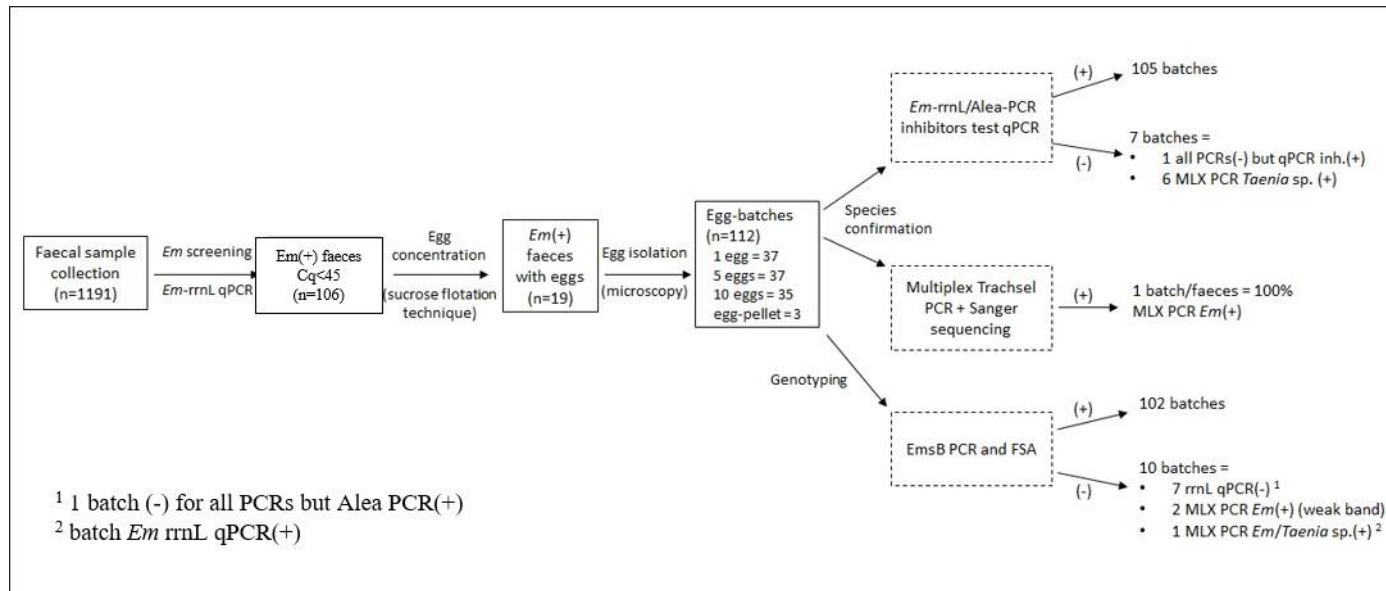


Figure 23 : Results of *Echinococcus multilocularis* (*Em*) identification and EmsB typing on egg batches isolated from carnivores faeces with *E. multilocularis* DNA detected. *E. multilocularis* identification was first performed with the rrnL qPCR coupled to the qPCR inhibitor test Alea. Species confirmation was performed by the multiplex Trachsel PCR technique (MLX). *E. multilocularis* genotyping was performed through an EmsB PCR followed by a fragment size analysis (FSA).

Secondly, the genotyping using EmsB PCR was performed in duplicate on the whole 112 batches and electrophoregrams for fragment size analysis were obtained for 102 batches of eggs. The 10 remained batches, for which EmsB PCR gave no amplification were isolated from seven faeces. Seven of these 10 batches were negative for the *E. multilocularis* *rrnL* qPCR. In three remaining batches, *E. multilocularis* DNA was detected by the other PCR techniques used. From the multiplex Trachsel PCR results, in the negative EmsB batches, six batches presented a *Taenia* specific band (267 bp), for two batches a weak *E. multilocularis* specific band (395 bp) (data not shown) and one sample presented a double band (*E. multilocularis* and *Taenia* spp. bands).

After a Sanger sequencing on the multiplex Trachsel PCR products with a specific *Taenia* spp. band, the presence of the parasite *Taenia crassiceps* was detected (100% identity with the Genbank reference sequence MN505206.1), in two faeces, and *Taenia polyacantha* (100% identity with LT635753.1), in two faeces.

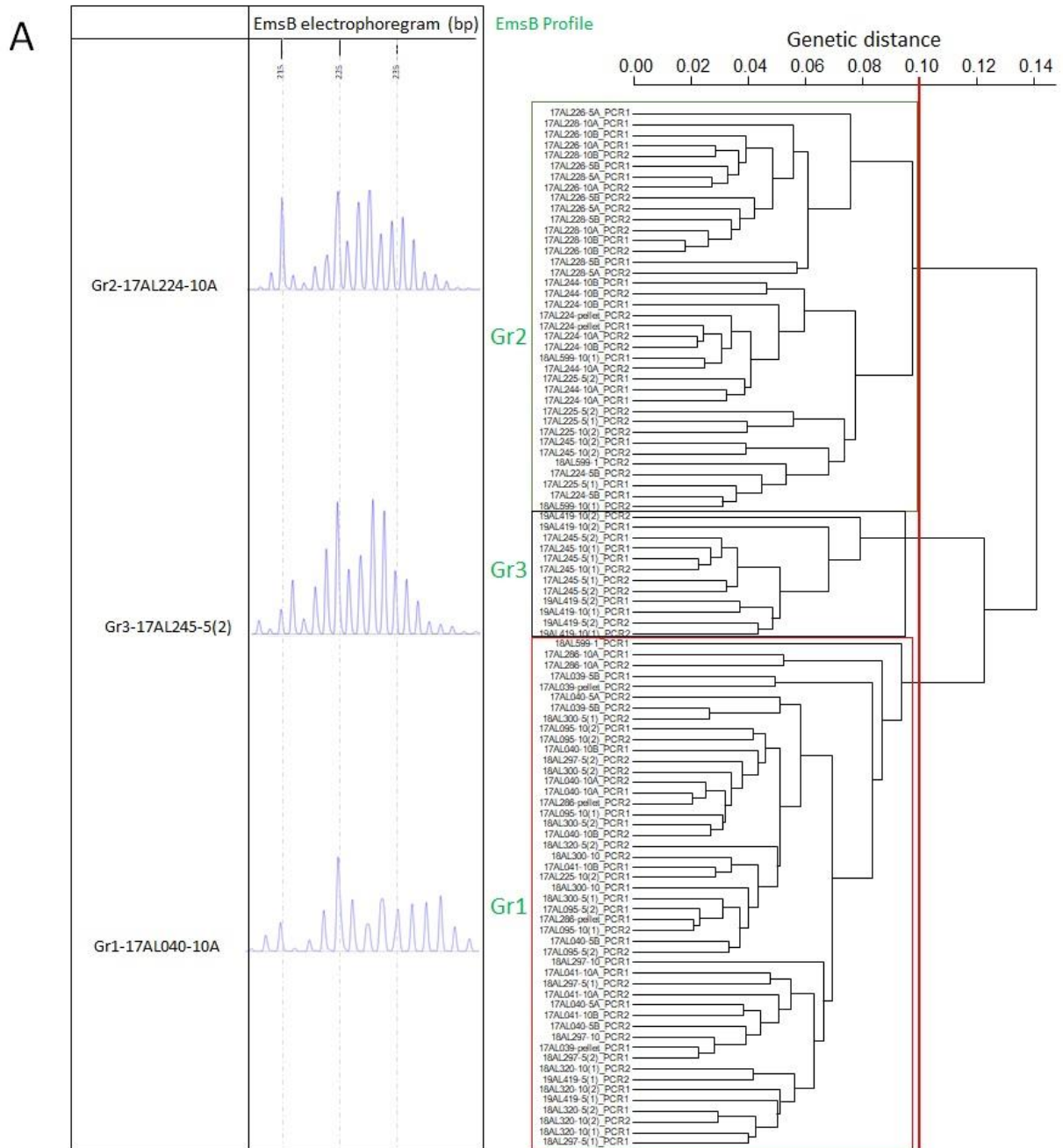
4.3.2. EmsB fragment size analysis and comparison of Pearson coefficient sorting

To ensure quality of genotyping, all EmsB PCR were performed in duplicate for each batch, and reproducibility of electrophoregram patterns between the PCR duplicates was assessed through Pearson coefficient scores.

Dendrogram were built with the whole EmsB positive batches ($n = 102$) and secondly with a selection of batches sorted in function of the Pearson coefficient scores ($r > 0.75$, > 0.8 and > 0.9). Most of the EmsB patterns fit into three main profiles (Gr1, Gr2 and Gr3) (**Figure 24A**). Some others patterns were either unreadable or non-reproducible, and referred to as “out of the main profiles”. When considering the dendrogram gathering all the 102 batches, the patterns of the two duplicates were classified in the same profile for 61 batches (29 batches in Gr1, 25 batches in Gr2 and 6 in Gr3) [Supplementary data Table S1 (Annex D2) and **Figure 24A**]. For 20 batches, only one electrophoregram pattern among the duplicate was clustered in one of the main profiles, the other one being out of the profiles. For two batches, patterns of each duplicate were clustered in two separated profiles. For 20 batches, the patterns of the two duplicates were classified out of the profiles.

For the dendrogram built with pattern duplicates presenting $r > 0.75$ ($n=73$ batches), 59 batches presented both patterns in the same profile, 8 batches presented one pattern classified out of profiles, 3 batches classified in two different profiles, 3 batches presented the two duplicate

patterns out of profile. For $r > 0.8$ (68 batches), 58 batches presented both patterns in the same profile, 7 batches were classified out for one of the pattern duplicate, 2 batches classified in two different profiles and 1 batch were out for the two pattern duplicates. Finally for $r > 0.9$ (49 batches), 47 batches presented both patterns in the same profile, 2 batches classified in two different profiles and no batches were classified out (**Table 9**).



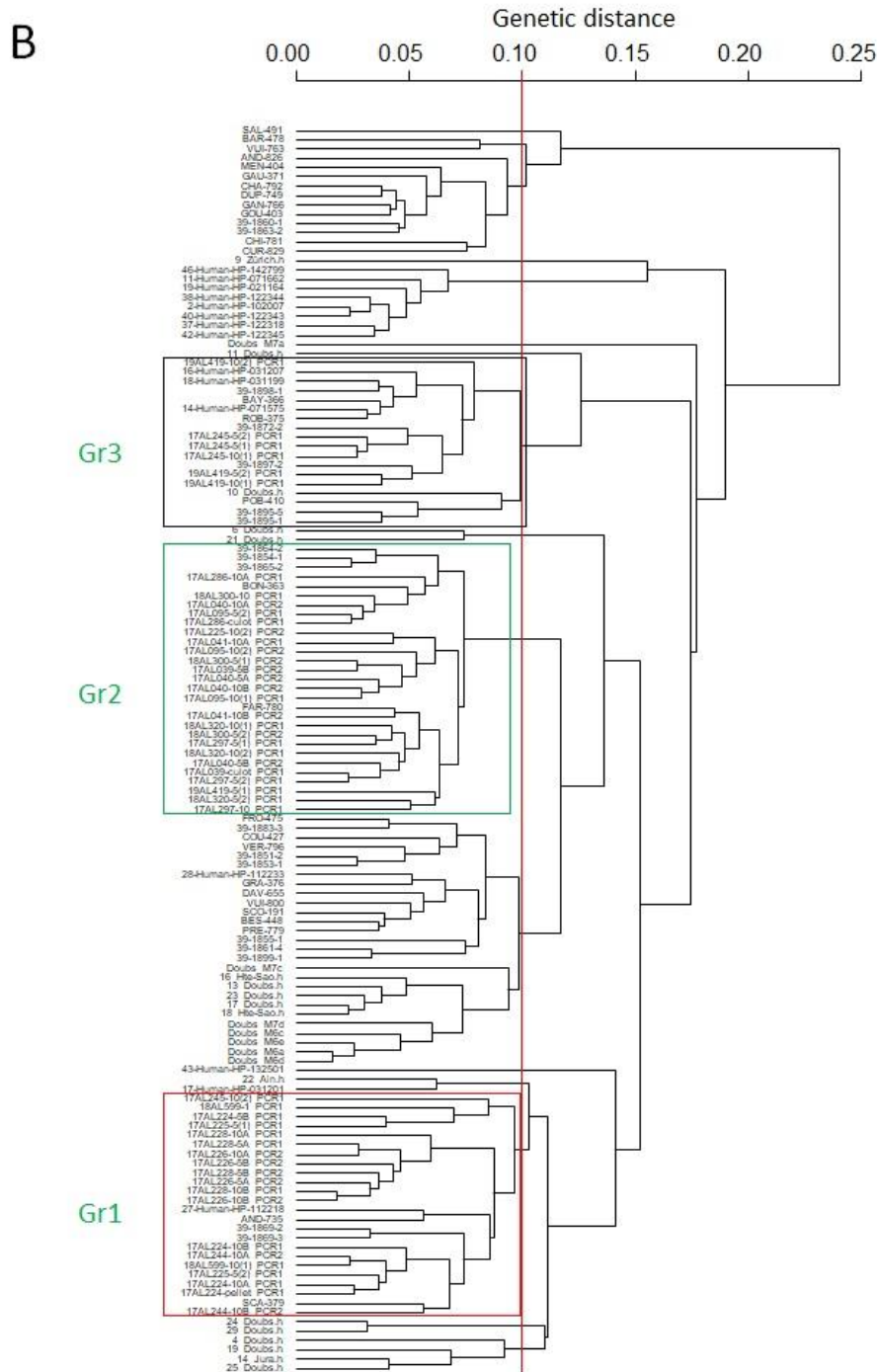


Figure 24 : Dendrograms constructed from EmsB amplification data, after a hierarchical clustering analysis based on Euclidean distances and unweighted pair group method. A genetic threshold of 0.1 was applied for EmsB profiles discrimination. Representative electrophoregrams are provided for each profile. (A) dendrogram composed of EmsB PCR pattern duplicates (PCR1, PCR2) on 49 egg-batches from 17 carnivore faeces which present a Pearson correlation coefficient > 0.9. (B) Dendrogram composed of the 49 egg-batches, human lesions (n=60) and adult worms (n=25) previously genotyped.

Table 9 : Egg-batches genotyping after dendrogram construction and Pearson correlation coefficient (r) sorting. Gr1, Gr2 and Gr3 corresponding profile where EmsB PCR pater duplicates clustered together in a profile. Gr1/Gr2 or Gr1/Gr3 correspond to EmsB PCR pattern duplicate classified in separate profiles. OT for samples Out of Threshold. / for samples removed from the analysis after r sorting. NE for batches not available.

Faeces code	Full batches							r > 0.75						r > 0.8						r > 0.9								
	1	1	5	5	10	10	p	1	1	5	5	10	10	p	1	1	5	5	10	10	p	1	1	5	5	10	10	p
17AL039	OT	OT	G1 ¹	G1	G1	G1	G1	/	/	/	G1	G1	G1	G1	/	/	/	G1	G2	G3	G1	/	/	/	G1	/	/	G1
17AL040	OT	G3 ¹	G1	G1	G1	G1	-	/	/	G1	G1	G1	G1	-	/	/	G1	G1	G1	G1	-	/	/	G1	G1	G1	G1	-
17AL041	G1 ¹	G1	G1	G1	G1	G1	-	G1 ¹	G1	G1	G1	G1	G1	-	G1 ¹	/	G1	G1	G1	G1	-	/	/	/	/	G1	G1	-
17AL095	NE	OT	G1	G1	G1	G1	-	NE	/	G1	G1	G1	G1	-	NE	/	G1	G1	G1	G1	-	NE	/	/	G1	G1	G1	-
17AL224	G2 ¹	G2 ¹	G2 ¹	G2	G2	G2	G2	/	G2 ¹	G2 ¹	G2	G2	G2	G2	/	G2 ¹	G2 ¹	G2	G2	G2	G2	/	/	/	G2	G2	G2	G2
17AL225	OT	NE	G2	G2	G2	G1/G2	-	OT	NE	G2	G2	G2	G1/G2	-	OT	NE	G2	G2	G2	G1/G2	-	/	NE	G2	G2	/	G1/G2	-
17AL226	G2 ¹	OT	G2	G2	G2	G2	-	G2 ¹	/	G2	G2	G2	G2	-	G2 ¹	/	G2	G2	G2	G2	-	/	/	G2	G2	G2	G2	-
17AL228	G2 ¹	G2 ¹	G2	G2	G2	G2	-	/	G2 ¹	G2	G2	G2	G2	-	/	/	G2	G2	G2	G2	-	/	/	G2	G2	G2	G2	-
17AL244	OT	NE	G2	G2	G2	G2	-	/	NE	G2	G2	G2	G2	-	/	NE	G2	G2	G2	G2	-	/	NE	/	/	G2	G2	-
17AL245	NE	G2 ¹	G3	G3	G3	G2	-	NE	G2 ¹	G3	G3	G3	G2	-	NE	G2 ¹	G3	G3	G3	G2	-	NE	/	G3	G3	G3	G2	-
17AL286	G1 ¹	NE	OT	G1 ¹	G1	G1 ¹	G1	/	NE	/	/	G1	OT	G1	/	NE	/	/	G1	/	G1	/	NE	/	/	G1	/	G1
18AL297	G2	OT	G1	G1	G1	-	-	/	/	G1	G1	G1	-	-	/	/	G1	G1	G1	-	-	/	/	G1	G1	G1	-	-
18AL300	G1 ¹	OT	G1	G1	G1	-	-	/	/	G1	G1	G1	-	-	/	/	G1	G1	G1	-	-	/	/	G1	G1	G1	-	-
18AL320	G1 ¹	NE	G1 ¹	G1	G1	G1	-	OT	NE	G1/G3	G1	G1	G1	-	/	NE	/	G1	G1	G1	-	/	NE	/	G1	G1	G1	-
18AL344	OT	OT	G2 ¹	OT	OT	G1 ¹	-	/	/	G1 ¹	/	/	/	-	/	/	G1 ¹	/	/	/	-	/	/	/	/	/	/	-
18AL460	NE	-	NE	OT	NE	NE	-	NE	-	NE	/	NE	NE	-	NE	-	NE	/	NE	NE	-	NE	-	NE	/	NE	NE	-
18AL599	G2	OT	G2	G1/G2	G2	G2	-	G2	/	G2	G1/G2	G2	G2	-	G2	/	G2	G1/G2	G2	G2	-	G1/G2	/	/	/	G2	/	-
19AL127	OT	OT	OT	-	OT	-	-	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/	-	/	-	-
19AL419	G1 ¹	G3 ¹	G1	G3	G3	G3	-	/	G3 ¹	G1	G3	G3	G3	-	/	G3 ¹	G1	G3	G3	G3	-	/	/	G1	G3	G3	G3	-

¹ EmsB PCR pattern duplicates for which only one fragment size analysis was classified in a profile, the other being classified out.

The batches sorted with $r > 0.9$ and the PCR duplicate patterns with the highest electrophoregram fluorescence intensity were used (n=49 batches) to performed a hierarchical clustering analysis with AE lesions from French and Swiss patients (n=60), and fox adult worms from the Doubs and Jura French *départements* (n=25) of the studied area. The three profiles previously described were found clustered with human lesions and adult worm samples (**Figure 24B**). The patients clustered with the egg batches were all from the Franche-Comté *Région* or Swiss neighbouring cantons. The profile Gr1 was associated to the previously described P4/P5 [26], two close profiles in humans, the profile Gr2 was associated to P1/P3 and the profile Gr3 to P9, a cross-border profiles in humans.

4.3.3. Correlation between EmsB profiles and individual identification of carnivores

From the 19 carnivore faeces, 8 different foxes and two dogs were identified with a number of copro-samples per individual ranged from one to three (**Table 8**). Only one scat was attributed to cat. Three fox faeces and one dog scat remained without individual identification. Foxes presented the three EmsB profiles described from eggs, dogs the Gr1 and Gr3 profiles and cat the Gr1 profile.

4.4. Discussion

Perform genotyping on individual *E. multilocularis* eggs is challenging for several purposes. The need for improving this method is important in a non-invasive approach, in a context of laboratory animal studies or wild and domestic animals surveys [28]. Indeed, in both cases, researches can be lead without animal sacrifices. Moreover, in the cases of *E. multilocularis* circulation study in the environment among animals, follow-up for contamination, re-contamination of individuals, non-invasive approaches are required. Until now, EmsB genotyping of *E. multilocularis* specimens in animals was conducted after necropsy, either for definitive or intermediate hosts [22,24,25,27,29,30], on isolated adult worms or lesion resections. DNA amount was not limiting in this context. In the case of genotyping performed on isolated eggs, few quantities of DNA are available, but theoretically EmsB PCR is possible on 1 fg of *E. multilocularis* DNA. A single egg was estimated to contain 8 pg of nuclear DNA [31], and certainly more considering the total genomic and mitochondrial DNA. However, an EmsB genotyping on *E. multilocularis* eggs isolated from environmental samples was so far never performed and needed to be challenged.

The first challenge was to isolate specimens of *E. multilocularis* eggs, in carnivores potentially infected by several Taeniidae species. Microscopic examination permit the identification at the Taeniidae family level. Species identification is only possible by molecular diagnosis. From the 19 carnivore faeces positive with the *rrnL* qPCR [32] performed on the total DNA extract, one stool was found to contain a majority of other Taeniidae eggs, identified by sequencing as *Taenia crassiceps*, a common tapeworm in red fox [33], and no amplification of the *EmsB* target on the studied egg batches was observed in several batches. However, for this sample, *E. multilocularis* eggs were certainly present but in minority, as an *EmsB* amplification was possible for one batch. For individual batch, the combination of the *rrnL* qPCR and the *EmsB* PCR assays permit an efficient identification of *E. multilocularis*. Species confirmation was reinforced by the multiplex Trachsel PCR [1]. The specificity of the *rrnL* qPCR assay was previously tested [32] and was confirmed here. However, multi-infections with different *Taenia* spp. and *E. multilocularis* could not be detected by this technique. A combination of three PCR (*rrnL* qPCR, *EmsB* and the multiplex Trachsel PCR) is then required for a formal identification.

The second challenge was in the low DNA quantity available, especially for the 1-egg batches. *EmsB* PCR was then performed in duplicate to control the reproducibility of the results. From the dendrogram built on the whole available electrophoregrams (from 102 batches), 19.6% of the PCR duplicates (20/102 batches) were not classified in the three main profiles, 70% of these non-classified batches, being 1-egg batches. Quality sorting through Pearson correlation coefficient between *EmsB* pattern duplicates allowed us to select batches with reproducible results that could be kept in the genetic analysis. For $r > 0.75$, 95.9% of samples (70/73 batches) were classified among Gr1, Gr2 or Gr3, for $r > 0.8$, 98.5% of samples (67/68 batches) was classified, and finally all the samples were classified for $r > 0.9$. This result emphasizes the necessity to control by duplicate PCR the reproducibility of *EmsB* electrophoregrams, combined to a Pearson coefficient sorting. However, by this process, it appears difficult to keep 1-egg batches into the analysis. After the $r > 0.75$ sorting, only eight 1-egg batches remained in the analysis, 2 of them having a PCR duplicate correctly classified in the same profile. Reproducibility of the *EmsB* PCR was more efficient from 5 to 10-eggs batches, therefore a genotyping analysis on a single egg requires the analysis of more 1-egg batches or more fresh samples, isolated by sucrose flotation more rapidly after sampling. A time lapse of one to three years was observed between sampling and the *EmsB* amplification, likely compromising good results.

However, most of faeces presented a unique profile among eggs of a batch, except 3 faeces with EmsB pattern duplicates clustered in different profiles. This could reflect the presence of rare mixed infections among foxes and dogs, exposing possible multi-infections through intense predation of preys [27]. Even if foxes and dogs were infected with different EmsB genotypes, by the adopted procedure, non-reproducibility of results could be detected among batches. From adult worms genotyping in a European study, several genotypes were described in the same foxes [27]. Foxes certainly harboured different *E. multilocularis* populations of worms, from different events of predation. These worms certainly were at different maturation stage at the necropsy examination. The fact that no profiles overlapping on electrophoregrams was observed could be due to the analysis of single *E. multilocularis* population of eggs, sequentially released in the sampled stools at this moment. This result permits to consider the EmsB genotyping from *E. multilocularis* 5 to 10 egg batches with confidence.

The diversity of the parasite was then assessed on a limited geographical area (3 km²) and the presence of three EmsB profiles was emphasized among animals. Wild and domestic animals seem to shared two profiles on the three described, the three dogs and the cat sharing only G1 and G3 with fox, whereas fox harbours the three profiles. Foxes probably transmitted *E. multilocularis* to domestic animals and not the contrary, but further investigations have to be performed in order to confirm that result. Moreover, individual identification of animals was possible for some of them. Two foxes being the host of several stools presented one profile each. Further investigations have to be led in this direction in order to assess the spatio-temporal spreading of the parasite among carnivore hosts.

The combination of the EmsB results obtained on egg batches, adult worms and human lesions confirmed the description of the three profiles. The EmsB profiles from egg batches matched only profiles from parasite collected in foxes or patients from the same region or from the neighbouring country, Switzerland, confirming the local circulation of these three profiles among hosts.

4.5. Conclusions

This study tested the EmsB marker on a new matrix, isolated eggs from noninvasive sampling. A protocol was then implemented to ensure the relevance of the results by specific PCR controls and EmsB analysis in duplicate. The use of 5 to 10-egg batches was found to be sufficient to study the genetic diversity of *E. multilocularis* in the environment using a spatiotemporal

approach. Investigations on larger geographical areas could be conducted using this procedure to assess parasite spreading among wild and domestic animals on larger studied endemic regions.

4.6. Patents

Supplementary Materials (See Annex D1 and D2): The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1. Dendrograms constructed using (a) all available EmsB PCR duplicates (102 batches) and after Pearson correlation coefficient sorting (B to D), Table S1. Egg batch collection, molecular identification, and EmsB genotyping depending on the Pearson correlation coefficient (r) sorting. Gr1, Gr2, and Gr3 correspond to EmsB duplicates clustered in the same profile. Profiles Gr1/Gr2 or Gr1/Gr3 correspond to EmsB PCR duplicates classified in separate pro-files. OT: samples out of threshold. /: samples removed from the analysis after r sorting.

Author Contributions: Conceptualization, J.K., A.M.D.S., and L.M.; methodology, J.K. and A.M.D.S., software, J.K.; validation, J.K. and A.M.D.S.; formal analysis, J.K.; investigation, J.K., A.M.D.S. and S.C.; resources, J.K., A.M.D.S. and S.C.; data curation, J.K., A.M.D.S. and S.C.; writing—original draft preparation, J.K.; writing—review and editing, J.K., A.M.D.S., S.C. and L.M.; visualization, J.K., A.M.D.S. and L.M.; supervision, L.M.; project administration, J.K. and L.M.; funding acquisition, L.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Conseil Régional de Bourgogne Franche-Comté, grant number 2019Y-09121.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We are very grateful to Bénédicte Rognon from the Biomnigene platform for technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Trachsel, D.; Deplazes, P.; Mathis, A. Identification of Taeniid Eggs in the Faeces from Carnivores Based on Multiplex PCR Using Targets in Mitochondrial DNA. *Parasitology* 2007, *134*, 911–920, doi:10.1017/S0031182007002235.
2. Vuitton, D.A.; Zhou, H.; Bresson-Hadni, S.; Wang, Q.; Piarroux, M.; Raoul, F.; Giraudoux, P. Epidemiology of Alveolar Echinococcosis with Particular Reference to China and Europe. *Parasitology* 2003, *127 Suppl*, S87-107.
3. Romig, T.; Deplazes, P.; Jenkins, D.; Giraudoux, P.; Massolo, A.; Craig, P.S.; Wassermann, M.; Takahashi, K.; de la Rue, M. Ecology and Life Cycle Patterns of *Echinococcus* Species. *Adv. Parasitol.* 2017, *95*, 213–314, doi:10.1016/bs.apar.2016.11.002.
4. Da Silva, A.M.; Courquet, S.; Raoul, F.; Rieffel, D.; Giraudoux, P.; Millon, L.; Knapp, J. Assessment of the Exposure to *Echinococcus Multilocularis* Associated with Carnivore Faeces Using Real-Time Quantitative PCR and Flotation Technique Assays. *Int J Parasitol* 2020, *50*, 1195–1204, doi:10.1016/j.ijpara.2020.07.008.
5. Knapp, J.; Combes, B.; Umhang, G.; Aknouche, S.; Millon, L. Could the Domestic Cat Play a Significant Role in the Transmission of *Echinococcus Multilocularis*? A Study Based on QPCR Analysis of Cat Feces in a Rural Area in France. *Parasite* 2016, *23*, 42, doi:10.1051/parasite/2016052.
6. Eckert, J.; Deplazes, P. Biological, Epidemiological, and Clinical Aspects of Echinococcosis, a Zoonosis of Increasing Concern. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004, *17*, 107–135.
7. Beldi, G.; Müller, N.; Gottstein, B. L'échinococcose alvéolaire. *Forum Médical Suisse* 2017, *17*, 760–766, doi:10.4414/fms.2017.03046.
8. Thompson, R.; McManus, D. Aetiology: parasites and life-cycles. In *Manual WHO/OIE on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern*; 2002; Vol. Chapitre 1, p. 9.
9. Veit, P.; Bilger, B.; Schad, V.; Schäfer, J.; Frank, W.; Lucius, R. Influence of Environmental Factors on the Infectivity of *Echinococcus Multilocularis* Eggs. *Parasitology* 1995, *110 (Pt 1)*, 79–86.

10. Eckert, J.; Conraths, F.J.; Tackmann, K. Echinococcosis: An Emerging or Re-Emerging Zoonosis? *Int. J. Parasitol.* 2000, 30, 1283–1294.
11. Combes, B.; Comte, S.; Raton, V.; Raoul, F.; Boué, F.; Umhang, G.; Favier, S.; Dunoyer, C.; Woronoff, N.; Giraudoux, P. Westward Spread of *Echinococcus Multilocularis* in Foxes, France, 2005-2010. *Emerging Infect. Dis.* 2012, 18, 2059–2062, doi:10.3201/eid1812.120219.
12. Knapp, J.; Gottstein, B.; Saarma, U.; Millon, L. Taxonomy, Phylogeny and Molecular Epidemiology of *Echinococcus Multilocularis*: From Fundamental Knowledge to Health Ecology. *Vet Parasitol* 2015, 213, 85–91, doi:10.1016/j.vetpar.2015.07.030.
13. Haag, K.L.; Zaha, A.; Araújo, A.M.; Gottstein, B. Reduced Genetic Variability within Coding and Non-Coding Regions of the *Echinococcus Multilocularis* Genome. *Parasitology* 1997, 115 (Pt 5), 521–529, doi:10.1017/s0031182097001649.
14. Spotin, A.; Boufana, B.; Ahmadpour, E.; Casulli, A.; Mahami-Oskouei, M.; Rouhani, S.; Javadi-Mamaghani, A.; Shahriyar, F.; Khoshakhlagh, P. Assessment of the Global Pattern of Genetic Diversity in *Echinococcus Multilocularis* Inferred by Mitochondrial DNA Sequences. *Vet. Parasitol.* 2018, 262, 30–41, doi:10.1016/j.vetpar.2018.09.013.
15. Bart, J.M.; Knapp, J.; Gottstein, B.; El-Garch, F.; Giraudoux, P.; Glowatzki, M.L.; Berthoud, H.; Maillard, S.; Piarroux, R. EmsB, a Tandem Repeated Multi-Loci Microsatellite, New Tool to Investigate the Genetic Diversity of *Echinococcus Multilocularis*. *Infect. Genet. Evol.* 2006, 6, 390–400, doi:10.1016/j.meegid.2006.01.006.
16. Valot, B.; Knapp, J.; Umhang, G.; Grenouillet, F.; Millon, L. Genomic Characterization of EmsB Microsatellite Loci in *Echinococcus Multilocularis*. *Infect. Genet. Evol.* 2015, 32, 338–341, doi:10.1016/j.meegid.2015.03.040.
17. Afonso, E.; Knapp, J.; Tête, N.; Umhang, G.; Rieffel, D.; van Kesteren, F.; Ziadinov, I.; Craig, P.S.; Torgerson, P.R.; Giraudoux, P. *Echinococcus Multilocularis* in Kyrgyzstan: Similarity in the Asian EmsB Genotypic Profiles from Village Populations of Eastern Mole Voles (*Ellobius Tancrei*) and Dogs in the Alay Valley. *J. Helminthol.* 2015, 89, 664–670, doi:10.1017/S0022149X15000474.

18. Jenkins, E.J.; Peregrine, A.S.; Hill, J.E.; Somers, C.; Gesy, K.; Barnes, B.; Gottstein, B.; Polley, L. Detection of European Strain of *Echinococcus Multilocularis* in North America. *Emerging Infect. Dis.* 2012, *18*, 1010–1012, doi:10.3201/eid1806.111420.
19. Knapp, J.; Umhang, G.; Wahlström, H.; Al-Sabi, M.N.S.; Ågren, E.O.; Enemark, H.L. Genetic Diversity of *Echinococcus Multilocularis* in Red Foxes from Two Scandinavian Countries: Denmark and Sweden. *Food and Waterborne Parasitology* 2019, *14*, e00045, doi:10.1016/j.fawpar.2019.e00045.
20. Knapp, J.; Staebler, S.; Bart, J.M.; Stien, A.; Yoccoz, N.G.; Drögemüller, C.; Gottstein, B.; Deplazes, P. *Echinococcus Multilocularis* in Svalbard, Norway: Microsatellite Genotyping to Investigate the Origin of a Highly Focal Contamination. *Infect. Genet. Evol.* 2012, *12*, 1270–1274, doi:10.1016/j.meegid.2012.03.008.
21. Knapp, J.; Bart, J.M.; Maillard, S.; Gottstein, B.; Piarroux, R. The Genomic *Echinococcus* Microsatellite EmsB Sequences: From a Molecular Marker to the Epidemiological Tool. *Parasitology* 2010, *137*, 439–449, doi:10.1017/S0031182009991612.
22. Knapp, J.; Guislain, M.-H.; Bart, J.M.; Raoul, F.; Gottstein, B.; Giraudoux, P.; Piarroux, R. Genetic Diversity of *Echinococcus Multilocularis* on a Local Scale. *Infect. Genet. Evol.* 2008, *8*, 367–373, doi:10.1016/j.meegid.2008.02.010.
23. Knapp, J.; Bart, J.M.; Glowatzki, M.L.; Ito, A.; Gerard, S.; Maillard, S.; Piarroux, R.; Gottstein, B. Assessment of Use of Microsatellite Polymorphism Analysis for Improving Spatial Distribution Tracking of *Echinococcus Multilocularis*. *J. Clin. Microbiol.* 2007, *45*, 2943–2950, doi:10.1128/JCM.02107-06.
24. Umhang, G.; Knapp, J.; Hormaz, V.; Raoul, F.; Boué, F. Using the Genetics of *Echinococcus Multilocularis* to Trace the History of Expansion from an Endemic Area. *Infect. Genet. Evol.* 2014, *22*, 142–149, doi:10.1016/j.meegid.2014.01.018.
25. Knapp, J.; Meyer, A.; Courquet, S.; Millon, L.; Raoul, F.; Gottstein, B.; Frey, C.F. *Echinococcus Multilocularis* Genetic Diversity in Swiss Domestic Pigs Assessed by EmsB Microsatellite Analyzes. *Vet Parasitol* 2021, *293*, 109429, doi:10.1016/j.vetpar.2021.109429.
26. Knapp, J.; Gottstein, B.; Bretagne, S.; Bart, J.-M.; Umhang, G.; Richou, C.; Bresson-Hadni, S.; Millon, L. Genotyping *Echinococcus Multilocularis* in Human Alveolar

Echinococcosis Patients: An EmsB Microsatellite Analysis. *Pathogens* 2020, 9, doi:10.3390/pathogens9040282.

27. Knapp, J.; Bart, J.-M.; Giraudoux, P.; Glowatzki, M.-L.; Breyer, I.; Raoul, F.; Deplazes, P.; Duscher, G.; Martinek, K.; Dubinsky, P.; et al. Genetic Diversity of the Cestode *Echinococcus Multilocularis* in Red Foxes at a Continental Scale in Europe. *PLoS Negl Trop Dis* 2009, 3, e452, doi:10.1371/journal.pntd.0000452.

28. Murillo, J.; Montoya, A.; Carrillo-Bonilla, L.; Rodriguez, B.; Vélez, I.D.; Robledo, S.M. Verification and Monitoring of Visceral Leishmaniasis in Hamsters Caused by *Leishmania Infantum*, Using Non-Invasive Approaches Involving Ultrasound Imaging and Blood Gases. *Exp Parasitol* 2019, 201, 78–89, doi:10.1016/j.exppara.2019.04.012.

29. Laurimaa, L.; Süld, K.; Moks, E.; Valdmann, H.; Umhang, G.; Knapp, J.; Saarma, U. First Report of the Zoonotic Tapeworm *Echinococcus Multilocularis* in Raccoon Dogs in Estonia, and Comparisons with Other Countries in Europe. *Vet. Parasitol.* 2015, 212, 200–205, doi:10.1016/j.vetpar.2015.06.004.

30. Casulli, A.; Bart, J.M.; Knapp, J.; La Rosa, G.; Dusher, G.; Gottstein, B.; Di Cerbo, A.; Manfredi, M.T.; Genchi, C.; Piarroux, R.; et al. Multi-Locus Microsatellite Analysis Supports the Hypothesis of an Autochthonous Focus of *Echinococcus Multilocularis* in Northern Italy. *Int. J. Parasitol.* 2009, 39, 837–842, doi:10.1016/j.ijpara.2008.12.001.

31. Rishi, A.K.; McManus, D.P. Genomic Cloning of Human *Echinococcus Granulosus* DNA: Isolation of Recombinant Plasmids and Their Use as Genetic Markers in Strain Characterization. *Parasitology* 1987, 94 (Pt 2), 369–383, doi:10.1017/s0031182000054020.

32. Knapp, J.; Umhang, G.; Poulle, M.-L.; Millon, L. Development of a Real-Time PCR for a Sensitive One-Step Coprodiagnosis Allowing Both the Identification of Carnivore Feces and the Detection of *Toxocara* Spp. and *Echinococcus Multilocularis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2016, 82, 2950–2958, doi:10.1128/AEM.03467-15.

33. Vergles Rataj, A.; Posedi, J.; Zele, D.; Vengušt, G. Intestinal Parasites of the Red Fox (*Vulpes Vulpes*) in Slovenia. *Acta Vet Hung* 2013, 61, 454–462, doi:10.1556/AVet.2013.029.

34. Escotte-Binet, S.; Da Silva, A.M.; Cancès, B.; Aubert, D.; Dubey, J.; La Carbona, S.; Villena, I.; Poulle, M.-L. A Rapid and Sensitive Method to Detect *Toxoplasma Gondii* Oocysts in Soil Samples. *Vet Parasitol* 2019, 274, 108904, doi:10.1016/j.vetpar.2019.07.012.
35. Matsuo, K.; Kamiya, H. Modified Sugar Centrifugal Flotation Technique for Recovering *Echinococcus Multilocularis* Eggs from Soil. *J Parasitol* 2005, 91, 208–209, doi:10.1645/GE-3388RN.
36. Knapp, J.; Gottstein, B.; Bretagne, S.; Bart, J.-M.; Umhang, G.; Richou, C.; Bresson-Hadni, S.; Millon, L. Genotyping *Echinococcus Multilocularis* in Human Alveolar Echinococcosis Patients: An EmsB Microsatellite Analysis. *Pathogens* 2020, 9, doi:10.3390/pathogens9040282.
37. Knapp, J.; Damy, S.; Brillaud, J.; Tissot, J.-D.; Navion, J.; Mélior, R.; Afonso, E.; Hormaz, V.; Gottstein, B.; Umhang, G.; et al. EWET: Data Collection and Interface for the Genetic Analysis of *Echinococcus Multilocularis* Based on EmsB Microsatellite. *PLoS ONE* 2017, 12, e0183849, doi:10.1371/journal.pone.0183849.
38. Legendre, P.; Legendre, L. *Numerical Ecology*; Developments in environmental modelling; 3., Engl. ed.; Elsevier: Amsterdam, 2012; ISBN 978-0-444-53868-0.
39. RStudio Team *RStudio: Integrated Development Environment for R*; RStudio, Inc.: Boston, MA, 2016;
40. Suzuki, R.; Shimodaira, H. Pvclust: An R Package for Assessing the Uncertainty in Hierarchical Clustering. *Bioinformatics* 2006, 22, 1540–1542, doi:10.1093/bioinformatics/btl117

5. Conclusion

La plupart des échantillons (13/16) ont présenté un seul profil à la fois suggérant qu'une seule population d'œufs d'*E. multilocularis* était analysée par échantillon. Cela contraste avec les résultats de travaux antérieurs de génotypage de vers qui montraient l'existence de plusieurs profils EmsB ou l'amplification de plusieurs variants du parasite à l'aide d'autres marqueurs chez un même renard (Nakao *et al.*, 2003; Knapp *et al.*, 2009). Les différents vers d'*E. multilocularis* présents chez un même renard, issus probablement de différents événements de prédation (Knapp *et al.*, 2009), pourraient être à des stades de développement différents, ce qui suppose qu'ils ne libèrent pas tous des œufs au même moment dans les fèces. L'examen microscopique et l'analyse moléculaire des œufs isolés des fèces permettraient alors de révéler le profil génétique d'un ver ou alors de quelques-uns seulement mais certainement pas de tous les vers présents dans le tube digestif de l'animal infesté. Ces résultats suggèrent la faisabilité et la pertinence du génotypage EmsB à partir de pools constitués d'un petit nombre d'œufs (dans notre cas, 5 et 10 œufs par lot) dans l'étude noninvasive de la diversité génétique du parasite. Les pools d'œufs ne sont pas l'option idéale pour l'étude génétique des populations des vers parasites internes (Carlsgart *et al.*, 2008), mais les analyses à partir d'un seul œuf présentent une très faible reproductibilité à cause probablement de la faible quantité d'ADN disponible. Les trois profils EmsB décrits correspondaient uniquement aux profils du parasite chez des renards et des patients de la même région ou de régions suisses proches de la zone d'étude. Cette observation confirme la circulation locale des trois génotypes décrits dans ce travail de recherche parmi les hôtes. Les renards hébergeaient l'ensemble des trois profils EmsB alors que les œufs d'*E. multilocularis* issus des fèces des carnivores domestiques ont présenté deux de ces trois profils, un profil étant décrit exclusivement chez le renard. On peut émettre alors l'hypothèse selon laquelle les renards auraient transmis indirectement le parasite aux carnivores domestiques via la prédation de la même population locale de rongeurs. Cette hypothèse nécessite toutefois d'être vérifiée et consolidée par des études complémentaires incluant un plus grand nombre d'échantillons.

Troisième partie : Distribution d'*Echinococcus*
multilocularis dans le sol de jardins potagers en lien avec
l'intensité et la fréquence de dépôts fécaux des carnivores
hôtes définitifs

1. Introduction

Dans la première partie de nos travaux, nous avons vu que les œufs d'*E. multilocularis* apparaissent agrégés dans l'environnement dans des micro-foyers locaux où le risque de transmission du parasite pourrait être élevé. Compte-tenu de la résistance des œufs en conditions froides et humides, nous avons supposé que ces micro-foyers pouvaient persister pendant longtemps, ce qui peut accroître davantage le risque zoonotique (Slifko *et al.*, 2000; Alum *et al.*, 2010). Dans cette troisième partie de nos travaux, la présence à long terme des œufs d'*E. multilocularis* a été évaluée dans un environnement (jardins potagers) dans lequel les habitudes et comportements humains sont susceptibles d'augmenter la probabilité de rencontre avec le parasite.

1.1. Contexte

Le sol peut représenter une importante source d'exposition humaine aux parasites zoonotiques disséminés dans l'environnement par les fèces des carnivores sauvages et domestiques (Torgerson and Macpherson, 2011; Pullan *et al.*, 2014; Traversa *et al.*, 2014; Amoah *et al.*, 2017; Simonato *et al.*, 2019; Ristić *et al.*, 2020). La présence des formes infectieuses parasitaires dans le sol et le risque d'infection humaine associé sont directement dépendants du lieu de dépôt des fèces porteuses des parasites (Morgan *et al.*, 2013; Umhang *et al.*, 2017b). La contamination du sol par des helminthes zoonotiques dans des environnements immédiats de l'homme (parcs, places publiques, bacs à sables, etc.) apparaît ainsi élevée en raison de dépôts fréquents de fèces de chiens et de chats (Bojar and Kłapeć, 2012; Traversa *et al.*, 2014). Les comportements comme le fait de porter les mains souillées à la bouche, la géophagie fréquente chez les enfants, etc. et les activités humaines dans ces lieux pourraient alors favoriser l'ingestion accidentelle des parasites (Blaszkowska *et al.*, 2011; Macpherson, 2013; Traversa *et al.*, 2014; Otero *et al.*, 2018).

Certains jardins potagers dans le nord-est de la France en zone d'endémie d'EA où des densités élevées de fèces de carnivores sauvages et domestiques ont été trouvées – dont une proportion relativement élevée testée positive pour *E. multilocularis* – pourraient constituer des foyers hyper-endémiques de circulation d'*E. multilocularis* (Bastien, 2017; Poulle *et al.*, 2017; Bastien *et al.*, 2018, 2019). C'est d'autant plus préoccupant que la consommation de fruits et végétaux crus et l'entretien de jardins potagers sont identifiés comme des facteurs de risque de l'EA (Kern *et al.*, 2004; Piarroux *et al.*, 2013; Alvarez Rojas *et al.*, 2018). Le lieu de dépôt initial des fèces contenant les œufs n'est probablement pas le seul déterminant de la contamination du sol.

Des facteurs particuliers comme le ruissellement et le labourage du sol dans les potagers peuvent contribuer à disperser les œufs loin de leur lieu de dépôt (Bastien *et al.*, 2019; Thevenet *et al.*, 2020). De plus, la persistance et l'infectiosité des œufs d'*E. multilocularis* dans le sol de ces lieux de culture de végétaux destinés à être consommés crus pourraient s'avérer encore plus problématique car l'arrosage fréquent pendant les saisons – printemps et été – qui présentent les conditions climatiques moins favorables aux œufs pourrait finalement leur permettre une plus grande résistance et survie dans ce type d'environnement (Bastien, 2017). Ainsi, une large contamination persistante du sol des jardins potagers associée aux habitudes alimentaires et/ou comportementales humaines susceptibles de favoriser un contact étroit et répétitif avec le parasite augmenteraient probablement le risque de survenue de l'EA évolutive (Danson *et al.*, 2003; Wahlström *et al.*, 2012). Aucune donnée n'est cependant disponible sur le lien putatif entre la présence et la persistance des œufs d'*E. multilocularis* dans le sol et le mode de dépôt de fèces de carnivores HD du parasite. Cette information est pourtant cruciale pour mieux cibler les stratégies de prévention de la contamination initiale du sol, considérées comme le moyen le plus important pour éviter les infections humaines dues aux parasites transmis via le sol (Traversa, 2012; Morgan *et al.*, 2013). Ceci parce qu'il n'existe pas de méthodes fiables pour éliminer les œufs une fois présents dans le sol (Overgaauw and van Knapen, 2013; Traversa *et al.*, 2014).

1.2. Objectifs

Dans ce contexte, le but de cette étude était d'estimer les niveaux de contamination des sols de jardins potagers urbains et ruraux par les œufs d'*E. multilocularis* et d'explorer la relation entre cette contamination des sols et l'intensité ainsi que la fréquence de dépôts des fèces de renards, chiens et chats. De plus, nous avons également cherché à déterminer la fréquence d'*E. multilocularis* dans l'environnement urbain par l'analyse des fèces car les hôtes sauvages peuvent visiter très fréquemment les zones boisées urbaines telles que les parcs, fragments de forêt ou les jardins familiaux (Deplazes *et al.*, 2004; Bradley and Altizer, 2006; Gecchele *et al.*, 2020). Ces problématiques sont traitées dans l'article ci-dessus :

- **Abdou Malik Da Silva, Matthieu Bastien, Gérald Umhang, Franck Boué, Vanessa Bastid, Jean-Marc Boucher, Christophe Caillot, Carine Peytavin de Garam, Camille Renault, Marine Faisse, Sandra Courquet, Vincent Scalabrino, Laurence Millon, Jenny Knapp, Marie-Lazarine Poulle.** 2021. **Soil contamination by *Echinococcus***

***multilocularis* in rural and urban vegetable gardens in relation to fox, cat and dog faecal deposits.** *Parasite* 28, 74. (DOI : [10.1051/parasite/2021073](https://doi.org/10.1051/parasite/2021073)).

2. Méthodologie

L'étude a été conduite dans 192 potagers ruraux échantillonnés dans les départements des Ardennes et de la Moselle dans le cadre du projet RISKJARDINS. L'étude est complétée par l'inclusion de 71 potagers urbains situés au centre, en périphéries et en zone intermédiaire de la ville de Besançon (Département du Doubs, France). Dans les jardins ruraux, huit sessions de recherche et de collecte de fèces de carnivores ont été réalisées au cours des automnes et hivers 2014 et 2015. Les échantillons de sol (N=250) ont été prélevés dans 50 jardins ruraux sélectionnés aléatoirement dans les Ardennes. Les fèces et les sols (N=213) ont été échantillonnés dans les jardins urbains – tous clôturés – à deux reprises en avril et septembre 2019. La prospection et la collecte de fèces ont concerné aussi les pourtours et les chemins d'accès des jardins potagers urbains. Les espèces émettrices des fèces et la présence d'*E. multilocularis* dans les fèces ont été déterminées par des qPCRs spécifiques sur extraits totaux d'ADN coprologique (Knapp *et al.*, 2016a). Les échantillons de sol ont été soumis à une flottaison au chlorure de zinc pour isoler les œufs de parasite puis l'ADN d'*E. multilocularis* a été identifié dans les filtrats de flottaison (Umhang *et al.*, 2017b). Les potagers ruraux ont été regroupés en trois groupes d'importance de dépôts fécaux – nul, modéré ou élevé – basés sur des descripteurs d'intensité des dépôts fécaux (densités fécales par 100 m² et taux de visite). La fréquence des dépôts fécaux a été évaluée par un indice – 'turnover' des dépôts – déterminé par le nombre de fèces déposées par 100 m² toutes les 6 semaines, soit par session de collecte. Ces paramètres ont été comparés avec les niveaux de contamination des sols. De plus, la présence/absence de fèces testées positives dans les sessions de collecte précédant l'échantillonnage de sol a été mise en relation avec la présence des œufs d'*E. multilocularis* dans le sol des jardins.

3. Résultats principaux

Au total, 1016 fèces ont été collectées dans 148 des 192 jardins ruraux prospectés et 8 fèces dans 8 des 71 jardins urbains. Les fèces trouvées à l'intérieur des potagers urbains, toutes négatives pour *E. multilocularis*, étaient déposées par des chiens et chats. Toutes les déjections de renards dont une positive pour *E. multilocularis* ont été trouvées aux abords extérieurs des potagers dans l'environnement urbain. Aucun échantillon de sol collecté dans ces jardins n'a été testé positif. La contamination des sols apparaît très largement répandue dans les jardins ruraux car 42% d'entre eux avaient au moins un sol testé positif pour le parasite. La présence

des œufs d'*E. multilocularis* dans le sol des jardins ruraux n'était pas significativement associée avec la présence de fèces testées positives avant l'échantillonnage des sols, mais également avec l'importance et la fréquence des dépôts fécaux des renards et des chats.

4. Soil contamination by *Echinococcus multilocularis* in rural and urban vegetable gardens in relation to fox, cat and dog faecal deposits

Abdou Malik Da Silva^{1,2,*,*}, Matthieu Bastien^{3,4,*}, Gérald Umhang⁵, Franck Boué⁵, Vanessa Bastid⁵, Jean-Marc Boucher⁵, Christophe Caillot⁵, Carine Peytavin de Garam⁵, Camille Renault⁵, Marine Faisse^{3,5}, Sandra Courquet^{1,2}, Vincent Scalabrino¹, Laurence Millon^{1,2}, Jenny Knapp^{1,2}, Marie-Lazarine Poulle^{4,6}.

¹ Chrono-environnement, UMR UBFC/CNRS 6249 aff. INRA, University of Bourgogne Franche-Comté, 25030 Besançon, France. ² Department of Parasitology-Mycology, National Reference Centre for Echinococcoses, University Hospital of Besançon, 25030 Besançon, France. ³ Entente for the Control of Zoonoses, Malzéville, 54220 Nancy, France. ⁴ Epidémiologie et Circulation des Parasites dans les Environnements (ESCAPE), EA 7510, CAP SANTE, Université de Reims Champagne Ardenne, 51095 Reims Cedex, France. ⁵ ANSES Nancy laboratory for Rabies and Wildlife, National Reference Laboratory for *Echinococcus* spp., Wildlife Surveillance and Eco-epidemiology unit, Technopole Agricole et Vétérinaire, 54220 Malzéville, France. ⁶ CERFE, Université de Reims Champagne Ardenne, 08240 Boult-aux-Bois, France

*: These authors contributed equally. §: Corresponding author

Parasite 28, 74.

DOI: [10.1051/parasite/2021073](https://doi.org/10.1051/parasite/2021073)

Parasite 28, 74 (2021)
© A.M. Da Silva et al., published by EDP Sciences, 2021
<https://doi.org/10.1051/parasite/2021073>

 **PARASITE**
Available online at:
www.parasite-journal.org

RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

Soil contamination by *Echinococcus multilocularis* in rural and urban vegetable gardens in relation to fox, cat and dog faecal deposits

Abdou Malik Da Silva^{1,2,a,*}, Matthieu Bastien^{3,4,a}, Gérald Umhang⁵, Franck Boué⁵, Vanessa Bastid⁵, Jean-Marc Boucher⁵, Christophe Caillot⁵, Carine Peytavin de Garam⁵, Camille Renault⁵, Marine Faisse^{3,5}, Sandra Courquet^{1,2}, Vincent Scalabrino¹, Laurence Millon^{1,2}, Jenny Knapp^{1,2}, and Marie-Lazarine Poulle^{4,6}

Abstract

Echinococcus multilocularis eggs are deposited on the ground with the faeces of the carnivore definitive hosts. A reliable assessment of the spatial distribution of *E. multilocularis* eggs in environments used by humans is crucial for the prevention of Alveolar Echinococcosis (AE). This study was conducted in 192 rural and 71 urban vegetable gardens in AE endemic areas of north-eastern France. Its objective was to explore the relationship between the spatial distribution of *E. multilocularis* estimated from the collection and molecular analysis of two types of samples: faeces and soil. A total of 1024 carnivore faeces and 463 soil samples were collected and analysed by real-time PCR. No fox droppings and no positive soil samples were collected from the urban gardens. Positive soil samples, positive carnivore faeces or both were found in 42%, 24% and 6% of the sampled rural gardens. No significant association was found between the detection of *E. multilocularis* in soil samples collected from 50 gardens during a single sampling session and the extent and frequency of deposition of fox and cat faeces collected during repeated sampling sessions conducted in the previous months. In 19/50 gardens, *E. multilocularis* was detected in the soil while no positive faeces had been collected in the previous 12 months. Conversely, in 8/50 gardens no soil samples were positive although positive faeces had been collected in the previous months. Collecting and analysing faeces provide information on the soil contamination at a given time, while collecting and analysing soil samples provides an overview of the long-term contamination.

Keywords: Environmental contamination, soil-transmitted parasites, foodborne parasites, copro-qPCR, soil flotation

Contamination du sol par *Echinococcus multilocularis* dans des jardins potagers ruraux et urbains en relation avec les dépôts fécaux de renards, de chats et de chiens

Résumé

Les œufs d'*Echinococcus multilocularis* sont déposés sur le sol avec les fèces des carnivores hôtes définitifs. Une évaluation fiable de la distribution spatiale des œufs d'*E. multilocularis* dans les environnements utilisés par l'homme est cruciale pour la prévention de l'échinococcose alvéolaire (AE). La présente étude a été conduite dans 192 jardins potagers ruraux et 71 jardins potagers urbains des zones endémiques d'AE du nord-est de la France. Son objectif était d'explorer la relation entre la distribution spatiale d'*E. multilocularis* estimée à partir de la collecte et de l'analyse moléculaire de deux types d'échantillons : des fèces et du sol. Au total, 1024 fèces et 463 échantillons de sol ont été collectés et analysés par PCR en temps réel. Aucun excrément de renard et aucun échantillon de sol positif n'a été collecté dans les jardins urbains. Des échantillons de sol positifs, des fèces de carnivores positives ou les deux ont été trouvés dans 42%, 24% et 6% des jardins ruraux échantillonnés. Aucune association significative n'a été trouvée entre la détection d'*E. multilocularis* dans les échantillons de sol collectés dans 50 potagers lors d'une unique session d'échantillonnage et l'importance et la fréquence des dépôts de fèces de renards et de chats collectées lors d'échantillonnages répétés conduits au cours des mois précédents. Dans 19/50 potagers, *E. multilocularis* a été détecté dans le sol alors qu'aucun excrément positif n'avait été collectés dans les 12 mois précédents. À l'inverse, dans 8/50 potagers aucun échantillon de sol n'était positif alors que des fèces positives avait été collectées dans les mois précédents. La collecte et l'analyse de fèces renseignent sur la contamination du sol à un instant donné, alors que celles d'échantillons de sol fournissent un aperçu de la contamination à long terme

Introduction

Soil is an important transmission route for zoonotic parasites such as helminths or protozoa whose infective eggs, oocysts or larvae are spread in the environment with faeces of foxes, dogs and cats [2,44,48,66]. Soil types, moisture, and local conditions influence the distribution of these zoonotic agents [1,12,61,67]. Putting soiled hand in the mouth and geophagia are identified as risk factors for these soil-transmitted parasite zoonosis [38,37,66,7]. As a consequence, contamination of sandboxes, backyards, public parks or beaches with zoonotic parasites is a public health concern [4,18,35,55,66]. The consumption of raw fresh fruit and vegetables in contact with soil contaminated with foodborne parasites is also increasingly recognized as a transmission route of zoonotic diseases [6,17,38,42,51,52,69]. However, most people are unaware of the risk of zoonotic diseases from intestinal parasites of carnivores [57,65,39] and few studies have focused on the parasitic contamination of vegetable gardens [4,27,32,42]. In some vegetable gardens of north-eastern France, a high density of fox and cat faeces was found, and a large part of the collected faeces tested positive for zoonotic parasites [4,5,43]. The risk of human exposure through consumption of raw fruit and vegetables grown in contaminated soil is of particular concern with regard to *Echinococcus multilocularis* (Leuckart, 1863), the cestode responsible for alveolar echinococcosis (AE), a rare but severe and sometimes fatal human disease [9,64]. Human infection can occur after accidental ingestion of *Echinococcus multilocularis* eggs deposited on the ground with the faeces of infected definitive hosts. These eggs can survive for more than a year in cold and damp conditions [71]. The red fox, *Vulpes vulpes*, is the main definitive host of *E. multilocularis* in Europe and is responsible for most of the environmental contamination with *E. multilocularis* eggs in both urban and rural areas [25]. In fox population, a low proportion of individuals, mostly juveniles, harbour almost the entire parasitic biomass with possibility of simultaneous and successive re-infections [20,46,50,60]. As juvenile foxes are likely to disperse, the risk of spreading their pathogens is high [22,23,58]. The domestic dog, *Canis lupus familiaris*, is also a definitive host of *E. multilocularis* and its contribution to AE transmission may be significant. The low prevalence of *E. multilocularis* in dog population being compensated by the high density of dog faeces around human settlements, their high proximity with humans and a high biotic potential of the parasite in the dog [26,30,33,25]. In addition, experimental infections showed that the domestic cat, *Felis silvestris catus* can harbour the adult worms of *E. multilocularis* but generally with low mature worm burden, excreting few eggs which are not yet proved to be infective [26,63,68]. However, *E. multilocularis* eggs have been found in cat faeces collected

in the field [15,28,40]. The parasite is usually aggregated in a few micro-foci [15,30,43,47,70] whose distribution in urban and rural human environment is a health concern in AE endemic regions [16,20,30,34,49]. Reliable information on the distribution of locations where *E. multilocularis* eggs are aggregated in the soil is crucial for AE prevention.

Assessment of the environmental contamination with *E. multilocularis* eggs is often based on carnivore faeces sampling coupled with molecular analysis of faecal samples [14,30,43]. The development of PCR or real-time PCR allow a very sensitive and rapid detection of both host species DNA and parasite DNA in faeces [29,31,36]. In addition, the detection of *E. multilocularis* in soil samples is now possible thanks to the recent development of a sensitive and reliable flotation/filtration techniques combined with molecular biology [59,67]. However, while the collection of a single *E. multilocularis* PCR-positive scat is sufficient to suggest that the soil is contaminated with this parasite, the absence of such faeces at the moment of collect does not necessarily mean that the soil is free of *E. multilocularis* eggs (see e.g., results by Umhang and co-workers, 2017 [67]). As the probability of detecting carnivore faeces in the field depends on the species, weather conditions, substrate type and carnivore diet [3,21,54], the distribution of collected faeces may not be fully representative of their deposition. Furthermore, *Echinococcus multilocularis* eggs may have persisted for weeks or months after the faeces that carried them have disappeared. They also may have been dispersed far from their place of deposition by runoff [61] or soil ploughing.

Our objective was to explore the relationship between environmental contamination by *E. multilocularis* eggs, classically assessed by the collection and molecular analysis of carnivore faeces and the one assessed by the collection and molecular analysis of soil samples. The study was conducted in AE endemic areas of north-eastern France and focused on rural and urban vegetable gardens. Specifically, we estimated whether the detection of *E. multilocularis* in a small number of soil samples collected on a one-shot sampling was related to: i) the frequency of finding of fox, cat and dog faeces in repeated sampling carried out in the previous months; ii) the extent of faeces collected from the same sampling; iii) the detection of *E. multilocularis* in the faeces collected in this sampling, and iv) the size of the gardens sampled. Because urban gardens are often fenced, but these wooded areas are nevertheless attractive to wild hosts [10,16], faeces were also collected in the immediate vicinity to the urban gardens.

Materials and Methods

Study areas

The study took place in three French *E. multilocularis* endemic regions with the highest AE incidence [41]: Ardennes, Moselle and Doubs (**Figure 25**). The French Ardennes (49° 25' N, 4° 50' E) is wooded (oak *Quercus* spp., beech *Fagus sylvatica*, hornbeam *Carpinus betulus* and spruce *Picea abies*), with cultivated fields and pastures. The human population density is around 16 inhabitants/km² and most of the villages have fewer than two hundred inhabitants. The Moselle (48° 49' N, 6° 30' E) interchanges between wooded and industrialized areas, the human density is around 170 inhabitants/km² and most villages comprise approximately 1,000 inhabitants. In the Doubs, the sampling took place in the Besançon city (47° 14' N, 06° 01' E), half-wooded with forests, parks, vegetable gardens, allotment and worker gardens, cultivated fields and a human population density around 366 inhabitants/km².

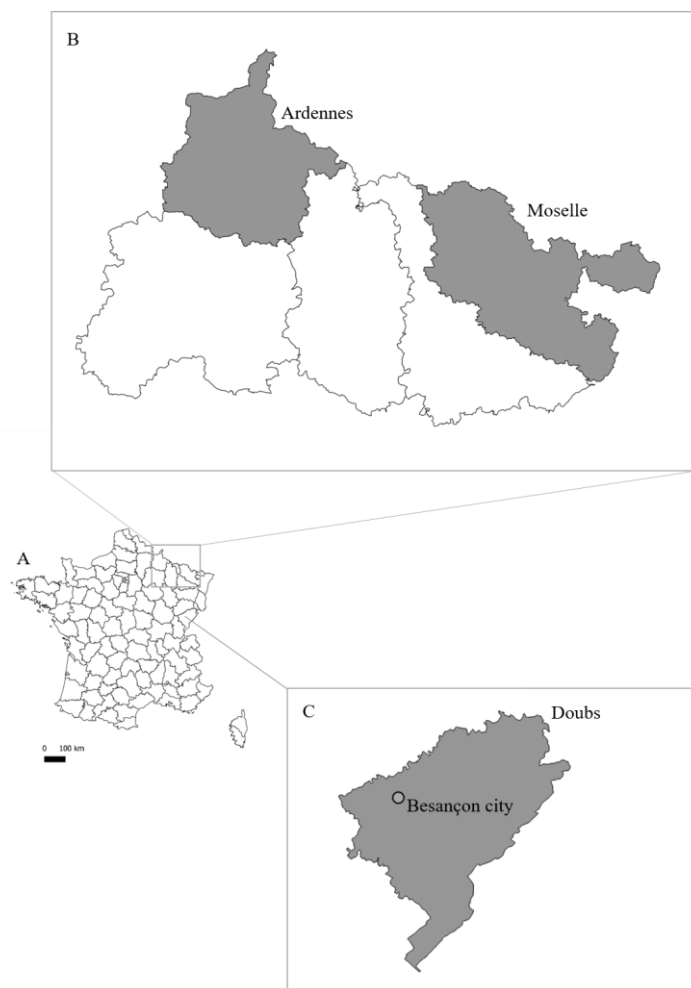


Figure 25 : Localisation of the three study areas in France (A), highlighting the rural (B) and urban (C) settings.

Vegetable gardens sampled

In rural setting (Ardennes and Moselle), 192 vegetable gardens distributed in 38 villages (~ 4 per villages) were sampled for carnivore faeces during the joint study conducted by Bastien et al. [5]. Among them, 185 were vegetable gardens devoted to household consumption and spanning $207 \pm 14 \text{ m}^2$ in average size (min= 4 m^2 , max= $1,276 \text{ m}^2$). The other seven locations were larger cultivated areas devoted to market gardening and spanning $7,550 \pm 2,275 \text{ m}^2$ on average (min= 512 m^2 , max= $20,553 \text{ m}^2$). The total size of these 192 rural vegetable gardens was $91,195 \text{ m}^2$. In both Ardennes and Moselle, 79 % (152/192) of the sampled vegetable gardens were easily accessible to canids because unfenced or not efficiently fenced [5]. Due to material and financial constraints, only 50 randomly selected vegetable gardens out of the 192 sampled for faeces were also sampled for soil. All were located in the Ardennes, 82% (41/50) gardens were unfenced or not efficiently fenced to prevent canid's intrusions. The 50 vegetable gardens sampled for soil sized $543 \text{ m}^2 \pm 203 \text{ m}^2$ in average (min: 6 m^2 , max: $8,384 \text{ m}^2$) for a total of $27,176 \text{ m}^2$. In the urban setting (Besançon city), six cultivated areas surrounded by a minimum 1 m-high fence were sampled: two in downtown city, two in the city periphery close to wooded areas and two in an intermediate situation. They sized $6,546 \text{ m}^2 \pm 2,891 \text{ m}^2$ in average (min= $3,935 \text{ m}^2$, max= $10,539 \text{ m}^2$). Each of them are divided into 20 to 35 individual vegetable gardens sizing $266 \text{ m}^2 \pm 132 \text{ m}^2$ in average (min= 178 m^2 , max= 527 m^2). We sampled between 11 and 12 vegetable gardens per cultivated area, for a total of 71 vegetable gardens and $18,994 \text{ m}^2$ scanned.

Figure 26 presents a synopsis of the protocol from sampling design to data analysis.

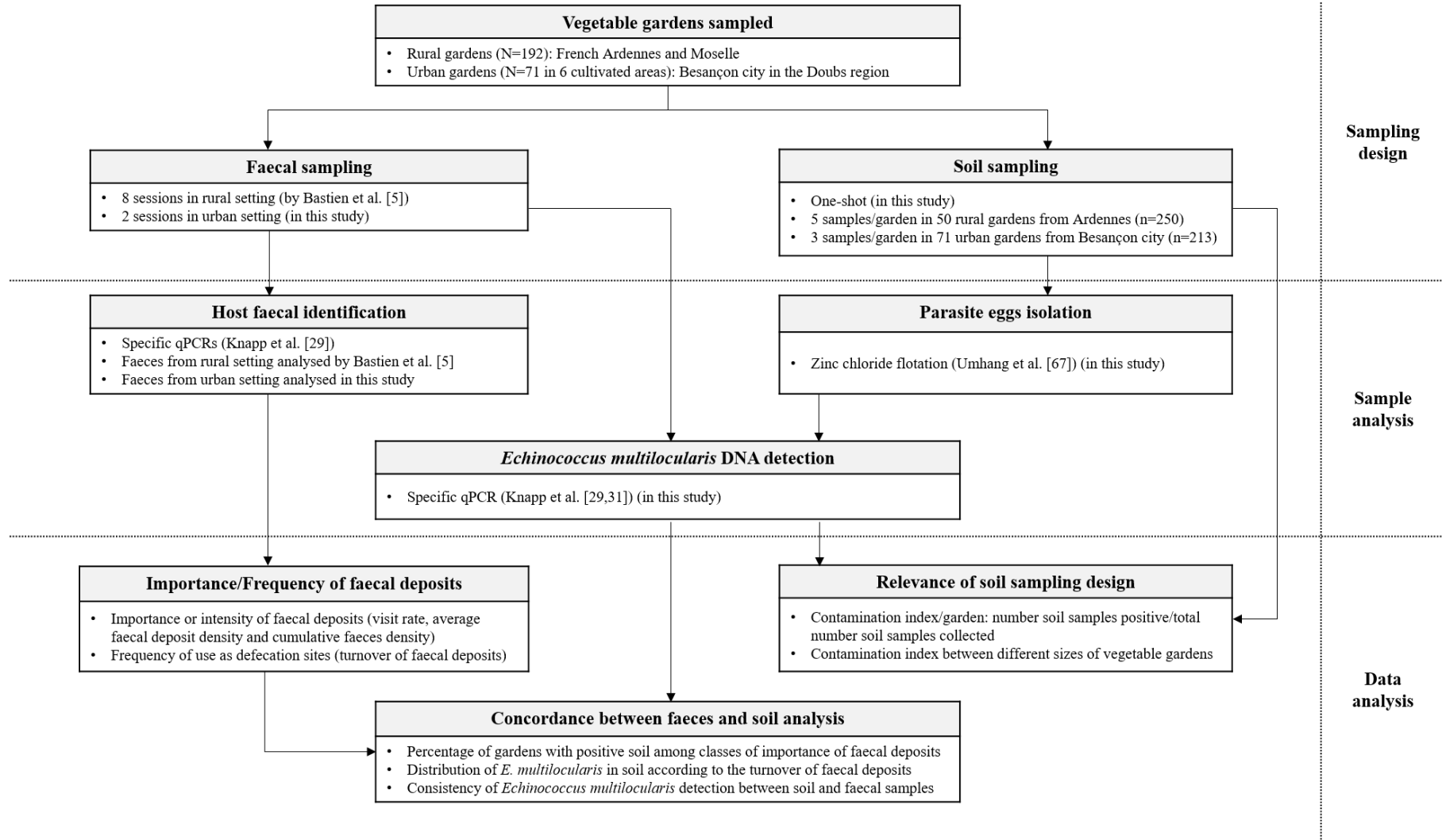


Figure 26 : Process chart showing the collection and analysis of faeces and soil samples in rural and urban vegetable gardens located in *E. multilocularis* endemic regions of the north-eastern France.

Faeces and soil sampling

Faeces sampling consisted of visual scans performed by walking the whole surface of the vegetable gardens out of the gardening period to avoid damaging the seedlings. All the carnivore faeces detected during scans were collected and decontaminated over seven days at -80°C and stored at -20°C before laboratory analyses. In the Ardennes and Moselle, samplings occurred in February, March, October and December 2014 and in January, March, October and December 2015 for a total of 8 scans per garden (**Figure 26**). In urban setting, faeces sampling occurred two times, in April and September 2019, and was carried out in the 71 selected vegetable gardens and on their access roads and outer edges of the six areas in which they were clustered.

Soil sampling consisted in collecting about 50 grams of soil at a maximum of 5 cm from the soil surface. In rural setting, soil sampling in the 50 vegetable gardens took place in January 2015 and resulted in the collection of five soil samples per vegetable garden, one on each of the four borders and one in the centre, for a total collection of 250 soil samples (**Figure 26**). In the urban setting, soil sampling took place in April 2019 in 40 vegetable gardens and in September 2019 in 31 others. For each of the 71 urban vegetable gardens sampled, three soil samples were collected, two at the borders and one in the centre, for a total of 213 soil samples (**Figure 26**). All collected soil samples were decontaminated over seven days at -80°C, and stored at -20°C before laboratory analyses.

Molecular analysis

For the faeces, an amount of 0.5 g for each copro-sample was treated for DNA extraction using the QIAamp Fast DNA Stool Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) following manufacturer's recommendations. The host faecal test developed as a multiplex real-time PCR test [29] was then used to identify which carnivore species (fox, cat or dog) had released the scat analysed (**Figure 26**). The analysis of faeces collected in the urban setting (Besançon city) was conducted in the present study while that of faeces collected in the rural setting (Ardennes and Moselle) was previously conducted by Bastien et al. [5]. For each soil sample collected, 10 g was floated with zinc chloride to concentrate and isolate parasite eggs and the parasite DNA was extracted from the substrate obtained from the filtered supernatant with the QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) ([67], **Figure 26**). DNA extracts from faeces and soil were then tested in a specific *E. multilocularis* real-time PCR (*E. multilocularis*-qPCR) in order to detect the presence of *E. multilocularis* DNA based on the amplification of a part of the mitochondrial *rrnL* gene ([29,31], **Figure 26**). An internal control tool tested the presence of PCR inhibitors

[29]. The two qPCRs were performed in a duplex-qPCR. Reactions with Ct < 45 cycles were considered positive for *E. multilocularis*-qPCR. All samples were tested in duplicate. If at least one of the duplicates was positive, the stool or soil sample was considered positive. If at least one of the three (urban setting) or five (rural setting) soil samples collected in a vegetable garden was tested positive, the vegetable garden was considered positive.

Data analysis

The percentage of fox, dog and cat faeces in the total faeces collection and the occurrence of *E. multilocularis* in faeces were expressed with their 95% confidence intervals (95% CI), and were compared between the 50 soil-sampled gardens and the other 142 rural gardens without soil sampled using Chi-square tests or Fisher's exact test when sample size was not sufficient.

Three descriptors of the intensity or importance of faecal deposit were computed per vegetable garden and carnivorous species (**Figure 26**): (1) **Visit rate** was used as a proxy for the regularity of the vegetable garden use as defecation site. It was calculated as the number of sampling sessions in which faeces were collected relative to the total number of sampling sessions [19,56]; (2) **Average faecal deposit density** per sampling session was calculated as the number of faeces collected per 100 m² relative to the number of sampling sessions in which faecal samples were found. This descriptor was used as an index of average garden use as defecation site; (3) **Cumulative faecal density** was calculated over the entire sampling as the total number of faeces deposited per 100 m². From these three descriptors, a non-hierarchical cluster analysis following a K-means partition procedure based on Euclidean distance measures was performed to group vegetable gardens according to the importance of faecal deposition [8] defined as "null", "moderate" or "high". The values of the three descriptors were first standardized on a 0-1 scale to give the same weight to each garden. Differences in percentage of vegetable gardens with positive soil between these three classes were tested using Chi-square tests of homogeneity.

We assessed the frequency of use of vegetable gardens as defecation sites by determining **faecal density per sampling session**, which was considered as an index of the turnover of faecal deposits and was based on the number of faeces deposited per 100 m² every 6 weeks. Faeces collected in December, January and March were taken into account, whereas samples collected in October were not, because they could have been deposited for more than 6 weeks. The influence of the turnover of faecal deposits on the distribution of *E. multilocularis* in the soil of the vegetable gardens (presence/absence) was evaluated using the nonparametric Wilcoxon-Mann Whitney test. Finally, an index of soil contamination per garden was defined as the

number of soil samples positive for *E. multilocularis* eggs DNA on the total number of soil samples collected. The non-parametric Kruskal-Wallis rank sum test was used to compare this contamination index between three classes of garden sizes: small garden ($\leq 150 \text{ m}^2$), medium garden (151 - 300 m^2) and large garden ($> 300 \text{ m}^2$). All computations and analyses were performed using R (version 3.5.1 [45]) with significant differences for $P \leq 0.05$.

Results

Faecal contamination of vegetable gardens

At least one scat was found in 148 out of the 192 rural vegetable gardens [5] and in 8 out of the 71 urban vegetable gardens sampled, for a total number of 1,016 and 8 carnivore faeces collected in the rural and urban settings, respectively (**Table 10**). Five fox faeces, 6 cat faeces and 9 dog faeces were found at the outer edges of the cultivated areas, outside the fences. Cat, fox and dog faeces accounted for 58.8% ($n=597$), 31.4% ($n=319$) and 9.8% ($n=100$), respectively of the 1,016 faeces collected in Ardennes and Moselle [5], whereas of the 8 faeces collected in urban gardens, 3 were attributed to cats and 5 to dogs. The distribution of fox, dog and cat faeces in the rural vegetable gardens did not significantly differ between the 389 faeces collected in the subsampling of the 50 soil-sampled gardens and the 627 faeces collected in the other 142 rural vegetable gardens (**Table 10**, $P > 0.05$). None of the dog faeces collected tested positive for *E. multilocularis* (**Table 10**). The distribution of *E. multilocularis* DNA-positive faeces among fox and cat faeces did not vary significantly between the subsampling of the 50 soil-sampled gardens and the other 142 rural vegetable gardens (**Table 10**, $P > 0.05$). As both of sub-samples showed a similar distribution of faeces from different host species and *E. multilocularis* faecal prevalence, data from the 50 soil-sampled rural vegetable gardens were assumed transposable to the entire rural setting studied. At least one fox scat was found in 25 of the 50 vegetable gardens sampled for soil, at least one cat scat was found in 34 of them and at least one dog scat was found in 12 of them. No faeces collected inside the urban gardens were tested positive. However, one out of the five fox faeces collected in the vicinity of the urban vegetable gardens was positive for *E. multilocularis* DNA as were 18/137 (13.1%) of the fox faeces and 2/224 (0.9%) of the cat faeces collected in the 50 rural vegetable gardens sampled for faeces and soils (**Table 10**). Faeces that tested positive for *E. multilocularis* were distributed in 12/50 rural soil-sampled gardens (24.0%, 95% CI [13.1-38.2]). Out of the 20 positive faeces, 15 positive fox faeces distributed in 10/50 rural soil-sampled gardens were collected 1 – 12 months before soil sampling. The importance of faecal deposit in urban vegetable gardens was

not assessed due to the low number of faeces collected (N=8). In addition, the relatively small number of dog faeces collected in rural setting prevented any attempt to analyse their deposit importance. The cluster analysis based on fox and cat faecal descriptors unequally divided the 50 soil-sampled rural vegetable gardens among the three predefined classes (see **Table 11** for details of the mean values for each host): (a) 13 had a null faecal deposit; (b) 22 had a moderate faecal deposit with an average of 3.42 faeces collected per 100 m² (range 0.11 - 12.08); (c) 15 had a high faecal deposit with an average of 8.57 faeces collected per 100 m² (range 1.39 - 57.69). The overall average turnover of faecal deposit was 0.95 per 100 m²/6 weeks (range 0.00 – 12.82), ranged from 0.70 per 100 m²/6 weeks (range 0.00 – 8.55) to 0.25 per 100 m²/6 weeks (range 0.00 – 4.27) for cats and foxes, respectively.

Table 10 : Number of fox, dog and cat faeces found in rural and urban vegetable gardens of north-eastern France and number of faeces and soil samples tested positive for *E. multilocularis* by real-time PCR.

		Faeces				Soil samples
		Total	Fox	Dog	Cat	
Urban gardens	No. sampled	8	0	5	3	213
sampled for	Positive samples	0	-	0	0	0
faeces and soil	Occurrence %	0	-	0	0	0
(N=71)	95% CI	-	-	-	-	0-0.02
Rural gardens	No. sampled	627	182	72	373	-
sampled for	Positive samples	35	30	0	5	-
faeces	Occurrence %	5.6	16.5	0	1.3	-
(N = 142)	95% CI	3.9-7.7	11.4-22.7	0-0.1	0.4-3.1	-
Rural gardens	No. sampled	389	137	28	224	250
sampled for	Positive samples	20	18	0	2	26
faeces and soil	Occurrence %	5.1	13.1	0	0.9	10.4
(N = 50)	95% CI	3.2-7.8	8.0-20.0	0-0.1	0.1-3.2	6.9-14.9

95% CI: 95% confidence interval.

Table 11 : Values of descriptors of fox and cat faeces deposition and proportion of vegetable gardens with at least one soil sample tested positive for *Echinococcus multilocularis* DNA in the three classes of intensity of faecal deposits.

Descriptors (definition)	Species	Intensity of faecal deposit		
		Null n=13	Moderate n=22	High n=15
Cumulative faecal density	Fox	0	1.19 (± 0.25)	2.87 (± 1.71)
Mean (± SE) number of faeces deposit per 100 m ²	Cat	0	2.23 (± 0.55)	5.69 (± 2.16)
Average faecal deposit density	Fox	0	0.66 (± 0.17)	1.12 (± 0.55)
Mean (± SE) number of faeces deposit per 100 m ² relative to the number of sessions with faeces found	Cat	0	1.36 (± 0.30)	2.08 (± 1.02)
Visit rate	Fox	0	0.25 [0.15-0.36]	0.17 [0.07-0.26]
Proportion [95% CI] of session with faeces collected relative to the total number of session	Cat	0	0.24 [0.17-0.32]	0.38 [0.28-0.45]
Proportion of vegetable gardens with <i>E. multilocularis</i>- positive soil samples		6/13	6/22	9/15
Percentage [95 % CI]		46.2 % [20.4-73.9]	27.3 % [11.6-50.4]	60 % [32.9-82.5]

SE: standard error; 95% CI: 95% confidence interval.

Soil contamination

Of the 250 soil samples from the rural vegetable gardens, 26 (10.4%, 95% CI [6.9-14.9]) were tested positive for *E. multilocularis* eggs DNA (**Table 10**). These *E. multilocularis*-positive soils were distributed in 21/50 vegetable gardens (42.0%, 95% CI [28.2-56.8]). Soil samples were tested positive in 4/9 (44.4%) enclosed rural gardens, while no *E. multilocularis*-positive soil was detected among the 71 selected urban vegetable gardens clustered in the 6 cultivated areas – all fenced. In most of the rural vegetable gardens positive for *E. multilocularis* eggs DNA (17/21), only one soil sample was tested positive out of the five collected. In three vegetable gardens, 2/5 soil samples were tested positive. In one vegetable garden, 3/5 soil samples were tested positive. Contamination index did not differ significantly between the small (n= 18), medium (n=17) and large (n=15) rural vegetable gardens (**Figure 27**, Kruskal-Wallis rank sum test: $\chi^2= 0.42$, $P=0.810$).

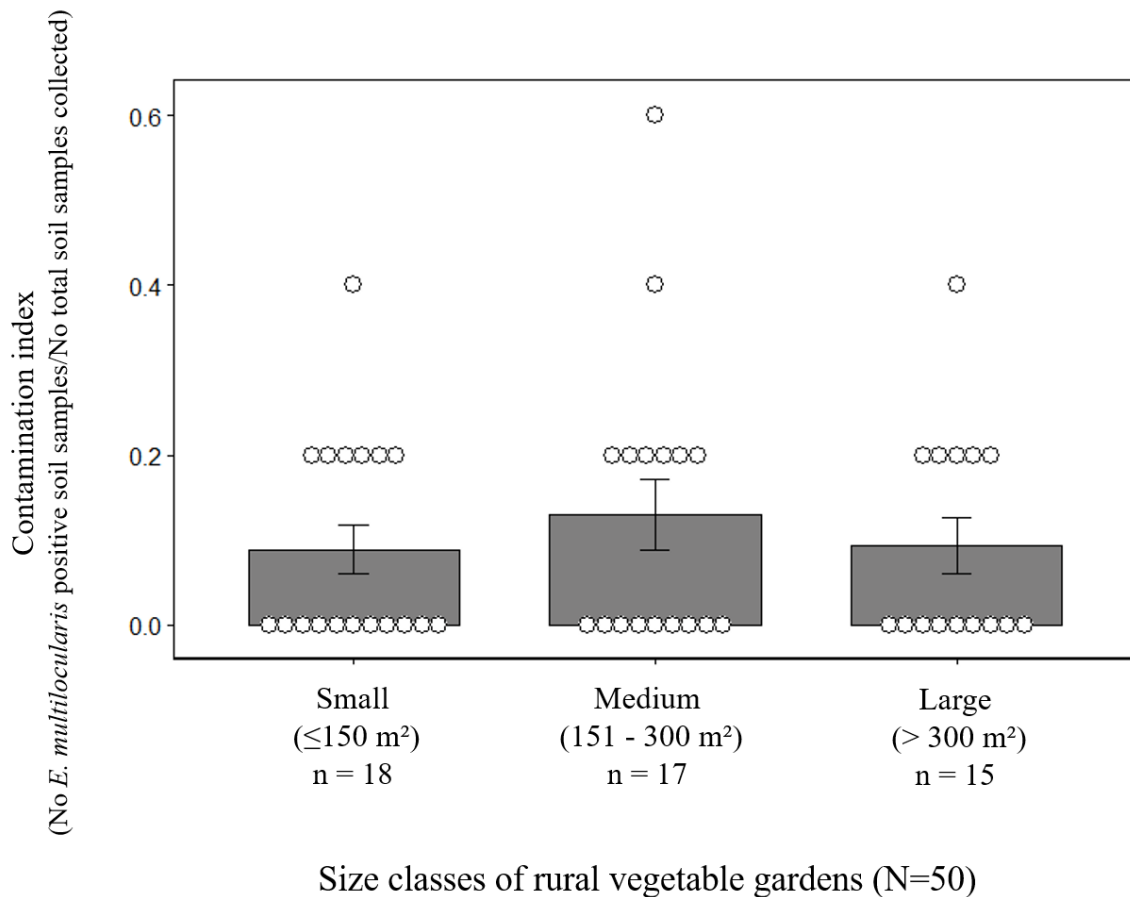


Figure 27 : Index of soil contamination by *Echinococcus multilocularis* in relation to the size of rural vegetable gardens sampled from north-eastern France. Bars represent the mean contamination index (\pm Standard Error); white crenelated dots, the contamination index per vegetable garden.

Concordance between faeces and soil analysis

The turnover of cat and fox faecal deposits in rural gardens did not differ significantly between garden with *E. multilocularis*-negative soil and gardens with *E. multilocularis*-positive soil (**Figure 28**, Mann-Whitney test, $W=274$, $P = 0.546$ and $W=395$, $P = 0.056$, respectively). Vegetable gardens with at least one contaminated soil sample were homogeneously distributed among those with null, moderate and high faecal deposits (Table 12, $\chi^2=4.05$, $P=0.132$). Specifically, the percentage of gardens with at least one fox scat did not differ between the 21 rural gardens with at least one *E. multilocularis*-positive soil sample and the 29 rural gardens with no positive soils (38.1%, 95% CI [18.1-61.6] versus 58.6%, 95% CI [38.9-76.5] respectively, $\chi^2=1.31$, $P=0.251$). Only faeces of cats were found in 6/21 rural gardens where at

least one *E. multilocularis*-positive soil sample was collected. Overall, soil and faecal samples were both tested positive for *E. multilocularis* in 3/50 rural gardens (6.0%, 95% CI [1.3-16.5]). The percentage of vegetable gardens with at least one *E. multilocularis*-positive soil sample did not significantly differ between the rural gardens where *E. multilocularis*-positive faeces were collected before soil sampling (20.0%, 95% CI [2.5-55.6]) and those where no positive faeces was collected or where positive faeces were only collected after soil sampling (47.5%, 95% CI [31.5-63.8], Fisher's exact test, $P=0.223$). The information provided by the analysis of soil samples collected from rural gardens in January 2015 and that of faeces collected from the same gardens in the previous months is consistent for 21/29 (72.4 %) rural gardens in which no *E. multilocularis*-positive samples (either soil or faeces) was found and for 2/21 (9.5 %) gardens in which both *E. multilocularis*-positive faeces and soil sample were found (Supplementary Table 1, Annex E). In all 2 last cases, the collection of positive faeces (fox faeces in March 2014 and in October 2014) preceded by several months that of a positive soil sample. In 8 rural gardens where at least one positive scat was found at each copro-sampling session (13 positive fox faeces were collected between February and December 2014), no soil was tested positive (Supplementary Table 1, see Annex E). In 19 rural gardens where at least one soil sample tested positive, no scat was tested positive before soil collection (Supplementary Table 1, see Annex E).

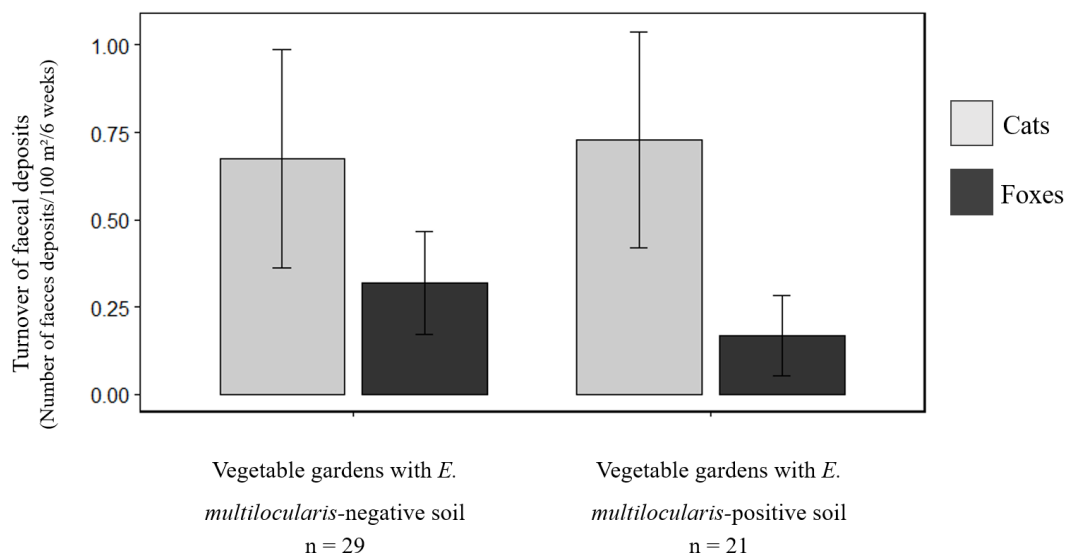


Figure 28 : Average turnover of fox and cat faecal deposits in rural vegetable gardens (N=50) sampled from north-eastern France, with soil tested negative and positive for *E. multilocularis* eggs DNA. Line segments represent Standard Error.

Discussion

In the urban setting, only a few cat and dog faeces were collected in vegetable gardens and all these faeces were tested negative for *E. multilocularis* DNA. It is therefore not surprising that none of the soil samples collected were tested positive. However, our urban sampling provides two important pieces of information: the collection of fox faeces on the outer edges but not inside the fenced urban vegetable gardens confirms the effectiveness of fences to prevent fox intrusion [5], and the detection of *E. multilocularis* DNA in one of these faeces attests to the risk of soil contamination by this parasite in the city of Besançon. In the rural setting, *E. multilocularis* DNA was detected in 10.4% of the soil samples collected in vegetable gardens which is consistent with the 11.3 % and 11.7 % *E. multilocularis*-positive soil samples collected in *E. multilocularis* endemic areas from northeast Poland [59] and north-eastern France [67], respectively. This similar relatively high rate of *E. multilocularis* in soil samples in the latter studies supports the high sensitivity of flotation/filtration techniques combined with molecular biology in the investigation of soil-transmitted parasite. The 35% prevalence of *E. multilocularis* in the local fox population [13] and the use of half of the sampled rural gardens as a defecation site by foxes is sufficient to explain the presence of *E. multilocularis* in the soil of 42% of the 50 rural gardens sampled.

Another interesting finding was the absence of significant association between the detection of *E. multilocularis*-positive soil samples in the vegetable gardens and the importance and turnover of fox and cat faecal deposit in the 12 previous months. The proportion of vegetable gardens which had at least one fox dropping and one *E. multilocularis* positive soil sample was not higher than the proportion of gardens with no fox dropping but at least one *E. multilocularis* positive soil sample. In vegetable gardens, frequent watering and turning of the soil can accelerate the degradation of faeces and thus reduce the number of faeces detected [5]. This sampling bias can be reduced by increasing the frequency of sampling as recommended by Sanchez et al. [54]. The fact that only cat faeces were found in six out of the 21 rural vegetable gardens where *E. multilocularis*-positive soil samples were found can be due to insufficient sampling to detect the more rarely deposited fox faeces. However, it is also possible that only cats used these six gardens as defecation sites during the entire study period, in which case the soil would have been contaminated with *E. multilocularis* from cat faeces. The latter finding and the importance of the deposition of cat faeces in vegetable gardens [4] even at very low *E. multilocularis* occurrence (less than 1% in this study) support the need for further investigation on the reproductive potential of *E. multilocularis* in cats in the field.

In 19/50 rural vegetable gardens sampled for faeces and soil, *E. multilocularis* positive soil samples were found while no scat tested positive was previously collected. The persistence of *E. multilocularis* eggs accumulated over time in soil may explained this result. Such long-term persistence has already been demonstrated for *Echinococcus granulosus* eggs that were found in topsoil samples of plots occupied by experimental infected dogs 41 months after the dogs were removed from the study enclosures, and were found to remain infective after 41 months of aging in soil under environmental conditions of the Patagonian region of Argentina [61,62]. Insufficient soil sampling may also be responsible for an apparent lack of concordance between faecal deposits and soil contamination. This is probably the reason for the lack of detection of *E. multilocularis* in the five soil samples collected in eight of the rural vegetable gardens where at least one positive fox scat was found at each previous copro-sampling session. Although no significant relationship was found between the detection rate in the five soil samples collected per vegetable garden and the size class of the vegetable gardens (ranging from 15.6 to 8,384 m²), collecting more soil samples than we did or a given number of soil samples per m² using a systematic method (e.g., systematic aligned or unaligned methods; see [12] for details) may provide a better overview of soil contamination by better taking into account the heterogeneous dispersion of the soil-transmitted helminths in the environmental matrices [12].

In conclusion: i) the collection and analysis of carnivore faeces allow an estimation of the respective contribution of definitive host species responsible for the contamination of vegetable gardens by *E. multilocularis* and an instant indication of soil contamination. Regularly screening of the parasite in faeces may also allow a comprehensive understanding on variation in *E. multilocularis* shedding frequency by definitive host species. But sampling and molecular analysis of faeces do not always reflect the spatial and temporal distribution of soil contamination even when conducted through repeated sampling; ii) One-shot soil sampling appears easier to conduct and may provide a better overview of the long-term contamination in vegetable gardens where micro-climatic conditions (e.g., regular soil watering) could ensure optimal egg survival. However, its reliability depends on the sampling design; iii) Therefore, the analysis of faeces and soil samples should be used in a complementary way. This two-fold analytical approach may provide information on guiding the assessment of the dynamics of environmental contamination by *E. multilocularis* and thus identifying sites at-risk of human contamination. Collection and analysis of more frequent soil samples over a longer time span may provide insight to seasonal and spatial variations in persistence of *E. multilocularis* eggs in soil for a relevant estimation of the environmental exposition for intermediate hosts and humans. Finally, the presence of *E. multilocularis* positive faeces in vegetable gardens [42, this

study] and the detection of *E. multilocularis* on fruit and vegetables [24,32] argue for the development of standardized methods allowing the diagnosis of *E. multilocularis* and other helminths or protozoan on fresh produce. Thus far, no such method is available to estimate the risk for consumer exposure to foodborne parasites in raw fruit and vegetables along the agri-food chain [11,53].

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the "Zones Ateliers" network (<https://inee.cnrs.fr/fr/zones-ateliers>) and the Conseil Départemental des Ardennes. We are grateful to those who allowed us to survey their vegetable gardens in Besançon city and in Ardennes and Moselle regions.

References

1. Afonso E, Lemoine M, Poulle M-L, Ravat M-C, Romand S, Thulliez P, Villena I, Aubert D, Rabilloud M, Riche B, Gilot-Fromont E. 2008. Spatial distribution of soil contamination by *Toxoplasma gondii* in relation to cat defecation behaviour in an urban area. *International Journal for Parasitology*, 38, 1017–1023.
2. Amoah ID, Singh G, Stenström TA, Reddy P. 2017. Detection and quantification of soil-transmitted helminths in environmental samples: A review of current state-of-the-art and future perspectives. *Acta Tropica*, 169, 187–201.
3. Barja I. 2009. Decision making in plant selection during the faecal-marking behaviour of wild wolves. *Animal Behaviour*, 77, 489–493.
4. Bastien M, Vaniscotte A, Combes B, Umhang G, Germain E, Gouley V, Pierlet A, Quintaine T, Forin-Wiart MA, Villena I, Aubert D, Boue F, Poulle M-L. 2018. High density of fox and cat faeces in kitchen gardens and resulting rodent exposure to *Echinococcus multilocularis* and *Toxoplasma gondii*. *Folia Parasitologica*, 65.
5. Bastien M, Vaniscotte A, Combes B, Umhang G, Raton V, Germain E, Villena I, Aubert D, Boué F, Poulle M-L. 2019. Identifying drivers of fox and cat faecal deposits in kitchen gardens in order to evaluate measures for reducing contamination of fresh fruit and vegetables. *Food and Waterborne Parasitology*, 14, e00034.
6. Berger CN, Sodha SV, Shaw RK, Griffin PM, Pink D, Hand P, Frankel G. 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology*, 12, 2385–2397.
7. Blaszkowska J, Kurnatowski P, Damińska P. 2011. Contamination of the soil by eggs of geohelminths in rural areas of Lodz district (Poland). *Helminthologia*, 48, 67–76.
8. Borcard D, Gillet F, Legendre P. 2011. *Numerical Ecology with R*. Springer New York: New York, NY.
9. Bouwknegt M, Devleeschauwer B, Graham H, Robertson LJ, Giessen JW van der. 2018. Prioritisation of food-borne parasites in Europe, 2016. *Eurosurveillance*, 23.
10. Bradley CA, Altizer S. 2006. Urbanization and the ecology of wildlife diseases. *Trends in Ecology & Evolution*, 22, 95–102.
11. Chalmers RM, Robertson LJ, Dorny P, Jordan S, Kärssin A, Katzer F, La Carbona S, Lalle M, Lassen B, Mladineo I, Rozycki M, Biliska-Zajac E, Schares G, Mayer-Scholl A, Trevisan C, Tysnes K, Vasilev S, Klotz C. 2020. Parasite detection in food: Current status and future needs for validation. *Trends in Food Science & Technology*, 99, 337–350.

12. Collender PA, Kirby AE, Addiss DG, Freeman MC, Remais JV. 2015. Methods for Quantification of Soil-Transmitted Helminths in Environmental Media: Current Techniques and Recent Advances. *Trends in Parasitology*, 31, 625–639.
13. Combes B, Comte S, Raton V, Raoul F, Boué F, Umhang G, Favier S, Dunoyer C, Woronoff N, Giraudoux P. 2012. Westward Spread of *Echinococcus multilocularis* in Foxes, France, 2005–2010. *Emerging Infectious Diseases*, 18, 2059–2062.
14. Conraths FJ, Deplazes P. 2015. *Echinococcus multilocularis*: Epidemiology, surveillance and state-of-the-art diagnostics from a veterinary public health perspective. *Veterinary Parasitology*, 213, 149–161.
15. Da Silva AM, Courquet S, Raoul F, Rieffel D, Giraudoux P, Millon L, Knapp J. 2020. Assessment of the exposure to *Echinococcus multilocularis* associated with carnivore faeces using real-time quantitative PCR and flotation technique assays. *International Journal for Parasitology*, 50, 1195–1204.
16. Deplazes P, Hegglin D, Gloor S, Romig T. 2004. Wilderness in the city: the urbanization of *Echinococcus multilocularis*. *Trends in Parasitology*, 20, 77–84.
17. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Koutsoumanis K, Allende A, Alvarez-Ordóñez A, Bolton D, Bover-Cid S, Chemaly M, Davies R, De Cesare A, Herman L, Hilbert F, Lindqvist R, Nauta M, Peixe L, Ru G, Simmons M, Skandamis P, Suffredini E, Cacciò S, Chalmers R, Deplazes P, Devleeschauwer B, Innes E, Romig T, Giessen J van der, Hempen M, Van der Stede Y, Robertson L. 2018. Public health risks associated with food-borne parasites. *EFSA Journal*, 16.
18. Eisen AKA, Demoliner M, Oliveira KG de, Troian EA, Mallmann L, Filippi M, Almeida PR de, Spilki FR, Eisen AKA, Demoliner M, Oliveira KG de, Troian EA, Mallmann L, Filippi M, Almeida PR de, Spilki FR. 2019. Soil contamination of a public park by human and canine mastadenovirus, as well as hookworms and *Toxocara* spp eggs. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 61.
19. Espírito-Santo C, Rosalino LM, Santos-Reis M. 2007. Factors Affecting the Placement of Common Genet Latrine Sites in a Mediterranean Landscape in Portugal. *Journal of Mammalogy*, 88, 201–207.
20. Fischer C, Reperant LA, Weber JM, Hegglin D, Deplazes P. 2005. *Echinococcus multilocularis* infections of rural, residential and urban foxes (*Vulpes vulpes*) in the canton of Geneva, Switzerland. *Parasite*, 12, 339–346.
21. Forin-Wiart M-A, Gotteland C, Gilot-Fromont E, Poulle M-L. 2014. Assessing the homogeneity of individual scat detection probability using the bait-marking method on a

- monitored free-ranging carnivore population. *European Journal of Wildlife Research*, 60, 665–672.
22. Gecchele LV, Pedersen AB, Bell M. 2020. Fine-scale variation within urban landscapes affects marking patterns and gastrointestinal parasite diversity in red foxes. *Ecology and Evolution*, 10, 13796–13809.
 23. Gras P, Knuth S, Börner K, Marescot L, Benhaïem S, Aue A, Wittstatt U, Kleinschmit B, Kramer-Schadt S. 2018. Landscape Structures Affect Risk of Canine Distemper in Urban Wildlife. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6.
 24. Guggisberg AR, Alvarez Rojas CA, Kronenberg PA, Miranda N, Deplazes P. 2020. A Sensitive, One-Way Sequential Sieving Method to Isolate Helminths' Eggs and Protozoal Oocysts from Lettuce for Genetic Identification. *Pathogens*, 9, 624.
 25. Hegglin D, Deplazes P. 2013. Control of *Echinococcus multilocularis*: Strategies, feasibility and cost–benefit analyses. *International Journal for Parasitology*, 43, 327–337.
 26. Kapel CMO, Torgerson PR, Thompson RCA, Deplazes P. 2006. Reproductive potential of *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected foxes, dogs, raccoon dogs and cats. *International Journal for Parasitology*, 36, 79–86.
 27. Kłapeć T, Borecka A. 2012. Contamination of vegetables, fruits and soil with geohelminths eggs on organic farms in Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 19, 6.
 28. Knapp J, Combes B, Umhang G, Aknouche S, Millon L. 2016. Could the domestic cat play a significant role in the transmission of *Echinococcus multilocularis*? A study based on qPCR analysis of cat feces in a rural area in France. *Parasite*, 23.
 29. Knapp J, Umhang G, Poulle M-L, Millon L. 2016. Development of a Real-Time PCR for a Sensitive One-Step Coprodiagnosis Allowing both the Identification of Carnivore Feces and the Detection of *Toxocara* spp. and *Echinococcus multilocularis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82, 2950–2958.
 30. Knapp J, Giraudoux P, Combes B, Umhang G, Boué F, Said-Ali Z, Aknouche S, Garcia C, Vacheyrou M, Laboissière A, Raton V, Comte S, Favier S, Demerson J-M, Caillot C, Millon L, Raoul F. 2018. Rural and urban distribution of wild and domestic carnivore stools in the context of *Echinococcus multilocularis* environmental exposure. *International Journal for Parasitology*, 48, 937–946.
 31. Knapp J, Millon L, Mouzon L, Umhang G, Raoul F, Ali ZS, Combes B, Comte S, Gbaguidi-Haore H, Grenouillet F, Giraudoux P. 2014. Real time PCR to detect the environmental

- faecal contamination by *Echinococcus multilocularis* from red fox stools. *Veterinary Parasitology*, 201, 40–47.
32. Lass A, Szostakowska B, Myjak P, Korzeniewski K. 2015. The first detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in environmental fruit, vegetable, and mushroom samples using nested PCR. *Parasitology Research*, 114, 4023–4029.
 33. Liccioli S, Giraudoux P, Deplazes P, Massolo A. 2015. Wilderness in the ‘city’ revisited: different urbes shape transmission of *Echinococcus multilocularis* by altering predator and prey communities. *Trends in Parasitology*, 31, 297–305.
 34. Liccioli S, Kutz SJ, Ruckstuhl KE, Massolo A. 2014. Spatial heterogeneity and temporal variations in *Echinococcus multilocularis* infections in wild hosts in a North American urban setting. *International Journal for Parasitology*, 44, 457–465.
 35. Mandarin-Pereira A, Souza FS de, Lopes CWG, Pereira MJS. 2010. Prevalence of parasites in soil and dog feces according to diagnostic tests. *Veterinary Parasitology*, 170, 176–181.
 36. Nonaka N, Sano T, Inoue T, Teresa Armua M, Fukui D, Katakura K, Oku Y. 2009. Multiplex PCR system for identifying the carnivore origins of faeces for an epidemiological study on *Echinococcus multilocularis* in Hokkaido, Japan. *Parasitology Research*, 106, 75–83.
 37. Otero D, Alho AM, Nijse R, Roelfsema J, Overgaauw P, Madeira de Carvalho L. 2018. Environmental contamination with *Toxocara* spp. eggs in public parks and playground sandpits of Greater Lisbon, Portugal. *Journal of Infection and Public Health*, 11, 94–98.
 38. Otranto D, Deplazes P. 2019. Zoonotic nematodes of wild carnivores. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 9, 370–383.
 39. Overgaauw PAM. 1996. Effect of a government educational campaign in the Netherlands on awareness of *Toxocara* and toxocarosis. *Preventive Veterinary Medicine*, 28, 165–174.
 40. Petavy AF, Tenora F, Deblock S, Sergent V. 2000. *Echinococcus multilocularis* in domestic cats in France A potential risk factor for alveolar hydatid disease contamination in humans. *Veterinary Parasitology*, 6.
 41. Piarroux M, Gaudart J, Bresson-Hadni S, Bardonnnet K, Faucher B, Grenouillet F, Knapp J, Dumortier J, Watelet J, Gerard A, Beytout J, Abergel A, Wallon M, Vuitton DA, Piarroux R, Network collective the F. 2015. Landscape and climatic characteristics associated with human alveolar echinococcosis in France, 1982 to 2007. *Eurosurveillance*, 20, 21118.

42. Piarroux M, Piarroux R, Knapp J, Bardonnnet K, Dumortier J, Watelet J, Gerard A, Beytout J, Abergel A, Bresson-Hadni S, Gaudart J. 2013. Populations at Risk for Alveolar Echinococcosis, France. *Emerging Infectious Diseases*, 19, 721–728.
43. Poulle M-L, Bastien M, Richard Y, Josse-Dupuis É, Aubert D, Villena I, Knapp J. 2017. Detection of *Echinococcus multilocularis* and other foodborne parasites in fox, cat and dog faeces collected in kitchen gardens in a highly endemic area for alveolar echinococcosis. *Parasite*, 24, 29.
44. Pullan RL, Smith JL, Jasrasaria R, Brooker SJ. 2014. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. *Parasites & Vectors*, 7, 37.
45. R Core Team. 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria.
46. Raoul F, Deplazes P, Nonaka N, Piarroux R, Vuitton D., Giraudoux P. 2001. Assessment of the epidemiological status of *Echinococcus multilocularis* in foxes in France using ELISA coprotests on fox faeces collected in the field. *International Journal for Parasitology*, 31, 1579–1588.
47. Raoul F, Hegglin D, Giraudoux P. 2015. Trophic ecology, behaviour and host population dynamics in *Echinococcus multilocularis* transmission. *Veterinary Parasitology*, 213, 162–171.
48. Ristić M, Miladinović-Tasić N, Dimitrijević S, Nenadović K, Bogunović D, Stepanović P, Ilić T. 2020. Soil and sand contamination with canine intestinal parasite eggs as a risk factor for human health in public parks in Niš (Serbia). *Helminthologia*, 57, 109–119.
49. Robardet E, Giraudoux P, Caillot C, Augot D, Boue F, Barrat J. 2011. Fox defecation behaviour in relation to spatial distribution of voles in an urbanised area: An increasing risk of transmission of *Echinococcus multilocularis*? *International Journal for Parasitology*, 41, 145–154.
50. Robardet E, Giraudoux P, Caillot C, Boue F, Cliquet F, Augot D, Barrat J. 2008. Infection of foxes by *Echinococcus multilocularis* in urban and suburban areas of Nancy, France: influence of feeding habits and environment. *Parasite*, 15, 77–85.
51. Robertson LJ, Gjerde B. 2001. Occurrence of parasites on fruits and vegetables in Norway. *Journal of Food Protection*, 64, 1793–1798.
52. Robertson LJ, Giessen JWB van der, Batz MB, Kojima M, Cahill S. 2013. Have foodborne parasites finally become a global concern? *Trends in Parasitology*, 29, 101–103.
53. Rousseau A, La Carbona S, Dumètre A, Robertson LJ, Gargala G, Escotte-Binet S, Favennec L, Villena I, Gérard C, Aubert D. 2018. Assessing viability and infectivity of

- foodborne and waterborne stages (cysts/oocysts) of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., and *Toxoplasma gondii*: a review of methods. *Parasite*, 25.
54. Sanchez DM, Krausman PR, Livingston TR, Gipson PS. 2004. Persistence of carnivore scat in the Sonoran Desert. *Wildlife Society Bulletin*, 32, 366–372.
55. Shapiro K, Bahia-Oliveira L, Dixon B, Dumètre A, Wit LA de, VanWormer E, Villena I. 2019. Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: Oocysts in water, soil and food. *Food and Waterborne Parasitology*, 15, e00049.
56. Simon JA, Kurdzielewicz S, Jeannot E, Dupuis E, Marnef F, Aubert D, Villena I, Poulle M-L. 2017. Spatial distribution of soil contaminated with *Toxoplasma gondii* oocysts in relation to the distribution and use of domestic cat defecation sites on dairy farms. *International Journal for Parasitology*, 47, 357–367.
57. Simonato G, Cassini R, Morelli S, Di Cesare A, La Torre F, Marcer F, Traversa D, Pietrobelli M, Frangipane di Regalbono A. 2019. Contamination of Italian parks with canine helminth eggs and health risk perception of the public. *Preventive Veterinary Medicine*, 172, 104788.
58. Soulsbury CD, Baker PJ, Iossa G, Harris S. 2008. Fitness costs of dispersal in red foxes (*Vulpes vulpes*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62, 1289–1298.
59. Szostakowska B, Lass A, Kostyra K, Pietkiewicz H, Myjak P. 2014. First finding of *Echinococcus multilocularis* DNA in soil: preliminary survey in Varmia-Masuria Province, northeast Poland. *Veterinary Parasitology*, 203, 73–79.
60. Tackmann K, Löschner U, Mix H, Staubach C, Thulke HH, Ziller M, Conraths FJ. 2001. A field study to control *Echinococcus multilocularis*-infections of the red fox (*Vulpes vulpes*) in an endemic focus. *Epidemiology and Infection*, 127, 577–587.
61. Thevenet PS, Alvarez HM, Torrecillas C, Jensen O, Basualdo JA. 2020. Dispersion of *Echinococcus granulosus* eggs from infected dogs under natural conditions in Patagonia, Argentina. *Journal of Helminthology*, 94.
62. Thevenet PS, Jensen O, Drut R, Cerrone GE, Grenóvero MS, Alvarez HM, Targovnik HM, Basualdo JA. 2005. Viability and infectiousness of eggs of *Echinococcus granulosus* aged under natural conditions of inferior arid climate. *Veterinary Parasitology*, 133, 71–77.
63. Thompson RCA, Kapel CMO, Hobbs RP, Deplazes P. 2006. Comparative development of *Echinococcus multilocularis* in its definitive hosts. *Parasitology*, 132, 709–716.
64. Torgerson PR, Schweiger A, Deplazes P, Pohar M, Reichen J, Ammann RW, Tarr PE, Halkik N, Müllhaupt B. 2008. Alveolar echinococcosis: from a deadly disease to a well-

- controlled infection. Relative survival and economic analysis in Switzerland over the last 35 years. *Journal of Hepatology*, 49, 72–77.
65. Traversa D. 2012. Pet roundworms and hookworms: A continuing need for global worming. *Parasites & Vectors*, 5, 91.
66. Traversa D, Frangipane di Regalbano A, Di Cesare A, La Torre F, Drake J, Pietrobelli M. 2014. Environmental contamination by canine geohelminths. *Parasites & Vectors*, 7, 67.
67. Umhang G, Bastien M, Renault C, Faisse M, Caillot C, Boucher J-M, Hormaz V, Poulle M-L, Boué F. 2017. A flotation/sieving method to detect *Echinococcus multilocularis* and *Toxocara* spp. eggs in soil by real-time PCR. *Parasite*, 24, 28.
68. Umhang G, Forin-Wiart M-A, Hormaz V, Caillot C, Boucher J-M, Poulle M-L, Boué F. 2015. *Echinococcus multilocularis* detection in the intestines and feces of free-ranging domestic cats (*Felis s. catus*) and European wildcats (*Felis s. silvestris*) from northeastern France. *Veterinary Parasitology*, 214, 75–79.
69. Utaaker KS, Skjerve E, Robertson LJ. 2017. Keeping it cool: Survival of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts on lettuce leaves. *International Journal of Food Microbiology*, 255, 51–57.
70. Vaniscotte A, Raoul F, Poulle ML, Romig T, Dinkel A, Takahashi K, Guislain MH, Moss J, Tiaoying L, Wang Q, Qiu J, Craig PS, Giraudoux P. 2011. Role of dog behaviour and environmental fecal contamination in transmission of *Echinococcus multilocularis* in Tibetan communities. *Parasitology*, 138, 1316–1329.
71. Veit P, Bilger B, Schad V, Schäfer J, Frank W, Lucius R. 1995. Influence of environmental factors on the infectivity of *Echinococcus multilocularis* eggs. *Parasitology*, 110 (Pt 1), 79–86.

5. Conclusion

Les résultats concernant l'environnement urbain démontrent l'utilité des clôtures dans la protection contre l'intrusion des renards et donc, confirment la grande efficacité de cette mesure préventive contre la contamination initiale des sols par les parasites zoonotiques hébergés par les hôtes sauvages (Błaszowska *et al.*, 2015; Bastien *et al.*, 2019). Le fait qu'*E. multilocularis* a été détecté dans le sol de 19/50 potagers ruraux alors qu'aucun excrément positif au parasite n'avait été trouvé dans les 12 mois précédents pourrait s'expliquer par la persistance à long terme des œufs du parasite. Toutefois, seulement cinq échantillons de sols ont été collectés par potagers ruraux alors que leurs surfaces étaient très variables, allant de 15,6 à 8384 m² pour les 50 potagers ardennais inclus dans l'échantillonnage des sols et fèces. De plus, les fèces pouvaient être complètement dégradées et donc disparaître durant les périodes comprises entre les sessions de prospection. Ainsi, la collecte et l'analyse non exhaustives des fèces réellement déposées et de la contamination des sols peuvent vraisemblablement interférer dans l'étude du lien entre les dépôts fécaux et la contamination environnementale. Il importe donc de prendre en compte les biais d'échantillonnage des sols et de collecte des fèces dans des études futures pour étayer ces résultats sur la persistance des œufs dans le sol.

Discussion générale

*Intérêt méthodologique de l'étude : échantillonnage concomitant des fèces des différents HD d'*E. multilocularis*.*

Les facteurs de risque de transmission d'*E. multilocularis* varient en fonction des différents niveaux de perception spatiale (Danson *et al.*, 2003). À une échelle régionale, le paysage est un facteur déterminant dans la transmission du parasite alors qu'à une échelle locale, la transmission est liée à la distribution des fèces des HD et plus particulièrement des fèces porteuses des œufs du parasite ainsi qu'à la survie et la dispersion de ces œufs contrôlées par les conditions microclimatiques locales (Giraudoux *et al.*, 2002, 2013a; Danson *et al.*, 2003; Pleydell *et al.*, 2004). De plus, le risque zoonotique est largement modulé par la proximité entre l'endroit de dépôt des fèces porteuses du parasite et les populations humaines ainsi que par leurs activités ou facteurs comportementaux (Euzet and Combes, 1980; Holmes, 1987; Danson *et al.*, 2003; Macpherson, 2005; Guislain *et al.*, 2007). Le niveau et la persistance de la contamination environnementale par les œufs du parasite au plus près de l'homme apparaissent donc comme des paramètres clés qui affectent la transmission du parasite. La compréhension fine de ces paramètres apparaît indispensable pour initier des mesures de contrôle de l'abondance du parasite sur le terrain.

Pour estimer l'exposition à *E. multilocularis* pour l'homme et les rongeurs sensibles, il fallait ainsi s'intéresser à la distribution des fèces des trois principales espèces de carnivores – renards, chiens et chats – impliquées dans le cycle du parasite dans le contexte européen. Comme nous l'avons rappelé précédemment, des simulations basées sur le potentiel biotique d'*E. multilocularis* au sein des trois HD, la densité des HD et la quantité de fèces déposées par chaque hôte, ont identifié les renards roux et les chiens comme les plus responsables de la contamination environnementale par les œufs dans les zones rurales et urbaines d'endémicité faible ou élevée alors que le rôle du chat apparaît marginal (Hegglin and Deplazes, 2013; Knapp *et al.*, 2018). Cependant, comme l'ont défini Knapp *et al.* (2018), le risque d'exposition lié à chaque HD peut être l'association de, non seulement, la quantité de fèces, la prévalence du parasite dans les fèces, mais aussi, la charge d'œufs produite et la distribution spatiale des fèces. Par exemple, une faible prévalence des œufs associée à des dépôts fécaux fréquents et abondants des carnivores domestiques dans l'environnement immédiat de l'homme pourraient au final contribuer plus substantiellement au risque zoonotique. Par ailleurs, l'établissement d'un cycle synanthropique qui serait entretenu par les trois carnivores peut s'avérer particulièrement préoccupant en termes de santé publique (Otranto *et al.*, 2015a). Peu d'études ont cependant investigué la distribution concomitante des fèces des trois carnivores pour

identifier la contribution relative des HD au niveau de l'espèce et au niveau individuel dans la contamination environnementale par le parasite et pour comprendre la circulation du parasite entre ces différents HD.

*Principaux résultats : La superposition des fèces des renards, chiens et chats suggère que les trois HD pourraient être impliqués dans le cycle synanthropique d'*E. multilocularis*. Seulement quelques renards infectés sont responsables de la dissémination des œufs d'*E. multilocularis*, qui apparaissent groupés et persistants dans l'environnement. La comparaison des profils génétiques d'*E. multilocularis* supporte l'hypothèse selon laquelle les renards constituent le compartiment réservoir du parasite, qui alimente et maintient le cycle domestique entretenu par les chiens et chats.*

Notre étude a été conduite entièrement à une échelle locale. Il semble que ce niveau de perception soit préférable pour disposer d'informations fines sur la circulation du parasite parmi les hôtes et caractériser avec précision le cycle du parasite et le risque d'exposition pour les hôtes (Guislain *et al.*, 2007; Guislain, 2008). Les résultats de notre travail exploratoire (**Partie 1.4**) sont en concordance avec ceux rapportés par Knapp *et al.* (2018) par rapport à la particularité du degré de superposition de la distribution des fèces des carnivores domestiques, notamment des chiens avec celles des renards au centre de notre site d'étude. Cette observation suggère que les trois HD pourraient être impliqués dans un cycle synanthropique où le rôle de chaque protagoniste était à déterminer. La présence des œufs d'*E. multilocularis* a été confirmée en majorité dans les fèces de renards (**Partie 1.4**) et nous avons montré également que ces fèces portaient les plus fortes charges en œufs de Taeniidae (et probablement en œufs d'*E. multilocularis*) (**Table 8; Partie 2.4**). D'une part, ces résultats confirment le rôle prépondérant des populations vulpines dans la contamination environnementale par *E. multilocularis*. D'autre part, ces données supportent l'hypothèse selon laquelle les renards seraient le compartiment réservoir du parasite, qui alimenterait et maintiendrait le cycle (péri) domestique. En nous intéressant par la suite aux profils génétiques EmsB issus des œufs d'*E. multilocularis* isolés des fèces de chacune des trois espèces d'HD, nous avons identifié trois souches parasitaires locales, toutes présentes chez les renards alors que les chiens et les chats hébergeaient deux des trois souches (**Partie 2.4**). Ces résultats suggèrent l'implication des trois carnivores dans le cycle local du parasite, plus particulièrement des chats – hôte peu fertile pour la reproduction du parasite (Kapel *et al.*, 2006) –, dans la mesure où des œufs d'*E. multilocularis* avec des profils EmsB fiables ont été observés dans leurs fèces. De plus, ces profils étaient identiques avec ceux de patients atteints de l'EA dans la même région ou de régions proches (**Partie 2.4**).

Dès lors, le risque zoonotique lié au contact étroit avec les chiens et chats devrait être considéré. Par ailleurs, nous avons montré qu'il existait une hétérogénéité spatiale locale du risque d'exposition aux œufs d'*E. multilocularis* via les fèces de renards (**Partie 1.4**) (voir aussi les résultats de Giraudoux *et al.*, 2002; Robardet *et al.*, 2011; Knapp *et al.*, 2018), ce qui représente sans doute un enjeu clé dans la transmission micro-locale du parasite. Nous avons alors tenté d'explorer en profondeur cette surdispersion du parasite par l'évaluation de la contribution individuelle parmi la population locale de renards roux. De plus, la persistance de œufs a été investiguée dans un environnement (potagers) où l'homme pourrait être exposé directement à travers ses activités et habitudes alimentaires. Ainsi, l'identification individuelle des fèces de renards par génotypage a permis de montrer, qu'au cours des trois années de l'étude, seulement quelques individus parmi les renards porteurs d'*E. multilocularis*, avaient déposé la majorité des fèces testées positives pour le parasite (**Partie 1.5**). Ces individus sont susceptibles d'être des « super-propagateurs » du parasite dans l'environnement. Cette information apparaît pertinente pour la compréhension de la circulation locale du parasite et son contrôle. Par ailleurs, l'étude de la contamination des sols dans des jardins potagers où le parasite apparaît sur-disperser (Bastien, 2017; Poulle *et al.*, 2017) a confirmé la persistance à long terme des œufs dans le sol car des échantillons de sols testés positifs pour le parasite ont été retrouvés dans des potagers dans lesquels aucun excrément de renard n'a été trouvé (**Partie 3.4**). La disponibilité groupée des œufs dans l'environnement apparaît alors rémanente et pourrait contribuer à maintenir localement un niveau de pression d'exposition continu sur les rongeurs sensibles et peut être un risque zoonotique difficile à contrôler. L'ensemble des résultats tirés de cette étude est résumé dans la **Figure 29**.

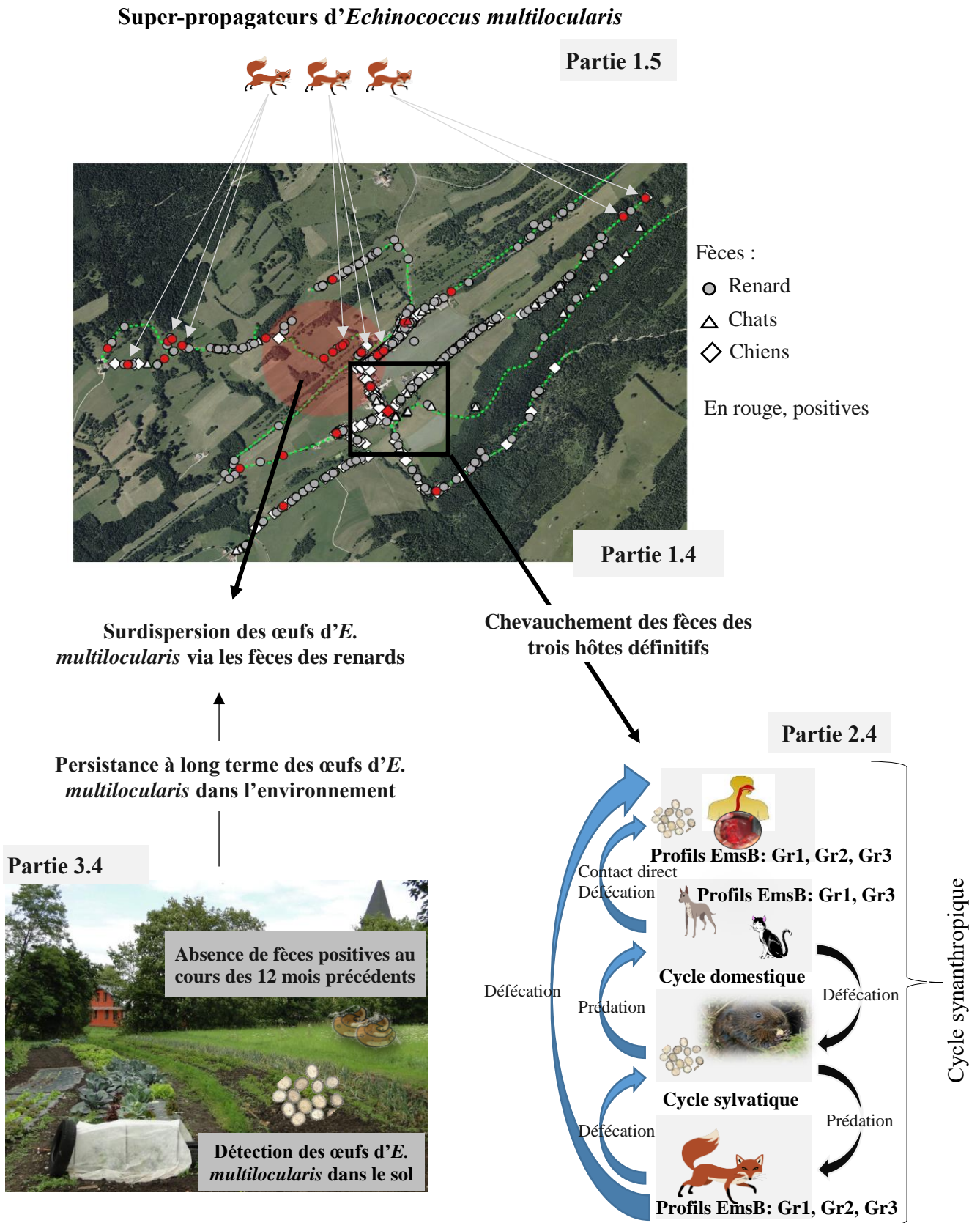


Figure 29 : Schéma sommaire des résultats obtenus au cours de cette étude.

Limites de l'étude : biais d'échantillonnage en raison de la faible quantité/qualité de l'ADN des hôtes et d'E. multilocularis contenu dans les fèces.

Notre approche méthodologique nous a permis ainsi de réaliser une étude intégrée de la circulation du parasite chez les trois HD et dans l'environnement. L'échantillonnage des fèces était plus adapté pour répondre à nos objectifs car l'autopsie d'une part, ne peut fournir aucune donnée sur l'hétérogénéité spatiale du dépôt des œufs du parasite (Pleydell *et al.*, 2004) et d'autre part, étant totalement exclue chez les hôtes domestiques, ne pouvait permettre l'étude des variants génétiques parasites circulant localement entre les trois carnivores. L'utilisation des copro-échantillons a cependant nécessité des étapes importantes de mise au point et d'optimisation de nos protocoles d'analyses. Malgré ces étapes d'optimisation, nos différents travaux ont pu être biaisés par le nombre restreint d'échantillons réellement inclus dans les analyses, en raison notamment de la faible quantité et/ou qualité de l'ADN (des hôtes et du parasite) inhérentes aux échantillons non-invasifs (Taberlet and Luikart, 1999; Valière, 2002a). Par exemple, les profils EmsB identifiés parmi les populations de carnivores domestiques ne provenaient que de 3 copro-échantillons de chiens et d'un seul de chat. L'inclusion d'un plus grand nombre de fèces provenant d'hôtes domestiques contenant des œufs du parasite permettrait d'identifier d'éventuels profils parasites majoritaires communs aux trois hôtes. Ces données supplémentaires pourront servir à consolider les résultats sur le déséquilibre de la diversité génétique du parasite entre les différents hôtes et à mieux cerner les interconnexions entre les cycles sylvatiques et domestiques. De même, comparativement à la totalité des fèces de renards collectées (N=386), les analyses de génotypage et d'identification individuelle ont été réalisées avec succès pour un faible nombre d'entre eux (n=124) du fait notamment d'un manque de temps. Par exemple, la seule étape de mise au point du génotypage à partir des fèces a nécessité près d'un an de manipulations au laboratoire pour divers tests d'optimisation des protocoles d'extractions de copro-ADN et de multiplexage des réactions d'amplifications. Le génotypage de toutes les fèces de renard collectées permettrait de disposer d'un effectif assez conséquent d'individus pour étudier la variation temporelle de la prévalence du parasite parmi la population locale des renards. Disposer d'un effectif plus important permettrait aussi d'analyser plus finement la part des individus dans l'hétérogénéité spatiale de la dispersion des œufs en reliant la distribution de leurs fèces au cluster des fèces positives détecté sur le site d'étude.

1. Surdispersion des fèces porteuses des œufs d'*E. multilocularis*

La distribution agrégative des œufs d'E. multilocularis dans l'environnement représente un paramètre clé dans la transmission locale du parasite et un facteur de risque zoonotique majeur.

L'hétérogénéité de la distribution d'*E. multilocularis* parmi les hôtes a été démontrée dans plusieurs travaux et ceci à différentes échelles (Giraudoux *et al.*, 2002; Hansen *et al.*, 2004; Guislain *et al.*, 2007; Guislain, 2008; Burlet *et al.*, 2011; Said-Ali *et al.*, 2013; Liccioli *et al.*, 2014; Bastien, 2017; Poulle *et al.*, 2017; Fischer *et al.*, 2020). Dans tous les cas, la distribution agrégative des œufs représente un facteur de risque zoonotique majeur (Hansen *et al.*, 2004). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette distribution hétérogène micro-locale des œufs d'*E. multilocularis* observée via les fèces des renards sur le terrain (Hansen *et al.*, 2004). Il est possible que le marquage fécal soit la cause de la surdispersion des fèces contenant les œufs puisque nous avons montré qu'il pourrait exister une structuration des territoires sur le site d'étude pour quelques individus identifiés qui avaient déposé des fèces suffisamment dispersées permettant d'évaluer la taille minimale de leur domaine vital par le tracé d'un polygone convexe (**Partie 1.6**). Cependant, la distribution spatiale hétérogène des rongeurs sensibles peut être un argument valable puisque les rongeurs infectés seraient plus enclins à la prédation par les renards, l'infection diminuant fortement leur capacité de mobilité (Hansen *et al.*, 2004). Par voie de conséquences, les mêmes renards se réinfecteraient constamment par la prédation des rongeurs infectés présents dans leurs domaines vitaux et donc déposeraient plus fréquemment les fèces positives au même endroit. Cet argumentaire est corroboré d'une part, par l'existence démontrée de micro-foyers d'environ 10 m² dans lesquels les prévalences apparaissent très élevées parmi les rongeurs – plus de 12 à 15% contre une moyenne de 0,3% dans la zone d'étude et des prévalences à l'échelle régionale n'excédant généralement pas 1‰ même en zone de forte endémicité – (Giraudoux *et al.*, 2002); d'autre part, par les résultats de Liccioli *et al.* (2015b) qui ont rapporté que dans leur zone d'étude, plus de 50% des coyotes identifiés par leurs fèces se réinfectaient par *E. multilocularis* plusieurs fois par an. Il serait alors utile d'inclure les dynamiques des populations locales de rongeurs sensibles ainsi que les prévalences du parasite chez ces HI pour mieux comprendre la disponibilité groupée des œufs d'*E. multilocularis*. Enfin, il apparaît vraisemblable que l'hétérogénéité spatiale locale du risque d'exposition au parasite varie suivant les saisons car les œufs d'*E. multilocularis* persistent durablement dans des conditions fraîches mais perdent rapidement leur infectiosité dans des conditions de températures élevées et de faibles humidités (Veit *et al.*, 1995). De plus, nous

avons montré que le nombre de renards observés durant plusieurs années était significativement faible par rapport aux individus observés durant une seule année (**Partie 1.5**) (voir aussi les résultats d'Amalke *et al.*, 2018), ce qui suggère un taux de renouvellement important de la population locale et donc possiblement un changement fréquent des domaines vitaux. La distribution des fèces contenant les œufs du parasite pourrait alors également varier spatialement.

Comme nous l'avons vu dans la première partie de nos travaux concernant la commune des Alliés, l'analyse descriptive préliminaire permet de mettre en évidence sur les deux autres communes incluses dans le projet MONIZOO, le dépôt important de fèces de renards et chiens (**Tableau 12**), HD identifiés comme les plus responsables de la contamination environnementale par *E. multilocularis* (Hegglin and Deplazes, 2013). De même, l'ADN d'*E. multilocularis* a été révélé majoritairement dans les fèces de renards et plus surprenant, plus dans les fèces de chats que celles de chiens (**Tableau 12**). Par ailleurs, la présence d'ADN de *Toxocara* spp. a été largement détectée dans les fèces de chats et de renards (**Tableau 12**). Dès lors, des analyses plus approfondies des données issues des trois communes permettront de consolider nos constats et de disposer de résultats consistants pour la compréhension fine de la variation spatio-temporelle du risque d'exposition au parasite *E. multilocularis*. Il est prévu notamment l'étude des différences spatiales, intra et inter-saisonniers des prévalences parasitaires fécales et ceci en fonction de différents paramètres géographiques et météorologiques – altitude, type de paysage, températures, enneigement, hauteur des précipitations, humidités – et éventuellement, des dynamiques de populations des HI sur chacun des trois sites.

Tableau 12 : Répartition des fèces collectées en fonction des principales espèces émettrices et des parasites *Echinococcus multilocularis* et *Toxocara* spp. identifiés par qPCRs sur les trois sites d'étude du projet « Monitoring des Zoonoses ».

Hôtes	Parasites	Les Alliés	Rogéville	Velaine-sous-Amance
Chien	<i>E. multilocularis</i>	18 (2,6%)	7 (1,9%)	5 (0,8%)
	<i>Toxocara</i> spp.	25 (3,7%)	1 (0,3%)	27 (4,2%)
	Em + <i>Toxocara</i>	0	0	0
	No. de fèces	679	368	639
	%	57,0	27,9	41,6
Renard	<i>E. multilocularis</i>	79 (20,5%)	161 (18,3%)	152 (20,7%)
	<i>Toxocara</i> spp.	85 (21,9%)	155 (17,7%)	123 (16,7%)
	Em + <i>Toxocara</i>	23 (5,9%)	31 (3,5%)	40 (5,4%)
	No. de fèces	386	878	735
	%	32,4	66,6	47,9
Chat	<i>E. multilocularis</i>	6 (7,2%)	4 (9,8%)	2 (2%)
	<i>Toxocara</i> spp.	53 (63,9%)	26 (63,4%)	61 (62,2%)
	Em + <i>Toxocara</i>	3 (3,6%)	3 (7,3%)	2 (2%)
	No. de fèces	83	41	98
	%	7,0	3,1	6,4
ND	<i>E. multilocularis</i>	3 (6,9%)	2 (6,2%)	5 (7,9%)
	<i>Toxocara</i> spp.	2 (4,6%)	3 (9,4%)	11 (17,5%)
	Em + <i>Toxocara</i>	0	2 (6,2%)	1 (1,6%)
	No. de fèces	43	32	63
Total no. fèces		1191	1319	1535

Em, *E. multilocularis* ; ND, indéterminées ; No., nombre ; %, pourcentage par rapport au total de fèces collectées sur le site.

2. Contribution individuelle hétérogène des hôtes définitifs dans la contamination environnementale par *E. multilocularis*

Une forte circulation d'E. multilocularis parmi la population locale de renards identifiée grâce au copro-génotypage associé à la détection d'ADN du parasite par qPCR.

La prévalence élevée (57,78%) d'*E. multilocularis* que nous avons rapportée parmi la population locale des renards sur la zone d'étude indique une forte circulation locale du parasite (**Partie 1.5**). Cette prévalence obtenue par copro-génotypage est corroborée par des études antérieures qui ont estimé la prévalence du parasite avec la méthode de référence par l'examen post-mortem du contenu intestinal des renards (Raoul *et al.*, 2001; Combes *et al.*, 2012). L'estimation de la prévalence basée sur le génotypage à partir des fèces présume qu'au moins une déjection positive pour le parasite a été collectée pour les individus hébergeant le parasite. Il est donc tout à fait justifié d'avoir recours à une méthode de détection d'ADN du parasite –

qPCR dans notre cas – (Knapp *et al.*, 2014, 2016a), plutôt que de rechercher uniquement les œufs du parasite car l'ADN libre du parasite peut être détecté dans les fèces durant toutes les périodes de l'infestation chez l'animal alors que les œufs ne sont excrétés que pendant la période patente (28 à 30 jours après le début de l'ingestion du métacyste ; Eckert *et al.*, 2001a; Kapel *et al.*, 2006; Al-Sabi' *et al.*, 2007). De plus, nous avons démontré que la qPCR spécifique détecte probablement plus d'ADN libre du parasite dans les fèces (**Partie 1.4**). Il est donc très probable que nous ayons identifié le statut parasitaire (pour *E. multilocularis*) des renards ayant déposé plusieurs fèces. En revanche, pour les individus dont seulement un copro-échantillon a été identifié, il apparaît incertain que nous ayons pu détecter leur statut vis-à-vis du parasite. C'est une raison supplémentaire pour tenter le génotypage pour toutes les fèces de renards trouvées sur le terrain. Cependant, la fiabilité de la prévalence était basée sur un effort d'échantillonnage – nombre minimal d'échantillons et d'individus requis pour estimer la prévalence à un niveau de confiance de 95% et à une précision de 10% – qui s'est révélé largement suffisant (**Partie 1.5**). Pour rappel, la taille de la population était estimée à 67 individus dont il faudrait échantillonner au minimum 35 individus pour évaluer fiablement la prévalence. Nous en avons échantillonné 45 au total.

Cet effort d'échantillonnage était donc calculé principalement à partir de la taille estimée de la population et d'autres paramètres comme le taux de succès du protocole de génotypage et les fréquences d'identification des individus. La difficulté d'estimation de la taille d'une population avec les méthodes noninvasives basées souvent sur le génotypage à partir d'ADN des individus isolés des fèces ou des poils repose sur la possibilité de multiples captures (identifications d'ADN) d'un même individu au cours d'une même session d'échantillonnage (Miller *et al.*, 2005). Plus précisément, dans notre cas, plusieurs fèces de certains individus ont été collectées et leurs ADN identifiés plusieurs fois alors qu'un seul échantillon a été collecté et génotypé avec succès pour d'autres individus au cours d'une même session. Dans les méthodes traditionnelles de capture-marquage-recapture, chaque individu est capturé une seule fois par session d'échantillonnage et les estimations d'abondance sont basées sur la probabilité de capture de chaque individu dans chaque session d'échantillonnage (Miller *et al.*, 2005). De toute évidence, ces méthodes sont contraignantes à appliquer pour l'étude des espèces sauvages et pour les parasites vivant dans les cavités internes des hôtes (Banks *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2011; Liccioli *et al.*, 2015b). Nous avons donc eu recours à une approche d'estimation qui tient compte de la possibilité de multiples détections d'un même individu au cours d'une session de collecte. Toutefois, ce modèle suppose que la population est fermée et qu'il n'y a eu ni

naissance, ni décès, ni immigration, etc. (Miller *et al.*, 2005; Pennell *et al.*, 2013). L'estimation de taille avec une hypothèse de population fermée est probablement plausible dans les cas où une seule session de collecte a été effectuée ou plusieurs sessions d'échantillonnage ont été conduites sur une période relativement courte (Banks *et al.*, 2002; Frantz *et al.*, 2003; Prugh *et al.*, 2005). Bien que nous ayons effectué des sessions de collecte pendant trois années consécutives, ce modèle semble être adapté à nos données vu le nombre relativement petit des fèces identifiées avec succès (n=124), et à notre but qui était d'estimer le nombre total d'individus ayant été présents sur le site durant la période d'étude et non d'autres paramètres comme les taux de survie, les variations de populations, etc. (pour plus de détails, voir Prugh *et al.*, 2005).

Environ 35% des renards infectés avaient déposé 60% des fèces testées positives pour l'ADN d'E. multilocularis.

Les 26 renards infectés sur les 45 identifiés ont déposé entre une et 10 déjections testées positives pour *E. multilocularis* (**Partie 1.5**), indiquant une forte variation de la part des individus dans la contamination de l'environnement par le parasite. Les œufs de Taeniidae (confirmés *E. multilocularis* par qPCR) ont été observés uniquement dans les fèces de 8 individus sur les 26 infectés (**Table 8, Partie 2.4**). Leur comptage par 100 µl de culot de flottaison des fèces a montré un nombre maximal de 9 à 796 œufs par individu (**Table 8**), suggérant qu'il existe une forte disparité entre les individus infectés dans l'excrétion des formes infectieuses parasitaires dans l'environnement. Nous avons trouvé qu'environ 35% des individus infectés avaient déposé 60% des fèces testées positives pour l'ADN du parasite (**Partie 1.5**). Par le décompte des œufs, il semble probable que le pourcentage d'individus excréant de fortes charges d'œufs dans leurs fèces soit encore plus faible. Cette forte hétérogénéité dans la contamination de l'environnement est probablement liée à la forte agrégation de la biomasse parasitaire au sein des renards (Hofer *et al.*, 2000; Eckert *et al.*, 2001c; Raoul *et al.*, 2001; Tackmann *et al.*, 2001; Guislain, 2008; Robardet *et al.*, 2008). Par exemple, Fischer *et al.* (2005) ont trouvé que seulement près de 10% des renards échantillonnés hébergeaient 97% de la biomasse du parasite dans une zone d'endémie en Suisse. Dès lors, ces quelques individus sont plus susceptibles de contaminer l'environnement avec de fortes charges d'œufs du parasite. Par ailleurs, l'excrétion séquentielle des œufs – chaque ver libère un proglottis terminal ovigère contenant en moyenne 300 œufs tous les 10 jours (Eckert *et al.*, 2001c) – traduit probablement une dynamique temporelle parmi les individus infectés dans la contamination environnementale avec les fèces. Bien que cette étude soit la première à

caractériser la contribution individuelle des renards dans la contamination de l'environnement par *E. multilocularis*, plusieurs études antérieures avaient suspecté une inégalité du rôle des individus dans le dépôt des fèces positives. Comme pour d'autres helminthes (Levecke *et al.*, 2015), les observations démontrant que peu d'individus excrètent la majorité des formes libres parasites sont probablement valables pour *E. multilocularis*. Par exemple, Bastien (2017) avait remarqué une autocorrélation spatiale significative entre les fèces testées positives pour *E. multilocularis* collectées dans les jardins potagers distants de moins de 500 m, ce qui laisse penser qu'un même individu pourrait déposer les fèces porteuses du parasite dans ces différents potagers situés dans un même village. En raison même de l'agrégation du parasite au sein des hôtes, la variabilité des dépôts fécaux positifs suivant les individus était attendue (Eckert *et al.*, 2001c; Vaniscotte, 2009; Vaniscotte *et al.*, 2011; Liccioli *et al.*, 2015b). De même, la distribution agrégative d'*E. multilocularis* parmi les chiens a été démontrée (Budke *et al.*, 2005b), laissant penser que leur contribution dans la contamination de l'environnement pourrait également être hétérogène. En ce qui concerne les chats, la prévalence d'*E. multilocularis* dans leurs fèces semble supérieure à celle des fèces de chiens sur les trois sites du projet MONIZOO (**Tableau 12**) alors que les chats sont décrits comme des hôtes chez qui le parasite a un très faible potentiel biotique (Kapel *et al.*, 2006). Cette observation est probablement due au petit nombre d'échantillons collectés pour les chats car, en nombre absolu, le nombre de fèces positives est bien plus faible pour les chats que pour les chiens (**Tableau 12**). On ne peut toutefois pas exclure un éventuel copro-échantillonnage multiple d'un même individu ou de quelques chats infectés. Enfin, une identification individuelle des hôtes domestiques permettrait de cibler plus précisément les mesures de déparasitage et de prévention envers les propriétaires d'animaux. Par exemple, l'identification génétique individuelle des fèces de chiens par Knapp *et al.* (en préparation) dans le cadre du projet SICAR a permis de recenser dans un premier temps les chiens présents sur la commune des Alliés en établissant une « carte d'identité génétique » à l'aide de 22 microsatellites spécifiques à partir de prélèvements de salive et de fèces recueillis avec l'accord des propriétaires de ces chiens. Dans un second temps, l'identification des chiens connus ayant déposé des fèces porteuses des œufs d'*E. multilocularis* sur le terrain permettrait donc de proposer des conseils de déparasitage des animaux et de dépistage sérologique précoce de l'EA pour les propriétaires.

3. Maintien du risque de transmission d'*E. multilocularis* dans l'environnement humain

La mise en évidence de géotypes d'E. multilocularis communs aux renards, chiens et chats démontre une connexion entre les cycles sylvatiques et domestiques.

La comparaison des profils EmsB obtenus à partir des œufs d'*E. multilocularis* tend à montrer que localement parmi les HD, les renards hébergent une population plus diversifiée du parasite, et que ces profils se retrouvent chez les carnivores domestiques et chez les patients de la zone d'étude (**Partie 2.4**). Bien que notre échantillonnage apparaisse peu représentatif pour évaluer pleinement la richesse des profils et donc la diversité génétique du parasite parmi les populations des hôtes, la mise en évidence de géotypes communs aux trois HD démontre une connexion entre les cycles sylvatiques et domestiques. Les deux profils communs aux renards, chiens et chats – Gr1 et Gr3 apparentés respectivement aux profils P4/P5 et P9 dans la base de données EWET (Knapp *et al.*, 2017) – avaient été décrits précédemment comme des profils locaux chez les renards et les patients alors que le profil Gr2 – P1/P3 dans la base EWET – absent localement chez les chiens et chats semble être répandu chez les renards en Europe (Knapp *et al.*, 2020). Cette observation semble renforcer l'hypothèse de la transmission du parasite par les HD sauvages aux HD domestiques via la prédation des mêmes populations de rongeurs. Excepté le nombre limité de copro-échantillons provenant des HD domestiques analysés dans cette étude, il existe quelques zones d'ombre pour confirmer cette hypothèse :

- i) Chez les carnivores domestiques, on ne dispose pas de données de géotypage du parasite localement et très peu à larges échelles pour tenter une comparaison élargie de la diversité du parasite parmi les populations des carnivores domestiques (EWET, <https://ewet-db.univ-fcomte.fr/index.php?controller=Index&action=Index>);
- ii) De même, les informations sont manquantes sur les profils EmsB circulant localement chez les rongeurs, le chaînon manquant du cycle pour évaluer le continuum de la transmission locale du parasite entre les HD et les hôtes aberrants comme l'homme. Il semble toutefois qu'un seul profil soit souvent décrit chez les rongeurs à l'échelle micro-locale, suggérant qu'un seul ou quelques renards couvrant leur territoire soient la source de la contamination de leur environnement par les œufs du parasite (Knapp, 2008);
- iii) Enfin, en raison du délai long entre le dépistage de l'EA et le moment supposé de l'infection, il est difficile d'associer les géotypes d'*E. multilocularis* identifiés dans des lésions humaines aux géotypes du parasite hébergés par les renards ou les

carnivores domestiques (Knapp *et al.*, 2020), afin d'évaluer la contribution des cycles sylvatiques et domestiques dans le risque zoonotique.

Le risque zoonotique le plus important associé au cycle domestique d'E. multilocularis pourrait être imputable au contact direct et permanent entre les humains et les carnivores domestiques.

Le cycle sylvatique entretenu par les hôtes sauvages présente toutefois un intérêt épidémiologique majeur car il est probablement une source importante d'exposition humaine mais aussi de contamination des carnivores domestiques qui pourraient s'infecter en consommant les rongeurs infectés par les œufs contenus dans les fèces de renards (Eckert *et al.*, 2001c; Deplazes *et al.*, 2004, 2011; Vervaeke *et al.*, 2006). Le cycle synanthropique, une fois établi, peut à son tour être source de contamination pour les rongeurs sensibles, dans l'environnement des humains et donc participer à une circulation active du parasite au plus près de l'homme (Vaniscotte *et al.*, 2011). Ainsi, dans de nombreux contextes, la circulation du parasite parmi les HD domestiques a été décrite comme presque-exclusivement dépendante et entretenue par le cycle sylvatique (Eckert *et al.*, 2000; Eckert and Deplazes, 2004; Romig *et al.*, 2006). Ceci est justifié par le fait que les fèces de carnivores domestiques (chien notamment) se retrouvent très peu dans les habitats optimaux des rongeurs contrairement aux fèces de renards, qui apparaissent donc comme les principales sources de contamination des HI (Deplazes *et al.*, 2004; Romig *et al.*, 2006; Vaniscotte, 2009; Vaniscotte *et al.*, 2011). Par exemple, en Chine sur le plateau tibétain, les fèces de renards et de chiens ont été trouvées dans les mêmes zones à l'intérieur et autour des villages (Vaniscotte *et al.*, 2011). Des études de régime alimentaire ont montré que quelques mêmes espèces de rongeurs figuraient parmi les restes de proies retrouvées dans leurs fèces (Wang *et al.*, 2010), supposant que les deux HD participent probablement au maintien d'un cycle synanthropique proche des humains. Par ailleurs, des études épidémiologiques ont identifié la possession de chiens et de chats de compagnie comme un facteur de risque de l'EA (Kern *et al.*, 2004; Davidson *et al.*, 2012; Piarroux *et al.*, 2013; Kachani and Heath, 2014; Torgerson *et al.*, 2020), alors qu'il n'existe finalement aucune preuve évidente que le contact direct avec les renards soit associé à un risque plus significatif de la maladie chez l'homme (Torgerson *et al.*, 2020). Il semble alors probable que le risque le plus important associé au cycle domestique soit imputable au contact direct et permanent entre les humains et les carnivores domestiques.

4. Persistance de la contamination environnementale par les œufs d'*E. multilocularis*

Les œufs d'E. multilocularis sont susceptibles de persister dans le sol pendant au moins un an après le dépôt des fèces porteuses.

Un de nos résultats intéressants concerne l'absence d'association significative entre la détection d'échantillons de sol positifs aux œufs d'*E. multilocularis* dans les jardins potagers ruraux et l'intensité ainsi que la fréquence des dépôts fécaux de renards au cours des 12 mois précédents. De plus, les œufs du parasite ont été détectés dans 19/50 jardins dans lesquels aucun excrément de carnivores n'a été testé positif pour le parasite lors de huit sessions de prospection effectuées au cours des 12 mois précédents (**Partie 3.4**). Plus particulièrement, les fèces de renards dans lesquelles il est plus probable de trouver les œufs d'*E. multilocularis* comme nous l'avons démontré n'ont pas été détectées positives pour le parasite dans ces potagers. Ces résultats suggèrent que les œufs d'*E. multilocularis* sont susceptibles de persister dans le sol pendant au moins un an après le dépôt des fèces porteuses des œufs. Si nous tenons compte des conditions climatiques, il est possible que la distribution groupée des œufs d'*E. multilocularis* via les fèces de renards observée sur le site des Alliés implique une disponibilité persistante encore plus longtemps. En effet, le climat dans les Ardennes où sont échantillonnés les potagers ruraux est caractérisé par des précipitations moyennes annuelles de 942,6 mm et des températures moyennes annuelles comprises entre 4,8 et 14,6°C alors que les précipitations moyennes (1317 mm/an) sont plus abondantes et les températures moyennes (- 2,2 à 15,1°C) sont plus fraîches aux Alliés (www.meteofrance.com), soit des conditions encore plus favorables à la survie et à la persistance des œufs d'*E. multilocularis* (Veit *et al.*, 1995; Federer *et al.*, 2015). Toutefois, l'arrosage régulier des sols dans les potagers pendant les périodes les plus chaudes de l'année peut être un facteur favorable à la survie des œufs, prolongeant leur durée de vie et leur caractère infectieux en maintenant les œufs dans des conditions optimums d'hygrométrie (Veit *et al.*, 1995). Les données issues des analyses des échantillons de sol collectés dans le cadre du projet MONIZOO devraient permettre d'évaluer plus spécifiquement la présence et la persistance à long terme des œufs d'*E. multilocularis* dans le sol des trois sites en lien avec les éventuels clusters des dépôts fécaux porteurs du parasite. Néanmoins, le risque infectieux associé à la contamination environnementale par *E. multilocularis* reste entièrement à explorer. Il est nécessaire d'identifier les endroits où les œufs infectieux peuvent être trouvés afin d'évaluer les charges du parasite dans le sol (Mandarino-Pereira *et al.*, 2010). Par exemple, dans les conditions environnementales de la Patagonie en Argentine, les œufs d'*E. granulosus* sont restés infectieux 41 mois dans le sol après leur dépôt avec les fèces de chiens infectés

expérimentalement (Thevenet *et al.*, 2005). De plus, leur dispersion et la persistance de leur infectiosité sont liées à la direction du vent dominant, à la présence de buissons et d'étendues d'eau (Thevenet *et al.*, 2020). Il apparaît alors probable que sur nos sites d'étude, les conditions météorologiques influencent également la dispersion et la persistance de l'infectiosité des œufs d'*E. multilocularis* déposés dans l'environnement avec les fèces des HD. Il a été démontré que la plupart des œufs de Taeniidae restent en général dans un rayon de 180 m autour des endroits de dépôt des fèces porteuses mais certains peuvent se disperser rapidement sur une zone pouvant atteindre plusieurs milliers d'hectares (Gemmell *et al.*, 2001). Plusieurs facteurs peuvent concourir à la dispersion des œufs, entre autres la dissémination par l'action mécanique de l'homme ou par les eaux de ruissellement ou de pluies, le transport par les oiseaux ou par les invertébrés – mouches, cafards, etc. – ou encore par la microfaune du sol comme les amibes ou les vers de terre (Gemmell *et al.*, 2001; Quintaine, 2010; Deplazes *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2016; Umhang *et al.*, 2017b). Par ailleurs, bien que la consommation de végétaux crus soit identifiée comme un facteur de risque de l'EA, aucune étude n'a encore fourni de preuves directes du transfert et de la survie des œufs d'*E. multilocularis* sur les produits frais ou encore dans les eaux de consommation (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) *et al.*, 2018). Des preuves expérimentales récentes de la viabilité persistante d'autres formes infectieuses parasitaires comme les oocystes de *Cryptosporidium* spp. sur des feuilles de laitues pendant plus de 14 jours prouvent que les végétaux frais peuvent être un mode direct de transmission pour les parasites transmis par le sol (Utaaker *et al.*, 2017). La mise en évidence de fèces testées positives pour *E. multilocularis* à l'intérieur ou aux alentours des jardins potagers échantillonnés dans cette étude ainsi que la détection de l'ADN du parasite sur les végétaux frais dans d'autres études (Lass *et al.*, 2015; Guggisberg *et al.*, 2020; Barlaam *et al.*, 2021) plaident pour le développement de méthodes standardisées permettant le diagnostic d'*E. multilocularis* et sa persistance dans d'autres matrices environnementales (végétaux, eau, etc.). La finalité sera d'évaluer une plus large contamination de l'environnement par les œufs d'*E. multilocularis* en mettant en relation la présence du parasite dans ces diverses matrices avec la contamination des sols ou encore avec la distribution spatiale groupée des œufs via les fèces de carnivores notamment de renards.

5. Applications à la prévention et au contrôle de la contamination environnementale par *E. multilocularis*

Comme nous l'avons démontré, la contamination de l'environnement par les œufs d'*E. multilocularis* s'effectue essentiellement par les fèces porteuses du parasite de quelques renards

parmi la population locale. Il est possible que l'homme se contamine par l'ingestion accidentelle de ces œufs ou par le contact direct et fréquent avec les carnivores domestiques, eux-mêmes infestés via la prédation de rongeurs contaminés par les œufs du parasite répandus avec les fèces des renards. Il apparaît alors évident que les mesures de prévention de l'EA doivent se focaliser essentiellement sur le contrôle de l'abondance d'*E. multilocularis* parmi la population locale des renards afin de prévenir une part importante de la contamination environnementale par les œufs du parasite (**Figure 30**). Plusieurs approches de lutte contre le parasite visant les renards ont été testées sur le terrain. Dans une stratégie de contrôle des populations vulpines par le prélèvement d'individus, il s'est avéré que l'abattage, de plus en plus considéré comme contraire à l'éthique dans la plupart des pays, ne permet pas une réduction significative de la population (Ito *et al.*, 2003; Hegglin and Deplazes, 2013). Dans certains cas, l'abattage a même entraîné une augmentation de la prévalence d'*E. multilocularis* due probablement à un afflux de juvéniles, plus sensibles au parasite, vers les territoires vacants de la zone de régulation (Comte *et al.*, 2017; Umhang, 2017). Une autre approche consiste à éliminer les ressources alimentaires anthropiques autour des habitations pour limiter la fréquentation et la défécation des renards dans l'environnement humain. Il a été également proposé de réduire la densité des proies par le piégeage autour des zones sensibles d'activités humaines comme les potagers familiaux afin d'y limiter l'abondance des hôtes sauvages (Bastien, 2017). Plus spécifiquement, la pose de clôture suffisamment hermétique et surélevée d'au moins 1 m autour des jardins potagers est démontrée efficace contre les intrusions de renards et restreint drastiquement leurs dépôts fécaux (Bastien *et al.*, 2019, **Partie 3.4**). Les résultats les plus significatifs en termes de diminution de la prévalence d'*E. multilocularis* parmi les populations locales de renards et de réduction de la contamination environnementale par les œufs du parasite ont été obtenus avec les méthodes d'appâtage au praziquantel (Hegglin and Deplazes, 2013; König *et al.*, 2019). En raison des variations importantes des domaines vitaux des renards et du fait que le praziquantel ne procure pas une protection à vie contre le parasite, les programmes de distribution d'appâts sont toutefois complexes à mettre en œuvre et doivent être ajustés en ce qui concerne la fréquence de distribution, la durée totale de l'opération et la superficie de la zone à traiter (Ito *et al.*, 2003; Hegglin and Deplazes, 2013). Néanmoins, la plupart des opérations d'appâtage pour les renards effectuées sur des zones ayant des superficies comprises entre 3 et 3000 km² ont montré des réductions de prévalence d'*E. multilocularis* estimées jusqu'à 35 fois plus faibles que les prévalences initiales en Allemagne, en Suisse, au Japon ou encore en France (**Tableau 13**). Par ailleurs, au vu de nos résultats, le déparasitage régulier – à une fréquence recommandée de 4 semaines (Eckert and Deplazes, 2004) – des carnivores domestiques

notamment les chiens devrait être envisagé en zone de forte endémie d'EA (Deplazes *et al.*, 2011). La vermifugation pourrait éventuellement être combinée à des mesures empêchant les carnivores domestiques d'avoir accès aux micromammifères afin de réduire sensiblement la probabilité d'exposition et d'excrétion des œufs du parasite (Vaniscotte, 2009; Hegglin and Deplazes, 2013). Enfin, le risque d'infection étant largement modulé par des comportements favorables au contact avec le parasite, il importe de prévenir l'ingestion accidentelle des œufs par l'observation de mesures d'hygiène de base comme le lavage soigneux des végétaux consommés crus ou encore des mains après contact avec le sol ou le pelage des carnivores (**Figure 30**).

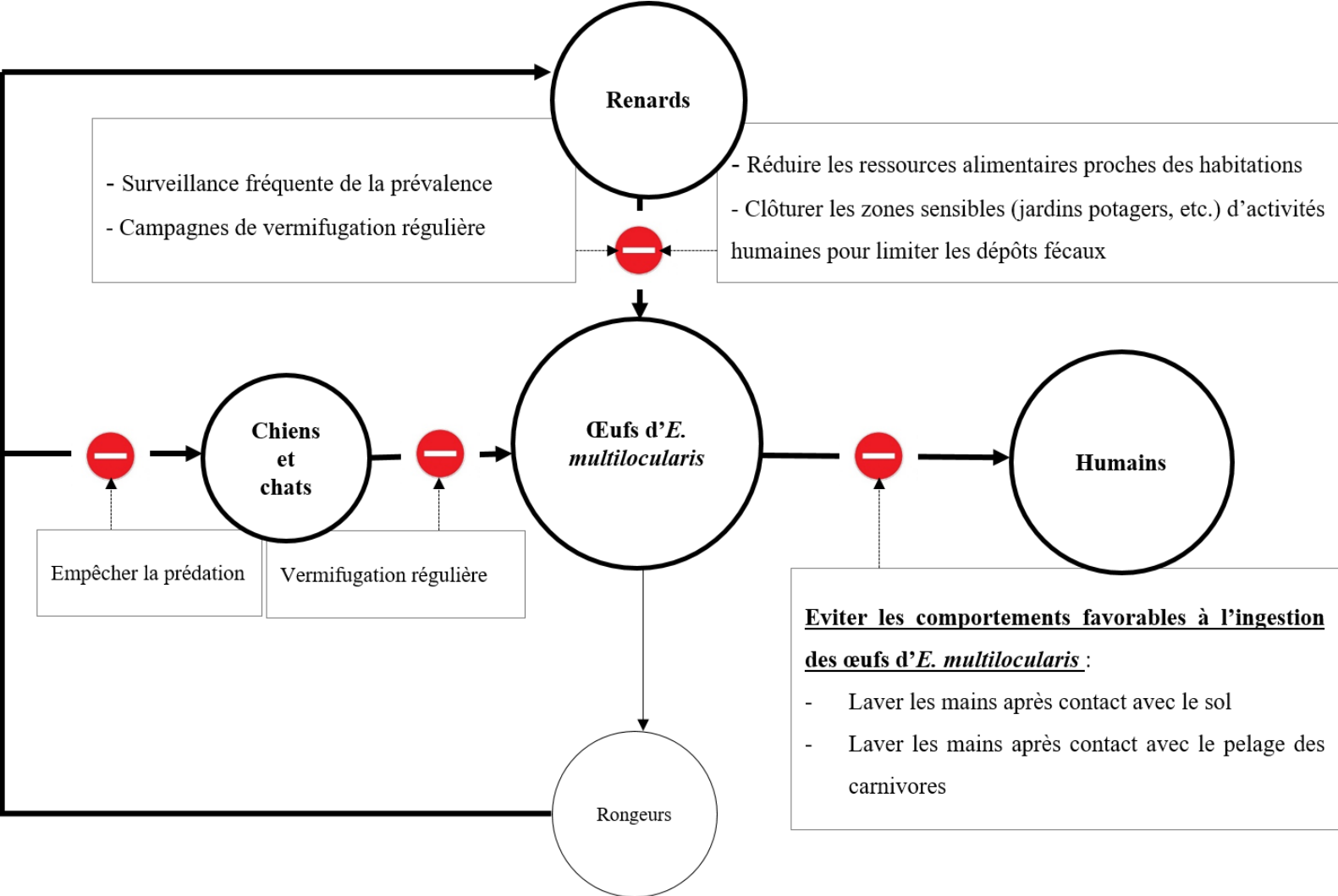


Figure 30 : Représentation schématique des différents moyens de prévention et de contrôle de l'EA (adaptée de Hegglin and Deplazes, 2013) en fonction des résultats obtenus de cette étude. Les cercles montrent les différents hôtes et l'environnement impliqués dans le cycle d'*Echinococcus multilocularis* ; les rectangles, les actions pour contrôler l'abondance du parasite parmi les hôtes et prévenir ainsi la contamination environnementale et l'infection humaine.

Tableau 13 : Exemple de quelques études de terrain sur le contrôle d'*Echinococcus multilocularis* par la distribution d'appâts contenant du praziquantel pour les renards.

Pays d'étude	Allemagne	France	Japon	Suisse	
Protocoles d'appâtage					
Superficie de la zone traitée (en km ²)	3000	213	33	90	3
Durée totale (en mois)	48	16	32	13	26
Fréquence de distribution des appâts (nombre/année)	2 – 9	12	5	12	4
Evolution des prévalences d'<i>E. multilocularis</i> chez les renards					
Prévalence initiale (%)	64	35	13,3	27	30
Prévalence après traitement (%)	15	1	2,2	6	18
Amplitude de diminution	4,3	35	6	4,5	1,7
Sources	(Romig <i>et al.</i> , 2007)	(König, 2008)	(Comte <i>et al.</i> , 2013)	(Tsukada <i>et al.</i> , 2002b)	(Hegglin and Deplazes, 2008)

Conclusion & Perspectives

Les différents travaux entrepris dans le cadre de cette thèse se sont focalisés, à une échelle locale, sur la contamination environnementale par *Echinococcus multilocularis* par l'étude entièrement noninvasive de la distribution concomitante des fèces des trois espèces de carnivores qui sont les hôtes définitifs principaux du parasite en Europe. L'intérêt majeur du copro-échantillonnage réside dans la possibilité d'effectuer des études à très large échelle. Par exemple, pour l'ensemble des trois sites inclus dans le projet MONIZOO, plus de 4000 fèces de carnivores ont été collectées permettant ainsi d'obtenir des résultats robustes sur le rôle des HD dans la dissémination d'*E. multilocularis* dans l'environnement.

Les données collectées dans cette étude indiquent une circulation élevée du parasite parmi la population locale de renards sur le site d'étude puisqu'une forte prévalence estimée à environ 58% a été mise en évidence. Ce résultat est similaire à ceux rapportés sur le même site d'étude ou proche par d'autres travaux ayant utilisé la méthode de référence d'identification du parasite chez les renards après autopsie (Raoul *et al.*, 2001; Combes *et al.*, 2012). Dès lors, ces hôtes sauvages apparaissent comme les acteurs principaux de la contamination de l'environnement par les œufs d'*E. multilocularis* et pour la réalisation du cycle local du parasite.

En effet, les œufs d'*E. multilocularis* ont été détectés plus significativement dans les fèces de renards collectées sur le lieu de l'étude, ce qui confirme le rôle prépondérant des populations vulpines dans la contamination environnementale par le parasite (Hegglin and Deplazes, 2013; Knapp *et al.*, 2018). Plus important encore, nos résultats ont démontré une surdispersion spatiale locale du risque d'exposition aux œufs d'*E. multilocularis* via les fèces de renards, également soulignée dans d'autres études antérieures (par exemple, Giraudoux *et al.*, 2002; Robardet *et al.*, 2011; Knapp *et al.*, 2018). Cette distribution agrégative d'*E. multilocularis* dans l'environnement représente un paramètre clé dans la transmission locale du parasite et un facteur de risque zoonotique majeur (Hansen *et al.*, 2004). Il semble que le marquage fécal ou encore la distribution hétérogène des micromammifères sensibles au parasite soient susceptibles d'être les causes de cette distribution hétérogène des fèces de renards porteuses d'*E. multilocularis*. En raison de la sensibilité des œufs dépendante des conditions climatiques et du taux de renouvellement important des populations de renards pouvant entraîner un changement fréquent des domaines vitaux, la surdispersion des fèces porteuses des œufs d'*E. multilocularis* pourrait varier spatialement et/ou en fonction des saisons. L'étude approfondie des variations spatiales et saisonnières des prévalences parasitaires fécales prévue dans le cadre du projet MONIZOO permettra de caractériser plus finement l'évolution spatio-temporelle du risque d'exposition pour les hôtes intermédiaires et aberrants comme l'homme.

Dans le cadre d'une évaluation de la rémanence d'*E. multilocularis* dans l'environnement, nos résultats ont suggéré que les œufs du parasite étaient susceptibles de persister pendant au moins une année dans le sol de jardins potagers ruraux en zone d'endémie où les fèces de carnivores porteuses du parasite étaient sur-dispersées. Il est alors probable que la distribution groupée des œufs maintienne localement un niveau de pression d'exposition à long terme sur les rongeurs sensibles. Par ailleurs, la survie accrue des œufs dans l'environnement pourrait induire un risque zoonotique persistant et difficile à contrôler. Cependant, de nombreux paramètres du risque infectieux associé à la contamination de l'environnement par *E. multilocularis* restent à élucider. Il importe d'identifier les zones avec les fortes charges d'œufs infectieux d'*E. multilocularis* afin de déterminer les sources probables de contamination humaine. Pour ce faire, les méthodes d'identification du parasite utilisées dans cette étude nécessitent d'être complétées par d'autres techniques permettant une évaluation de la viabilité et/ou de l'infectiosité des œufs d'*E. multilocularis*. Actuellement, seules les expériences *in vivo* avec un modèle murin sont utilisées pour évaluer l'infectiosité des œufs d'*E. multilocularis* (Kapel *et al.*, 2006; Federer *et al.*, 2015). D'autres approches noninvasives plus pratiques et moins lourdes comme la coloration à l'éosine testée sur des œufs d'*E. granulosus* (Moazeni and Rakhshandehroo, 2012) ou encore la détection d'ARNm par RT-qPCR développée pour les oocystes de protozoaires (Travaillé *et al.*, 2016) pourraient être adaptées pour l'étude de la viabilité/infectiosité des œufs d'*E. multilocularis*. Ainsi, la présence des œufs infectieux d'*E. multilocularis* dans d'autres matrices comme les végétaux frais destinés à être consommés crus et l'eau de consommation pourrait être évaluée et mise en relation avec la distribution groupée des œufs via les fèces dans le but d'explorer une plus large contamination environnementale en zone d'endémie.

La distribution fortement hétérogène d'*E. multilocularis* parmi les renards apparaît comme une cause probable directe de cette distribution groupée des œufs du parasite dans l'environnement. Plus globalement, une variabilité importante dans la part des fèces positives pour le parasite déposées dans l'environnement par les individus était attendue en raison de l'agrégation du parasite au sein des hôtes (Eckert *et al.*, 2001c; Vaniscotte, 2009; Vaniscotte *et al.*, 2011; Liccioli *et al.*, 2015b). Mais aucune étude n'avait apporté de preuves directes sur la contribution individuelle des renards dans la contamination de l'environnement par *E. multilocularis*. L'identification individuelle des fèces de renards par génotypage à l'aide de marqueurs microsatellites nous a permis de réaliser un suivi longitudinal des individus sur les trois années successives de l'étude. Nos résultats ont montré que 35% des individus infectés avaient déposé

la majorité des fèces testées positives pour l'ADN d'*E. multilocularis*, soit 60%. De plus, il semble que le pourcentage des individus excréant de fortes charges d'œufs d'*E. multilocularis* avec leurs fèces soit encore plus faible. Dès lors, il apparaît que la transmission d'*E. multilocularis* repose sur ces quelques super-propagateurs du parasite dans l'environnement. Nous avons abordé brièvement l'utilisation de l'espace entre les renards par l'évaluation de leurs domaines vitaux minimums avec le tracé de polygones convexes englobant les fèces des mêmes individus. Le chevauchement des domaines vitaux minimums n'a pu être exploré que pour un très faible nombre d'individus infectés par le parasite à cause du nombre restreint de copro-échantillons identifiés avec succès. Il semble toutefois que le centre du site d'étude soit inclus dans le territoire de la plupart des individus ayant été en contact avec *E. multilocularis* (**Partie 1.6**). Nous avons alors déduit que la distribution régulière d'appâts contenant des vermifuges dans la partie centrale du site pouvait être une stratégie efficace pour augmenter les chances d'absorption des vermifuges par les renards et diminuer ainsi la pression d'infection. Ceci prouve l'intérêt majeur de ce type d'analyse dans les tentatives de contrôle de l'abondance du parasite sur le terrain. L'une des perspectives de ce travail de thèse constitue ainsi une étude plus large du rôle individuel des renards dans la contamination de l'environnement par *E. multilocularis* sur les trois sites du projet MONIZOO grâce à la méthode de génotypage mise au point ici. Par ailleurs, un suivi à plus long terme des dépôts fécaux des individus pourrait permettre d'évaluer l'envergure de la dispersion d'*E. multilocularis* et donc les modes de propagation spatio-temporelle du parasite par les hôtes sauvages. L'étude de l'expansion du parasite devrait impliquer nécessairement l'exploration de sa diversité génétique parmi les hôtes.

La comparaison des profils génétiques d'*E. multilocularis* parmi les hôtes laisse penser à une transmission du parasite à partir des renards, alors considérés comme un réservoir local du parasite, vers les carnivores domestiques. En effet, les renards hébergent une population plus diversifiée d'*E. multilocularis* dont des variants se retrouvent chez les chiens et chats ainsi que dans des lésions de patients opérés, résidant dans la zone d'étude. Ces données témoignent du rôle majeur du cycle sylvatique dans le maintien du cycle synanthropique du parasite. Mais ici encore, des pans entiers de l'interconnexion entre les cycles sauvage, domestique du parasite et le risque zoonotique doivent être éclaircis : i) quels profils du parasite hébergés par les renards se retrouvent majoritairement chez les carnivores domestiques ? ii) existe-t-il localement une diversité de populations du parasite chez les hôtes intermédiaires ? iii) dans quelle mesure les

souches parasitaires isolées des lésions humaines sont-elles liées aux souches hébergées par les renards ou par les chiens et chats ?

Enfin, le but ultime du contrôle d'*E. multilocularis* consiste à réduire sensiblement ou à éliminer complètement la pression d'infection sur les populations humaines (Ito *et al.*, 2003). Cet objectif passe d'une part, par la prévention de l'ingestion accidentelle des œufs du parasite en observant les mesures d'hygiène de base et d'autre part, par la mise en œuvre de moyens de suppression du cycle de vie du parasite. Au vu de nos résultats, il semble que les moyens de prévention de l'EA doivent se concentrer sur le contrôle d'*E. multilocularis* parmi la population locale de renards. Plus particulièrement, il semble que la distribution d'appâts contenant des vermifuges doive nécessairement couvrir le territoire des renards super-propagateurs d'*E. multilocularis* pour espérer interrompre le cycle local du parasite.

Références bibliographiques

- ADAMS, J. R., C. LUCASH, L. SCHUTTE, and L. P. WAITS. 2007. Locating hybrid individuals in the red wolf (*Canis rufus*) experimental population area using a spatially targeted sampling strategy and faecal DNA genotyping. *Molecular Ecology*. 16: 1823–1834.
- ALAIN, B., P. GILLES, and D. YANNICK. 2006. Factors Driving Small Rodents Assemblages from Field Boundaries in Agricultural Landscapes of Western France. *Landscape Ecology*. 21: 449–461.
- AL-SABI', M. N. S., C. M. O. KAPEL, P. DEPLAZES, and A. MATHIS. 2007. Comparative copro-diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected foxes. *Parasitology Research*. 101: 731–736.
- ALTIZER, S., A. DOBSON, P. HOSSEINI, P. HUDSON, M. PASCUAL, and P. ROHANI. 2006. Seasonality and the dynamics of infectious diseases. *Ecology Letters*. 9: 467–484.
- ALTIZER, S., C. L. NUNN, P. H. THRALL, J. L. GITTLEMAN, J. ANTONOVICS, A. A. CUNNINGHAM, A. P. DOBSON, V. EZENWA, K. E. JONES, A. B. PEDERSEN, M. POSS, and J. R. C. PULLIAM. 2003. Social Organization and Parasite Risk in Mammals: Integrating Theory and Empirical Studies. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 34: 517–547.
- ALUM, A., J. R. RUBINO, and M. K. IJAZ. 2010. The global war against intestinal parasites—should we use a holistic approach? *International Journal of Infectious Diseases*. 14: e732–e738.
- ALVAREZ ROJAS, C. A., A. MATHIS, and P. DEPLAZES. 2018. Assessing the Contamination of Food and the Environment With *Taenia* and *Echinococcus* Eggs and Their Zoonotic Transmission. *Current Clinical Microbiology Reports*. 5: 154–163.
- AMAIKE, Y., T. MURAKAMI, and R. MASUDA. 2018. Low genetic diversity in an isolated red fox (*Vulpes vulpes*) population on Mt. Hakodate, Japan, revealed by microsatellite analyses of fecal samples. *Mammal Study*. 43: 141–152.
- AMOAH, I. D., G. SINGH, T. A. STENSTRÖM, and P. REDDY. 2017. Detection and quantification of soil-transmitted helminths in environmental samples: A review of current state-of-the-art and future perspectives. *Acta Tropica*. 169: 187–201.
- ANDERSON, R. M., and R. M. MAY. 1992. *Infectious Diseases of Humans: Dynamics and Control*. Oxford University Press, New York, 772 p.
- ANTOLOVÁ, D., K. REITEROVÁ, M. MITERPÁKOVÁ, M. STANKO, and P. DUBINSKÝ. 2004. Circulation of *Toxocara* spp. in suburban and rural ecosystems in the Slovak Republic. *Veterinary Parasitology*. 126: 317–324.

- ANTOLOVÁ, D., K. REITEROVÁ, M. MITERPÁKOVÁ, A. DINKEL, and P. DUBINSKÝ. 2009. The first finding of *Echinococcus multilocularis* in dogs in Slovakia: an emerging risk for spreading of infection. *Zoonoses and Public Health*. 56: 53–58.
- BALARESQUE, P. 2007. Les microsatellites des génomes eucaryotes - De leur cycle de vie et de leur neutralité. *médecine/sciences*. 23: 729–734.
- BANKS, S. C., M. P. PIGGOTT, B. D. HANSEN, N. A. ROBINSON, and A. C. TAYLOR. 2002. Wombat coprogenetics: enumerating a common wombat population by microsatellite analysis of faecal DNA. *Australian Journal of Zoology*. 50: 193–204.
- BARAQUIN, A. 2019. Échinococcose alvéolaire: viabilité parasitaire et évaluation de nouveaux biomarqueurs pour le diagnostic et le suivi des patients. Université de Franche-Comté, 139. pp.
- BARJA, I. 2009. Decision making in plant selection during the faecal-marking behaviour of wild wolves. *Animal Behaviour*. 77: 489–493.
- BARJA, I., F. J. DE MIGUEL, and F. BÁRCENA. 2005. Faecal marking behaviour of Iberian wolf in different zones of their territory. *Folia Zoologica*. 54: 21–29.
- BARLAAM, A., T. T. TEMESGEN, K. R. TYSNES, L. RINALDI, N. FERRARI, A. R. SANNELLA, G. NORMANNO, S. M. CACCIÒ, L. J. ROBERTSON, and A. GIANGASPERO. 2021. Contamination of fresh produce sold on the Italian market with *Cyclospora cayetanensis* and *Echinococcus multilocularis*. *Food Microbiology*. 98: 103792.
- BART, J. M., J. KNAPP, B. GOTTSTEIN, F. EL-GARCH, P. GIRAUDOUX, M. L. GLOWATZKI, H. BERTHOUD, S. MAILLARD, and R. PIARROUX. 2006. EmsB, a tandem repeated multi-loci microsatellite, new tool to investigate the genetic diversity of *Echinococcus multilocularis*. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*. 6: 390–400.
- BASTIEN, M. 2017. Contamination des terrains potagers par *Echinococcus multilocularis*, *Toxoplasma gondii* et *Toxocara* spp., parasites responsables de zoonoses transmises par l'alimentation. Université de Reims Champagne-Ardennes, France, 208. pp.
- BASTIEN, M., A. VANISCOTTE, B. COMBES, G. UMHANG, V. RATON, E. GERMAIN, I. VILLENA, D. AUBERT, F. BOUE, and M.-L. POULLE. 2019. Identifying drivers of fox and cat faecal deposits in kitchen gardens in order to evaluate measures for reducing contamination of fresh fruit and vegetables. *Food and Waterborne Parasitology*. 14: e00034.
- BASTIEN, M., A. VANISCOTTE, B. COMBES, G. UMHANG, E. GERMAIN, V. GOULEY, A. PIERLET, T. QUINTAINE, M. A. FORIN-WIART, I. VILLENA, D. AUBERT, F. BOUE, and M.-L. POULLE. 2018. High density of fox and cat faeces in kitchen gardens and resulting rodent

- exposure to *Echinococcus multilocularis* and *Toxoplasma gondii*. *Folia Parasitologica*. 65.
- BEERLI, O., D. GUERRA, L. BALTRUNAITE, P. DEPLAZES, and D. HEGGLIN. 2017. *Microtus arvalis* and *Arvicola scherman*: Key Players in the *Echinococcus multilocularis* Life Cycle. *Frontiers in Veterinary Science*. 4.
- BENDALL, R. P., M. BARLOW, M. BETSON, J. R. STOTHARD, and P. NEJSUM. 2011. Zoonotic Ascariasis, United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases*. 17: 1964–1966.
- BENESH, D. P., G. PARKER, and J. C. CHUBB. 2021. Life-cycle complexity in helminths: What are the benefits? *Evolution*. 75: 1936–1952.
- BENGIS, R. G., R. A. KOCK, and J. FISCHER. 2002. Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*. 21: 53–65.
- BIVAND, R., C. RUNDEL, E. PEBESMA, R. STUETZ, K. O. HUFTHAMMER, P. GIRAUDOUX, M. DAVIS, and S. SANTILLI. 2020. Rgeos: Interface to Geometry Engine - Open Source ('GEOS').
- BLASZKOWSKA, J., P. KURNATOWSKI, and P. DAMIECKA. 2011. Contamination of the soil by eggs of geohelminths in rural areas of Lodz district (Poland). *Helminthologia*. 48: 67–76.
- BŁASZKOWSKA, J., K. GÓRALSKA, A. WÓJCIK, P. KURNATOWSKI, and K. SZWABE. 2015. Presence of *Toxocara* spp. eggs in children's recreation areas with varying degrees of access for animals. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 22: 23–27.
- BOJAR, H., and T. KŁAPEĆ. 2012. Contamination of soil with eggs of geohelminths in recreational areas in the Lublin region of Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 19: 267–270.
- BORREMANS, B., J. REIJNIERS, N. HENS, and H. LEIRS. 2017. The shape of the contact–density function matters when modelling parasite transmission in fluctuating populations. *Royal Society Open Science*. 4: 171308.
- BOUWKNEGT, M., B. DEVLEESSCHAUWER, H. GRAHAM, L. J. ROBERTSON, and J. W. VAN DER GIESSEN. 2018. Prioritisation of food-borne parasites in Europe, 2016. *Eurosurveillance*. 23.
- BRADLEY, C. A., and S. ALTIZER. 2006. Urbanization and the ecology of wildlife diseases. *Trends in Ecology & Evolution*. 22: 95–102.
- BRESSON-HADNI, S., F. GRENOUILLET, A. CHAUCHET, C. RICHOU, J. KNAPP, É. DELABROUSSE, S. ADRIAN-FÉLIX, O. BLAGOSKLONOV, D.-A. VUITTON, and L. MILLON. 2014.

- Diagnostic de l'échinococcose alvéolaire. Revue Francophone des Laboratoires. 2014: 77–87.
- BRETAGNE, S., J. P. GUILLOU, M. MORAND, and R. HOUIN. 1993. Detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in fox faeces using DNA amplification. *Parasitology*. 106: 193–199.
- BRUNETTI, E., P. KERN, D. A. VUITTON, and WRITING PANEL FOR THE WHO-IWGE. 2010. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Tropica*. 114: 1–16.
- BUDGEY, R., J. LEARMOUNT, and G. C. SMITH. 2017. Simulating control of a focal wildlife outbreak of *Echinococcus multilocularis*. *Veterinary Parasitology*. 237: 47–56.
- BUDKE, C. M., Q. JIAMIN, P. S. CRAIG, and P. R. TORGERSON. 2005a. Modeling the transmission of *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* in dogs for a high endemic region of the Tibetan plateau. *International Journal for Parasitology*. 35: 163–170.
- BUDKE, C. M., M. CAMPOS-PONCE, W. QIAN, and P. R. TORGERSON. 2005b. A canine purgation study and risk factor analysis for echinococcosis in a high endemic region of the Tibetan plateau. *Veterinary Parasitology*. 127: 43–49.
- BURLET, P., P. DEPLAZES, and D. HEGGLIN. 2011. Age, season and spatio-temporal factors affecting the prevalence of *Echinococcus multilocularis* and *Taenia taeniaeformis* in *Arvicola terrestris*. *Parasites & Vectors*. 4: 6.
- CAI, Y., Y. KANG, M. BANERJEE, and W. WANG. 2018. Complex Dynamics of a host–parasite model with both horizontal and vertical transmissions in a spatial heterogeneous environment. *Nonlinear Analysis: Real World Applications*. 40: 444–465.
- CAPEK, I. 2010. Définition Des Priorités Dans Le Domaine Des Zoonoses Non Alimentaires - 2008-2009. Institut de veille sanitaire, Saint-Maurice (Fra).
- CARLSGART, J., A. ROEPSTORFF, and P. NEJSUM. 2008. Multiplex PCR on single unembryonated *Ascaris* (roundworm) eggs. *Parasitology Research*. 104: 939.
- CHAUTAN, M., D. PONTIER, and M. ARTOIS. 2000. Role of rabies in recent demographic changes in Red Fox (*Vulpes vulpes*) populations in Europe. 64: 391–410.
- CHUBB, J. C., M. A. BALL, and G. A. PARKER. 2010. Living in intermediate hosts: evolutionary adaptations in larval helminths. *Trends in Parasitology*. 26: 93–102.
- CNR ECHINOCOCCOSES. 2021. Rapport Annuel d'activité. Besançon (France).
- COKER, R., J. RUSHTON, S. MOUNIER-JACK, E. KARIMURIBO, P. LUTUMBA, D. KAMBARAGE, D. U. PFEIFFER, K. STÄRK, and M. RWEYEMAMU. 2011. Towards a conceptual

- framework to support one-health research for policy on emerging zoonoses. *The Lancet Infectious Diseases*. 11: 326–331.
- COLLENDER, P. A., A. E. KIRBY, D. G. ADDISS, M. C. FREEMAN, and J. V. REMAIS. 2015. Methods for Quantification of Soil-Transmitted Helminths in Environmental Media: Current Techniques and Recent Advances. *Trends in Parasitology*. 31: 625–639.
- COLLINGE, S. K., and C. RAY, editors. 2006. *Disease Ecology: Community Structure and Pathogen Dynamics*. Oxford University Press, Oxford, 240 p.
- COMBES, B., S. COMTE, V. RATON, F. RAOUL, F. BOUÉ, G. UMHANG, S. FAVIER, C. DUNOYER, N. WORONOFF, and P. GIRAUDOUX. 2012. Westward spread of *Echinococcus multilocularis* in foxes, France, 2005–2010. *Emerging Infectious Diseases*. 18: 2059–2062.
- COMBES, C. 2001. *Les associations du vivant : l'art d'être parasite*. Flammarion. Paris, 348 p.
- COMTE, S., G. UMHANG, V. RATON, F. RAOUL, P. GIRAUDOUX, B. COMBES, and F. BOUE. 2017. *Echinococcus multilocularis* management by fox culling: An inappropriate paradigm. *Preventive Veterinary Medicine*. 147: 178–185.
- COMTE, S., V. RATON, F. RAOUL, D. HEGGLIN, P. GIRAUDOUX, P. DEPLAZES, S. FAVIER, D. GOTTSCHKE, G. UMHANG, F. BOUÉ, and B. COMBES. 2013. Fox baiting against *Echinococcus multilocularis*: Contrasted achievements among two medium size cities. *Preventive Veterinary Medicine*. 111: 147–155.
- CONRATHS, F. J., and P. DEPLAZES. 2015. *Echinococcus multilocularis*: Epidemiology, surveillance and state-of-the-art diagnostics from a veterinary public health perspective. *Veterinary Parasitology*. 213: 149–161.
- CONRATHS, F. J., C. PROBST, A. POSSENTI, B. BOUFANA, R. SAULLE, G. LA TORRE, L. BUSANI, and A. CASULLI. 2017. Potential risk factors associated with human alveolar echinococcosis: Systematic review and meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 11: e0005801.
- DANSON, F. M., A. J. GRAHAM, D. R. J. PLEYDELL, M. CAMPOS-PONCE, P. GIRAUDOUX, and P. S. CRAIG. 2003. Multi-scale spatial analysis of human alveolar echinococcosis risk in China. *Parasitology*. 127: S133–S141.
- DASZAK, P., A. A. CUNNINGHAM, and A. D. HYATT. 2001. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Tropica*. 78: 103–116.

- DAVIDSON, R. K., T. ROMIG, E. JENKINS, M. TRYLAND, and L. J. ROBERTSON. 2012. The impact of globalisation on the distribution of *Echinococcus multilocularis*. *Trends in Parasitology*. 28: 239–247.
- DENZIN, N., A. SCHLIEPHAKE, A. FRÖHLICH, M. ZILLER, and F. J. CONRATHS. 2014. On the move? *Echinococcus multilocularis* in red foxes of Saxony-Anhalt (Germany). *Transboundary and Emerging Diseases*. 61: 239–246.
- DEPLAZES, P., and J. ECKERT. 2001. Veterinary aspects of alveolar echinococcosis--a zoonosis of public health significance. *Veterinary Parasitology*. 98: 65–87.
- DEPLAZES, P., D. HEGGLIN, S. GLOOR, and T. ROMIG. 2004. Wilderness in the city: the urbanization of *Echinococcus multilocularis*. *Trends in Parasitology*. 20: 77–84.
- DEPLAZES, P., F. VAN KNAPEN, A. SCHWEIGER, and P. A. M. OVERGAAUW. 2011. Role of pet dogs and cats in the transmission of helminthic zoonoses in Europe, with a focus on echinococcosis and toxocarosis. *Veterinary Parasitology*. 182: 41–53.
- DEPLAZES, P., L. RINALDI, C. A. ALVAREZ ROJAS, P. R. TORGERSON, M. F. HARANDI, T. ROMIG, D. ANTOLOVA, J. M. SCHURER, S. LAHMAR, G. CRINGOLI, J. MAGAMBO, R. C. A. THOMPSON, and E. J. JENKINS. 2017. Global Distribution of Alveolar and Cystic Echinococcosis. *Advances in Parasitology*. 95: 315–493.
- DINKEL, A., S. KERN, A. BRINKER, R. OEHME, A. VANISCOTTE, P. GIRAUDOUX, U. MACKENSTEDT, and T. ROMIG. 2011. A real-time multiplex-nested PCR system for coprological diagnosis of *Echinococcus multilocularis* and host species. *Parasitology Research*. 109: 493–498.
- DUPUY, G., P. GIRAUDOUX, and P. DELATTRE. 2009. Numerical and dietary responses of a predator community in a temperate zone of Europe. *Ecography*. 32: 277–290.
- DYACHENKO, V., N. PANTCHEV, S. GAWLOWSKA, M. G. VRHOVEC, and C. BAUER. 2008. *Echinococcus multilocularis* infections in domestic dogs and cats from Germany and other European countries. *Veterinary Parasitology*. 157: 244–253.
- ECKERT, J. 2003. Predictive values and quality control of techniques for the diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in definitive hosts. *Acta Tropica*. 85: 157–163.
- ECKERT, J., and P. DEPLAZES. 2004. Biological, Epidemiological, and Clinical Aspects of Echinococcosis, a Zoonosis of Increasing Concern. *Clinical Microbiology Reviews*. 17: 107–135.
- ECKERT, J., F. J. CONRATHS, and K. TACKMANN. 2000. Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? *International Journal for Parasitology*. 30: 1283–1294.

- ECKERT, J., P. DEPLAZES, and P. KERN. 2011. Alveolar echinococcosis (*Echinococcus multilocularis*): and neotropical forms of echinococcosis (*Echinococcus vogeli* and *Echinococcus oligarthrus*). Pp. 669–699, in Oxford Textbook of zoonoses: biology, clinical practice, and public health Control. 2 ed. Oxford University Press, Oxford.
- ECKERT, J., M. A. GEMMELL, F.-X. MESLIN, and Z. S. PAWŁOWSKI, editors. 2001a. WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern. World Organisation for Animal Health, Paris, 265 p.
- ECKERT, J., B. GOTTSSTEIN, D. HEATH, and F.-J. LIU. 2001b. Prevention of echinococcosis in humans and safety precautions. Pp. 238–246, in WHO/OIE manual on Echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern (J. ECKERT, M. A. GEMMELL, F.-X. MESLIN, and Z. S. PAWŁOWSKI, eds.). World Organisation for Animal Health, Paris.
- ECKERT, J., R. L. RAUSCH, M. A. GEMMELL, P. GIRAUDOUX, M. KAMIYA, F.-J. LIU, P. M. SCHANTZ, and T. ROMIG. 2001c. Epidemiology of *Echinococcus multilocularis*, *Echinococcus vogeli* and *Echinococcus oligarthrus*. Pp. 164–194, in WHO/OIE manual on Echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern (J. ECKERT, M. A. GEMMELL, F.-X. MESLIN, and Z. S. PAWŁOWSKI, eds.). World Organisation for Animal Health, Paris.
- ECKERT, J., P. DEPLAZES, P. S. CRAIG, M. A. GEMMELL, B. GOTTSSTEIN, D. HEATH, D. J. JENKINS, M. KAMIYA, and M. LIGHTOWLERS. 2001d. Echinococcosis in animals: clinical aspects, diagnosis and treatment. Pp. 72–94, in WHO/OIE manual on Echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern (J. ECKERT, M. A. GEMMELL, F.-X. MESLIN, and Z. S. PAWŁOWSKI, eds.). World Organisation for Animal Health, Paris.
- EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS (BIOHAZ), K. KOUTSOUMANIS, A. ALLENDE, A. ALVAREZ-ORDÓÑEZ, D. BOLTON, S. BOVER-CID, M. CHEMALY, R. DAVIES, A. DE CESARE, L. HERMAN, F. HILBERT, R. LINDQVIST, M. NAUTA, L. PEIXE, G. RU, M. SIMMONS, P. SKANDAMIS, E. SUFFREDINI, S. CACCIÒ, R. CHALMERS, P. DEPLAZES, B. DEVLEESSCHAUWER, E. INNES, T. ROMIG, J. VAN DER GIESSEN, M. HEMPEN, Y. VAN DER STEDE, and L. ROBERTSON. 2018. Public health risks associated with food-borne parasites. EFSA Journal. 16.
- ENEMARK, H. L., M. N. AL-SABI, J. KNAPP, M. STAAHL, and M. CHRÍEL. 2013. Detection of a high-endemic focus of *Echinococcus multilocularis* in red foxes in southern Denmark, January 2013. Eurosurveillance. 18: 20420.

- ESCOTTE-BINET, S., A. M. DA SILVA, B. CANCES, D. AUBERT, J. DUBEY, S. LA CARBONA, I. VILLENA, and M.-L. POULLE. 2019. A rapid and sensitive method to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in soil samples. *Veterinary Parasitology*. 274: 108904.
- EUZET, L., and C. COMBES. 1980. Les Problèmes de l'espèce Chez Les Animaux Parasites, Mémoires de la Société Zoologique de France. 239–285 p.
- FAHRION, A. S., M. SCHNYDER, B. WICHERT, and P. DEPLAZES. 2011. *Toxocara* eggs shed by dogs and cats and their molecular and morphometric species-specific identification: is the finding of *T. cati* eggs shed by dogs of epidemiological relevance? *Veterinary Parasitology*. 177: 186–189.
- FEDERER, K., M. T. ARMUA-FERNANDEZ, S. HOBY, C. WENKER, and P. DEPLAZES. 2015. In vivo viability of *Echinococcus multilocularis* eggs in a rodent model after different thermo-treatments. *Experimental Parasitology*. 154: 14–19.
- FEDERER, K., M. T. ARMUA-FERNANDEZ, F. GORI, S. HOBY, C. WENKER, and P. DEPLAZES. 2016. Detection of taeniid (*Taenia* spp., *Echinococcus* spp.) eggs contaminating vegetables and fruits sold in European markets and the risk for metacestode infections in captive primates. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 5: 249–253.
- FERRERAS, P., A. TRAVAINI, S. C. ZAPATA, and M. DELIBES. 2011. Short-term responses of mammalian carnivores to a sudden collapse of rabbits in Mediterranean Spain. *Basic and Applied Ecology*. 12: 116–124.
- FESCE, E., C. ROMEO, E. CHINCHIO, and N. FERRARI. 2020. How to choose the best control strategy? Mathematical models as a tool for pre-intervention evaluation on a macroparasitic disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 14: e0008789.
- FICHET-CALVET, E., P. GIRAUDOUX, J.-P. QUÉRÉ, R. W. ASHFORD, and P. DELATTRE. 2003. Is the Prevalence of *Taenia taeniaeformis* in *Microtus arvalis* Dependent on Population Density? *The Journal of Parasitology*. 89: 1147–1152.
- FISCHER, C., L. A. REPERANT, J. M. WEBER, D. HEGGLIN, and P. DEPLAZES. 2005. *Echinococcus multilocularis* infections of rural, residential and urban foxes (*Vulpes vulpes*) in the canton of Geneva, Switzerland. *Parasite*. 12: 339–346.
- FISCHER, I., T. GRAETER, W. KRATZER, K. STARK, P. SCHLINGELOFF, and J. SCHMIDBERGER. 2020. Distribution of alveolar echinococcosis according to environmental and geographical factors in Germany, 1992-2018. *Acta Tropica*. 212: 105654.

- FORIN-WIART, M.-A. 2014. Identification des facteurs de variation de la prédation exercée par les chats domestiques (*Felis silvestris catus*) en milieu rural. Reims Champagne Ardenne University, France, 294 p., 294. pp.
- FORIN-WIART, M.-A., M.-L. POULLE, S. PIRY, J.-F. COSSON, C. LAROSE, and M. GALAN. 2018. Evaluating metabarcoding to analyse diet composition of species foraging in anthropogenic landscapes using Ion Torrent and Illumina sequencing. *Scientific Reports*. 8.
- FRANTZ, A. C., L. C. POPE, P. J. CARPENTER, T. J. ROPER, G. J. WILSON, R. J. DELAHAY, and T. BURKE. 2003. Reliable microsatellite genotyping of the Eurasian badger (*Meles meles*) using faecal DNA. *Molecular Ecology*. 12: 1649–1661.
- FRENKEL, J. K., and B. B. PARKER. 1996. An apparent role of dogs in the transmission of *Toxoplasma gondii*. The probable importance of xenosmophilia. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 791: 402–407.
- FROESCHKE, G., and S. MATTHEE. 2014. Landscape characteristics influence helminth infestations in a peri-domestic rodent - implications for possible zoonotic disease. *Parasites & Vectors*. 7: 393.
- GANDON, S., and Y. MICHALAKIS. 2002. Local adaptation, evolutionary potential and host–parasite coevolution: interactions between migration, mutation, population size and generation time. *Journal of Evolutionary Biology*. 15: 451–462.
- GECHELE, L. V., A. B. PEDERSEN, and M. BELL. 2020. Fine-scale variation within urban landscapes affects marking patterns and gastrointestinal parasite diversity in red foxes. *Ecology and Evolution*. 10: 13796–13809.
- GEMMELL, M. A., M. G. ROBERTS, T. C. BEARD, and J. R. LAWSON. 2001. Quantitative epidemiology and transmission dynamics with special reference to *Echinococcus granulosus*. Pp. 143–154, in WHO/OIE manual on Echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern (J. ECKERT, M. A. GEMMELL, F.-X. MESLIN, and Z. S. PAWŁOWSKI, eds.). World Organisation for Animal Health, Paris.
- VAN DER GIESSEN, J., G. DEKSNE, M. A. GÓMEZ-MORALES, K. TROELL, J. GOMES, S. SOTIRAKI, M. ROZYCKI, I. KUCSERA, O. DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, and L. J. ROBERTSON. 2021. Surveillance of foodborne parasitic diseases in Europe in a One Health approach. *Parasite Epidemiology and Control*. 13: e00205.
- GILOT-FROMONT, E., M. LÉLU, M.-L. DARDÉ, C. RICHOMME, D. AUBERT, E. AFONSO, A. MERCIER, C. GOTTELAND, and I. VILLENA. 2012. The Life Cycle of *Toxoplasma gondii*

- in the Natural Environment. P. Ch. 01, in *Toxoplasmosis - Recent Advances* (O. D. DJAKOVIĆ, ed.). IntechOpen, Rijeka.
- GIRAUDOUX, P., P. DELATTRE, K. TAKAHASHI, F. RAOUL, J. P. QUERE, P. CRAIG, and D. A. VUITTON. 2002. Transmission ecology of *Echinococcus multilocularis* in wildlife: what can be learned from comparative studies and multiscale approaches? Pp. 251–266, in *Cestode Zoonoses: Echinococcosis and Cysticercosis: an Emergent and Global Problem*. IOS Press. Craig P. and Pawlowski Z., Amsterdam.
- GIRAUDOUX, P., F. RAOUL, D. PLEYDELL, T. LI, X. HAN, J. QIU, Y. XIE, H. WANG, A. ITO, and P. S. CRAIG. 2013a. Drivers of *Echinococcus multilocularis* Transmission in China: Small Mammal Diversity, Landscape or Climate? *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 7: e2045.
- GIRAUDOUX, P., P. S. CRAIG, P. DELATTRE, G. BAO, B. BARTHOLOMOT, S. HARRAGA, J. P. QUÉRÉ, F. RAOUL, Y. WANG, D. SHI, and D. A. VUITTON. 2003. Interactions between landscape changes and host communities can regulate *Echinococcus multilocularis* transmission. *Parasitology*. 127 Suppl: S121-131.
- GIRAUDOUX, P., F. RAOUL, E. AFONSO, I. ZIADINOV, Y. YANG, L. LI, T. LI, J.-P. QUÉRÉ, X. FENG, Q. WANG, H. WEN, A. ITO, and P. S. CRAIG. 2013b. Transmission ecosystems of *Echinococcus multilocularis* in China and Central Asia. *Parasitology*. 140: 1655–1666.
- GOTTDENKER, N. L., D. G. STREICKER, C. L. FAUST, and C. R. CARROLL. 2014. Anthropogenic land use change and infectious diseases: a review of the evidence. *EcoHealth*. 11: 619–632.
- GOTTSTEIN, B., M. STOJKOVIC, D. A. VUITTON, L. MILLON, A. MARCINKUTE, and P. DEPLAZES. 2015a. Threat of alveolar echinococcosis to public health--a challenge for Europe. *Trends in Parasitology*. 31: 407–412.
- GOTTSTEIN, B., J. WANG, G. BOUBAKER, I. MARINOVA, M. SPILIOTIS, N. MÜLLER, and A. HEMPHILL. 2015b. Susceptibility versus resistance in alveolar echinococcosis (larval infection with *Echinococcus multilocularis*). *Veterinary Parasitology*. 213: 103–109.
- GOTTSTEIN, B., F. SAUCY, P. DEPLAZES, J. REICHEN, G. DEMIERRE, A. BUSATO, C. ZUERCHER, and P. PUGIN. 2001. Is high prevalence of *Echinococcus multilocularis* in wild and domestic animals associated with disease incidence in humans? *Emerging Infectious Diseases*. 7: 408–412.
- GRACE, D., F. MUTUA, P. OCHUNGO, R. KRUSKA, K. JONES, L. BRIERLEY, M. L. LAPAR, M. SAID, M. HERRERO, P. PHAM-DUC, T. NGUYEN T.B, I. AKUKU, and F. OGUTU. 2012. Mapping of poverty and likely zoonoses hotspots. *Zoonoses Project*. 4: 1–119.

- GRAS, P., S. KNUTH, K. BÖRNER, L. MARESCOT, S. BENHAIEM, A. AUE, U. WITTSTATT, B. KLEINSCHMIT, and S. KRAMER-SCHADT. 2018. Landscape Structures Affect Risk of Canine Distemper in Urban Wildlife. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 6.
- GUERRA, D., D. HEGGLIN, L. BACCIARINI, M. SCHNYDER, and P. DEPLAZES. 2014. Stability of the southern European border of *Echinococcus multilocularis* in the Alps: evidence that *Microtus arvalis* is a limiting factor. *Parasitology*. 141: 1593–1602.
- GUGGISBERG, A. R., C. A. ALVAREZ ROJAS, P. A. KRONENBERG, N. MIRANDA, and P. DEPLAZES. 2020. A Sensitive, One-Way Sequential Sieving Method to Isolate Helminths' Eggs and Protozoal Oocysts from Lettuce for Genetic Identification. *Pathogens*. 9: 624.
- GUICHOUX, E., L. LAGACHE, S. WAGNER, P. CHAUMEIL, P. LEGER, O. LEPAIS, C. LEPOITTEVIN, T. MALAUSA, E. REVARDEL, F. SALIN, and R. J. PETIT. 2011. Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*. 11: 591–611.
- GUISLAIN, M. H., F. RAOUL, M. L. POULLE, and P. GIRAUDOUX. 2007. Fox faeces and vole distribution on a local range: ecological data in a parasitological perspective for *Echinococcus multilocularis*. *Parasite*. 14: 299–308.
- GUISLAIN, M.-H. 2008. Étude à différentes fenêtres de perception, des facteurs impliqués dans la transmission d'*Echinococcus multilocularis*, parasite responsable d'une maladie émergente: l'échinococcose alvéolaire. Université de Franche-Comté, France, 164 p., 164. pp.
- GUISLAIN, M.-H., F. RAOUL, P. GIRAUDOUX, M.-E. TERRIER, G. FROMENT, H. FERTE, and M.-L. POULLE. 2008. Ecological and biological factors involved in the transmission of *Echinococcus multilocularis* in the French Ardennes. *Journal of Helminthology*. 82: 143–151.
- HAIDER, N., P. ROTHMAN-OSTROW, A. Y. OSMAN, L. B. ARRUDA, L. MACFARLANE-BERRY, L. ELTON, M. J. THOMASON, D. YEBOAH-MANU, R. ANSUMANA, N. KAPATA, L. MBOERA, J. RUSHTON, T. D. MCHUGH, D. L. HEYMANN, A. ZUMLA, and R. A. KOCK. 2020. COVID-19—Zoonosis or Emerging Infectious Disease? *Frontiers in Public Health*. 8.
- HANSEN, F., F. JELTSCH, K. TACKMANN, C. STAUBACH, and H.-H. THULKE. 2004. Processes leading to a spatial aggregation of *Echinococcus multilocularis* in its natural intermediate host *Microtus arvalis*. *International Journal for Parasitology*. 34: 37–44.
- HEGGLIN, D., and P. DEPLAZES. 2008. Control Strategy for *Echinococcus multilocularis*. *Emerging Infectious Diseases*. 14: 1626–1628.

- HEGGLIN, D., and P. DEPLAZES. 2013. Control of *Echinococcus multilocularis*: Strategies, feasibility and cost–benefit analyses. *International Journal for Parasitology*. 43: 327–337.
- HEGGLIN, D., P. I. WARD, and P. DEPLAZES. 2003. Anthelmintic Baiting of Foxes against Urban Contamination with *Echinococcus multilocularis*. *Emerging Infectious Diseases*. 9: 1266–1272.
- HEGGLIN, D., F. BONTADINA, and P. DEPLAZES. 2015. Human–wildlife interactions and zoonotic transmission of *Echinococcus multilocularis*. *Trends in Parasitology*. 31: 167–173.
- HEGGLIN, D., F. BONTADINA, P. CONTESSA, S. GLOOR, and P. DEPLAZES. 2007. Plasticity of predation behaviour as a putative driving force for parasite life-cycle dynamics: The case of urban foxes and *Echinococcus multilocularis* tapeworm. *Functional Ecology*. 21: 552–560.
- HOFER, S., S. GLOOR, U. MÜLLER, A. MATHIS, D. HEGGLIN, and P. DEPLAZES. 2000. High prevalence of *Echinococcus multilocularis* in urban red foxes (*Vulpes vulpes*) and voles (*Arvicola terrestris*) in the city of Zürich, Switzerland. *Parasitology*. 120 (Pt 2): 135–142.
- HOLMES, J. C. 1987. The structure of helminth communities. *International Journal for Parasitology*. 17: 203–208.
- HUDSON, P. J. 2002. *The Ecology of Wildlife Diseases*. Oxford University Press, Oxford, New York, 218 p.
- ISAKSSON, M., Å. HAGSTRÖM, M. T. ARMUA-FERNANDEZ, H. WAHLSTRÖM, E. O. ÅGREN, A. MILLER, A. HOLMBERG, M. LUKACS, A. CASULLI, P. DEPLAZES, and M. JUREMALM. 2014. A semi-automated magnetic capture probe based DNA extraction and real-time PCR method applied in the Swedish surveillance of *Echinococcus multilocularis* in red fox (*Vulpes vulpes*) faecal samples. *Parasites & Vectors*. 7: 583.
- ITO, A., T. ROMIG, and K. TAKAHASHI. 2003. Perspective on control options for *Echinococcus multilocularis* with particular reference to Japan. *Parasitology*. 127: S159–S172.
- JANKO, C., S. LINKE, T. ROMIG, D. THOMA, W. SCHRÖDER, and A. KÖNIG. 2011. Infection pressure of human alveolar echinococcosis due to village and small town foxes (*Vulpes vulpes*) living in close proximity to residents. *European Journal of Wildlife Research*. 57: 1033–1042.
- JONG, M. C. M. de, A. BOUMA, O. DIEKMANN, and J. a. P. HEESTERBEEK. 2002. Modelling transmission: mass action and beyond. *Trends in Ecology and Evolution*. 17: 64–64.

- KACHANI, M., and D. HEATH. 2014. Dog population management for the control of human echinococcosis. *Acta Tropica*. 139: 99–108.
- KAPEL, C. M. O., P. R. TORGERSON, R. C. A. THOMPSON, and P. DEPLAZES. 2006. Reproductive potential of *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected foxes, dogs, raccoon dogs and cats. *International Journal for Parasitology*. 36: 79–86.
- KARESH, W. B., A. DOBSON, J. O. LLOYD-SMITH, J. LUBROTH, M. A. DIXON, M. BENNETT, S. ALDRICH, T. HARRINGTON, P. FORMENTY, E. H. LOH, C. C. MACHALABA, M. J. THOMAS, and D. L. HEYMANN. 2012. Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. *Lancet (London, England)*. 380: 1936–1945.
- KESING, F., and R. S. OSTFELD. 2021. Impacts of biodiversity and biodiversity loss on zoonotic diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 118: e2023540118.
- KELKAR, Y. D., N. STRUBCZEWSKI, S. E. HILE, F. CHIAROMONTE, K. A. ECKERT, and K. D. MAKOVA. 2010. What is a microsatellite: a computational and experimental definition based upon repeat mutational behavior at A/T and GT/AC repeats. *Genome Biology and Evolution*. 2: 620–635.
- KELLNER, K. F., L. K. PAGE, M. DOWNEY, and S. E. MCCORD. 2012. Effects of Urbanization on Prevalence of *Baylisascaris procyonis* in Intermediate Host Populations. *Journal of Wildlife Diseases*. 48: 1083–1087.
- KERN, P., A. AMMON, M. KRON, G. SINN, S. SANDER, L. R. PETERSEN, W. GAUS, and P. KERN. 2004. Risk factors for alveolar echinococcosis in humans. *Emerging Infectious Diseases*. 10: 2088.
- KERR, K. 2004. Zoonoses: infectious diseases transmissible from animals to humans. *Journal of Clinical Pathology*. 57: 1120–1120.
- KNAPP, J. 2008. Caractérisation et validation du marqueur microsatellite multilocus répété en tandem EmsB pour la recherche de polymorphisme génétique chez *Echinococcus multilocularis*: application à l'étude de la transmission du parasite en Europe. Université de Franche-Comté, France, 211 p., 211. pp.
- KNAPP, J., G. UMHANG, M.-L. POULLE, and L. MILLON. 2016a. Development of a Real-Time PCR for a Sensitive One-Step Coprodiagnosis Allowing both the Identification of Carnivore Feces and the Detection of *Toxocara* spp. and *Echinococcus multilocularis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 82: 2950–2958.
- KNAPP, J., B. COMBES, G. UMHANG, S. AKNOUCHE, and L. MILLON. 2016b. Could the domestic cat play a significant role in the transmission of *Echinococcus multilocularis*? A study based on qPCR analysis of cat feces in a rural area in France. *Parasite*. 23.

- KNAPP, J., G. UMHANG, H. WAHLSTRÖM, M. N. S. AL-SABI, E. O. ÅGREN, and H. L. ENEMARK. 2019. Genetic diversity of *Echinococcus multilocularis* in red foxes from two Scandinavian countries: Denmark and Sweden. *Food and Waterborne Parasitology*. 14: e00045.
- KNAPP, J., M.-H. GUISLAIN, J. M. BART, F. RAOUL, B. GOTTSTEIN, P. GIRAUDOUX, and R. PIARROUX. 2008. Genetic diversity of *Echinococcus multilocularis* on a local scale. *Infection, Genetics and Evolution*. 8: 367–373.
- KNAPP, J., M. NAKAO, T. YANAGIDA, M. OKAMOTO, U. SAARMA, A. LAVIKAINEN, and A. ITO. 2011. Phylogenetic relationships within *Echinococcus* and *Taenia* tapeworms (Cestoda: *Taeniidae*): An inference from nuclear protein-coding genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 61: 628–638.
- KNAPP, J., A. MEYER, S. COURQUET, L. MILLON, F. RAOUL, B. GOTTSTEIN, and C. F. FREY. 2021. *Echinococcus multilocularis* genetic diversity in Swiss domestic pigs assessed by EmsB microsatellite analyzes. *Veterinary Parasitology*. 293: 109429.
- KNAPP, J., J. M. BART, M. L. GLOWATZKI, A. ITO, S. GERARD, S. MAILLARD, R. PIARROUX, and B. GOTTSTEIN. 2007. Assessment of Use of Microsatellite Polymorphism Analysis for Improving Spatial Distribution Tracking of *Echinococcus multilocularis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 45: 2943–2950.
- KNAPP, J., S. STAEBLER, J. M. BART, A. STIEN, N. G. YOCCOZ, C. DRÖGEMÜLLER, B. GOTTSTEIN, and P. DEPLAZES. 2012. *Echinococcus multilocularis* in Svalbard, Norway: Microsatellite genotyping to investigate the origin of a highly focal contamination. *Infection, Genetics and Evolution*. 12: 1270–1274.
- KNAPP, J., B. GOTTSTEIN, S. BRETAGNE, J.-M. BART, G. UMHANG, C. RICHOU, S. BRESSON-HADNI, and L. MILLON. 2020. Genotyping *Echinococcus multilocularis* in Human Alveolar Echinococcosis Patients: An EmsB Microsatellite Analysis. *Pathogens*. 9.
- KNAPP, J., L. MILLON, L. MOUZON, G. UMHANG, F. RAOUL, Z. S. ALI, B. COMBES, S. COMTE, H. GBAGUIDI-HAORE, F. GRENOUILLET, and P. GIRAUDOUX. 2014. Real time PCR to detect the environmental faecal contamination by *Echinococcus multilocularis* from red fox stools. *Veterinary Parasitology*. 201: 40–47.
- KNAPP, J., S. DAMY, J. BRILLAUD, J.-D. TISSOT, J. NAVION, R. MÉLIOR, E. AFONSO, V. HORMAZ, B. GOTTSTEIN, G. UMHANG, A. CASULLI, F. DADEAU, L. MILLON, and F. RAOUL. 2017. EWET: Data collection and interface for the genetic analysis of *Echinococcus multilocularis* based on EmsB microsatellite. *PLOS ONE*. 12: e0183849.

- KNAPP, J., J.-M. BART, P. GIRAUDOUX, M.-L. GLOWATZKI, I. BREYER, F. RAOUL, P. DEPLAZES, G. DUSCHER, K. MARTINEK, P. DUBINSKY, M.-H. GUISLAIN, F. CLIQUET, T. ROMIG, A. MALCZEWSKI, B. GOTTSTEIN, and R. PIARROUX. 2009. Genetic Diversity of the Cestode *Echinococcus multilocularis* in Red Foxes at a Continental Scale in Europe. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 3.
- KNAPP, J., P. GIRAUDOUX, B. COMBES, G. UMHANG, F. BOUÉ, Z. SAID-ALI, S. AKNOUCHE, C. GARCIA, M. VACHEYROU, A. LABOISSIÈRE, V. RATON, S. COMTE, S. FAVIER, J.-M. DEMERSON, C. CAILLOT, L. MILLON, and F. RAOUL. 2018. Rural and urban distribution of wild and domestic carnivore stools in the context of *Echinococcus multilocularis* environmental exposure. *International Journal for Parasitology*. 48: 937–946.
- KOHN, M. H., E. C. YORK, D. A. KAMRADT, G. HAUGHT, R. M. SAUVAJOT, and R. K. WAYNE. 1999. Estimating population size by genotyping faeces. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 266: 657–663.
- KÖNIG, A. 2008. Fears, attitudes and opinions of suburban residents with regards to their urban foxes. *European Journal of Wildlife Research*. 54: 101–109.
- KÖNIG, A., T. ROMIG, and E. HOLZHOFER. 2019. Effective long-term control of *Echinococcus multilocularis* in a mixed rural-urban area in southern Germany. *PLOS ONE*. 14: e0214993.
- KULLDORFF, M., and N. NAGARWALLA. 1995. Spatial disease clusters: detection and inference. *Statistics in Medicine*. 14: 799–810.
- LASS, A., B. SZOSTAKOWSKA, P. MYJAK, and K. KORZENIEWSKI. 2015. The first detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in environmental fruit, vegetable, and mushroom samples using nested PCR. *Parasitology Research*. 114: 4023–4029.
- LASS, A., B. SZOSTAKOWSKA, P. MYJAK, and K. KORZENIEWSKI. 2017. Detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in fruit, vegetable, and mushroom samples collected in the non-endemic territory of the Pomerania province and comparison of the results with data from rural areas of the neighbouring highly endemic Warmia-Masuria province, Poland. *Acta Parasitologica*. 62: 459–465.
- LEVECKE, B., R. M. ANDERSON, D. BERKVEN, J. CHARLIER, B. DEVLEESSCHAUWER, N. SPEYBROECK, J. VERCRUYSSSE, and S. VAN AELST. 2015. Chapter Five - Mathematical Inference on Helminth Egg Counts in Stool and Its Applications in Mass Drug Administration Programmes to Control Soil-Transmitted Helminthiasis in Public Health. Pp. 193–247, in *Advances in Parasitology* (R. M. ANDERSON and M. G.

- BASÁÑEZ, eds.). . Mathematical Models for Neglected Tropical Diseases: Essential Tools for Control and Elimination, Part A. vol. 87. Academic Press.
- LICCIOLI, S. 2015. The transmission ecology of *Echinococcus multilocularis* in a North American urban landscape.
- LICCIOLI, S., S. J. KUTZ, K. E. RUCKSTUHL, and A. MASSOLO. 2014. Spatial heterogeneity and temporal variations in *Echinococcus multilocularis* infections in wild hosts in a North American urban setting. *International Journal for Parasitology*. 44: 457–465.
- LICCIOLI, S., P. GIRAUDOUX, P. DEPLAZES, and A. MASSOLO. 2015a. Wilderness in the ‘city’ revisited: different urbes shape transmission of *Echinococcus multilocularis* by altering predator and prey communities. *Trends in Parasitology*. 31: 297–305.
- LICCIOLI, S., S. ROGERS, C. GRECO, S. J. KUTZ, F. CHAN, K. E. RUCKSTUHL, and A. MASSOLO. 2015b. Assessing individual patterns of *Echinococcus multilocularis* infection in urban coyotes: non-invasive genetic sampling as an epidemiological tool. *Journal of Applied Ecology*. 52: 434–442.
- LIND, E. O., M. JUREMALM, D. CHRISTENSSON, S. WIDGREN, G. HALLGREN, E. O. ÅGREN, H. UHLHORN, A. LINDBERG, M. CEDERSMYG, and H. WAHLSTRÖM. 2011. First detection of *Echinococcus multilocularis* in Sweden, February to March 2011. *Eurosurveillance*. 16: 19836.
- LLOYD-SMITH, J. O., D. GEORGE, K. M. PEPIN, V. E. PITZER, J. R. C. PULLIAM, A. P. DOBSON, P. J. HUDSON, and B. T. GRENFELL. 2009. Epidemic dynamics at the human-animal interface. *Science (New York, N.Y.)*. 326: 1362–1367.
- MACKENSTEDT, U., D. JENKINS, and T. ROMIG. 2015. The role of wildlife in the transmission of parasitic zoonoses in peri-urban and urban areas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 4: 71–79.
- MACPHERSON, C. N. L. 2005. Human behaviour and the epidemiology of parasitic zoonoses. *International Journal for Parasitology*. 35: 1319–1331.
- MACPHERSON, C. N. L. 2013. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: A zoonosis of global importance. *International Journal for Parasitology*. 43: 999–1008.
- MANDARINO-PEREIRA, A., F. S. DE SOUZA, C. W. G. LOPES, and M. J. S. PEREIRA. 2010. Prevalence of parasites in soil and dog feces according to diagnostic tests. *Veterinary Parasitology*. 170: 176–181.
- MAS-COMA, S., M. A. VALERO, and M. D. BARGUES. 2008. Effects of climate change on animal and zoonotic helminthiases. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*. 27: 443–457.

- MATSUO, K., and H. KAMIYA. 2005. Modified sugar centrifugal flotation technique for recovering *Echinococcus multilocularis* eggs from soil. *The Journal of Parasitology*. 91: 208–209.
- MCCALLUM, H., N. BARLOW, and J. HONE. 2001. How should pathogen transmission be modelled? *Trends in Ecology & Evolution*. 16: 295–300.
- MCMANUS, D. P. 2013. Current status of the genetics and molecular taxonomy of *Echinococcus* species. *Parasitology*. 140: 1617–1623.
- MILLER, C. R., P. JOYCE, and L. P. WAITS. 2005. A new method for estimating the size of small populations from genetic mark-recapture data. *Molecular Ecology*. 14: 1991–2005.
- MITERPÁKOVÁ, M., P. DUBINSKÝ, K. REITEROVÁ, and M. STANKO. 2006a. Climate and environmental factors influencing *Echinococcus multilocularis* occurrence in the Slovak Republic. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM*. 13: 235–242.
- MITERPÁKOVÁ, M., P. DUBINSKÝ, K. REITEROVÁ, and M. STANKO. 2006b. Climate and environmental factors influencing *Echinococcus multilocularis* occurrence in the Slovak Republic. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM*. 13: 235–242.
- MOAZENI, M., and E. RAKHSHANDEHROO. 2012. In vitro viability test for the eggs of *Echinococcus granulosus*: a rapid method. *Parasitology Research*. 110: 925–930.
- MORÁN-LUIS, M., A. FAMELI, B. BLANCO-FONTO, A. FERNÁNDEZ-GIL, R. RODRÍGUEZ-MUÑOZ, M. QUEVEDO, P. MIROL, and M.-J. BAÑUELOS. 2014. Demographic Status and Genetic Tagging of Endangered Capercaillie in NW Spain. *PLoS ONE*. 9.
- MORGAN, E. R., D. AZAM, and K. PEGLER. 2013. Quantifying sources of environmental contamination with *Toxocara* spp. eggs. *Veterinary Parasitology*. 193: 390–397.
- MORGAN, E. R., E. J. MILNER-GULLAND, P. R. TORGERSON, and G. F. MEDLEY. 2004. Ruminating on complexity: macroparasites of wildlife and livestock. *Trends in Ecology & Evolution*. 19: 181–188.
- NAKAO, M., Y. SAKO, and A. ITO. 2003. Isolation of polymorphic microsatellite loci from the tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Infection, Genetics and Evolution*. 3: 159–163.
- NAKAO, M., A. LAVIKAINEN, T. YANAGIDA, and A. ITO. 2013. Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *International Journal for Parasitology*. 43: 1017–1029.
- NEUHAUSER, C. 2001. *Mathematical Challenges in Spatial Ecology*. 48: 11.

- NIJSSE, R., L. MUGHINI-GRAS, J. A. WAGENAAR, F. FRANSSSEN, and H. W. PLOEGER. 2015. Environmental contamination with *Toxocara* eggs: a quantitative approach to estimate the relative contributions of dogs, cats and foxes, and to assess the efficacy of advised interventions in dogs. *Parasites & Vectors*. 8: 397.
- NUNN, C. L., P. H. THRALL, F. H. LEENDERTZ, and C. BOESCH. 2011. The Spread of Fecally Transmitted Parasites in Socially-Structured Populations. *PLOS ONE*. 6: e21677.
- OH, K.-S., G.-T. KIM, K.-S. AHN, and S.-S. SHIN. 2016. Effects of Disinfectants on Larval Development of *Ascaris suum* Eggs. *The Korean Journal of Parasitology*. 54: 103–107.
- OKSANEN, A., M. SILES-LUCAS, J. KARAMON, A. POSSENTI, F. J. CONRATHS, T. ROMIG, P. WYSOCKI, A. MANNOCCI, D. MIPATRINI, G. LA TORRE, B. BOUFANA, and A. CASULLI. 2016. The geographical distribution and prevalence of *Echinococcus multilocularis* in animals in the European Union and adjacent countries: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors*. 9.
- OTERO, D., A. M. ALHO, R. NIJSSE, J. ROELFSEMA, P. OVERGAAUW, and L. MADEIRA DE CARVALHO. 2018. Environmental contamination with *Toxocara* spp. eggs in public parks and playground sandpits of Greater Lisbon, Portugal. *Journal of Infection and Public Health*. 11: 94–98.
- OTRANTO, D., C. CANTACESSI, F. DANTAS-TORRES, E. BRIANTI, M. PFEFFER, C. GENCHI, V. GUBERTI, G. CAPELLI, and P. DEPLAZES. 2015a. The role of wild canids and felids in spreading parasites to dogs and cats in Europe. Part II: Helminths and arthropods. *Veterinary Parasitology*. 213: 24–37.
- OTRANTO, D., C. CANTACESSI, M. PFEFFER, F. DANTAS-TORRES, E. BRIANTI, P. DEPLAZES, C. GENCHI, V. GUBERTI, and G. CAPELLI. 2015b. The role of wild canids and felids in spreading parasites to dogs and cats in Europe: Part I: Protozoa and tick-borne agents. *Veterinary Parasitology*. 213: 12–23.
- OVERGAAUW, P. A. M., and F. VAN KNAPEN. 2008. Toxocarosis, an important zoonosis. *European Journal of Companion Animal Practice*. 18: 259–266.
- OVERGAAUW, P. A. M., and F. VAN KNAPEN. 2013. Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. *Veterinary Parasitology*. 193: 398–403.
- PEBESMA, E., R. BIVAND, B. ROWLINGSON, V. GOMEZ-RUBIO, R. HIJMANS, M. SUMNER, D. MACQUEEN, J. LEMON, F. LINDGREN, J. O'BRIEN, and J. O'ROURKE. 2021. *Sp: Classes and Methods for Spatial Data*.

- PENNELL, M. W., C. R. STANSBURY, L. P. WAITS, and C. R. MILLER. 2013. Capwire: a R package for estimating population census size from non-invasive genetic sampling. *Molecular Ecology Resources*. 13: 154–157.
- PETAVY, A. F., F. TENORA, S. DEBLOCK, and V. SERGENT. 2000. *Echinococcus multilocularis* in domestic cats in France A potential risk factor for alveolar hydatid disease contamination in humans. *Veterinary Parasitology*. 6.
- PETERSON, A. T. 2006. Ecologic Niche Modeling and Spatial Patterns of Disease Transmission. *Emerging Infectious Diseases*. 12: 1822–1826.
- PETERSON, A. T., M. PAPEŞ, M. G. REYNOLDS, N. D. PERRY, B. HANSON, R. L. REGNERY, C. L. HUTSON, B. MUIZNIEK, I. K. DAMON, and D. S. CARROLL. 2006. Native-Range Ecology and Invasive Potential of *Cricetomys* in North America. *Journal of Mammalogy*. 87: 427–432.
- PIARROUX, M., R. PIARROUX, J. KNAPP, K. BARDONNET, J. DUMORTIER, J. WATELET, A. GERARD, J. BEYTOUT, A. ABERGEL, S. BRESSON-HADNI, and J. GAUDART. 2013. Populations at Risk for Alveolar Echinococcosis, France. *Emerging Infectious Diseases*. 19: 721–728.
- PLEYDELL, D. R. J., F. RAOUL, F. TOURNEUX, F. M. DANSON, A. J. GRAHAM, P. S. CRAIG, and P. GIRAUDOUX. 2004. Modelling the spatial distribution of *Echinococcus multilocularis* infection in foxes. *Acta Tropica*. 91: 253–265.
- POLLEY, L. 2005. Navigating parasite webs and parasite flow: emerging and re-emerging parasitic zoonoses of wildlife origin. *International Journal for Parasitology*. 35: 1279–1294.
- POULIN, R. 2013. Explaining variability in parasite aggregation levels among host samples. *Parasitology*. 140: 1–6.
- POULLE, M.-L., M. BASTIEN, Y. RICHARD, É. JOSSE-DUPUIS, D. AUBERT, I. VILLENA, and J. KNAPP. 2017. Detection of *Echinococcus multilocularis* and other foodborne parasites in fox, cat and dog faeces collected in kitchen gardens in a highly endemic area for alveolar echinococcosis. *Parasite*. 24: 29.
- PRUGH, L. R., C. E. RITLAND, S. M. ARTHUR, and C. J. KREBS. 2005. Monitoring coyote population dynamics by genotyping faeces. *Molecular Ecology*. 14: 1585–1596.
- PUECHMAILLE, S. J., and E. J. PETIT. 2007. Empirical evaluation of non-invasive capture–mark–recapture estimation of population size based on a single sampling session. *Journal of Applied Ecology*. 44: 843–852.

- PULLAN, R. L., J. L. SMITH, R. JASRASARIA, and S. J. BROOKER. 2014. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. *Parasites & Vectors*. 7: 37.
- QUINTAINE, T. 2010. Ecologie de la transmission d'*Echinococcus multilocularis*: Identification des milieux propices et modélisation de l'effet du comportement de l'hôte définitif, *Vulpes vulpes*. PhD Thesis, Université de Franche-Comté, France, 151. pp.
- RAOUL, F., D. HEGGLIN, and P. GIRAUDOUX. 2015. Trophic ecology, behaviour and host population dynamics in *Echinococcus multilocularis* transmission. *Veterinary Parasitology*. 213: 162–171.
- RAOUL, F., P. DEPLAZES, N. NONAKA, R. PIARROUX, D. A. VUITTON, and P. GIRAUDOUX. 2001. Assessment of the epidemiological status of *Echinococcus multilocularis* in foxes in France using ELISA coprotests on fox faeces collected in the field. *International Journal for Parasitology*. 31: 1579–1588.
- RAUSCH, R. L., F. H. FAY, and F. S. WILLIAMSON. 1990a. The ecology of *Echinococcus multilocularis* (Cestoda: *Taeniidae*) on St. Lawrence Island, Alaska. II. Helminth populations in the definitive host. *Annales De Parasitologie Humaine Et Comparee*. 65: 131–140.
- RAUSCH, R. L., J. F. WILSON, and P. M. SCHANTZ. 1990b. A programme to reduce the risk of infection by *Echinococcus multilocularis*: the use of praziquantel to control the cestode in a village in the hyperendemic region of Alaska. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 84: 239–250.
- REDDY, P. A., M. BHAVANISHANKAR, J. BHAGAVATULA, K. HARIKA, R. S. MAHLA, and S. SHIVAJI. 2012. Improved Methods of Carnivore Faecal Sample Preservation, DNA Extraction and Quantification for Accurate Genotyping of Wild Tigers. *PLOS ONE*. 7: e46732.
- REPERANT, L. A., G. CORNAGLIA, and A. D. M. E. OSTERHAUS. 2013. The importance of understanding the human-animal interface : from early hominins to global citizens. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 365: 49–81.
- REPERANT, L. A., D. HEGGLIN, C. FISCHER, L. KOHLER, J.-M. WEBER, and P. DEPLAZES. 2007. Influence of urbanization on the epidemiology of intestinal helminths of the red fox (*Vulpes vulpes*) in Geneva, Switzerland. *Parasitology Research*. 101: 605–611.
- RICKEN, F. J., J. NELL, B. GRÜNER, J. SCHMIDBERGER, T. KALTENBACH, W. KRATZER, A. HILLENBRAND, D. HENNE-BRUNS, P. DEPLAZES, P. MOLLER, P. KERN, and T. F. E. BARTH. 2017. Albendazole increases the inflammatory response and the amount of

- Em2-positive small particles of *Echinococcus multilocularis* (spems) in human hepatic alveolar echinococcosis lesions. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 11: e0005636.
- RISTIĆ, M., N. MILADINOVIĆ-TASIĆ, S. DIMITRIJEVIĆ, K. NENADOVIĆ, D. BOGUNOVIĆ, P. STEPANOVIĆ, and T. ILIĆ. 2020. Soil and sand contamination with canine intestinal parasite eggs as a risk factor for human health in public parks in Niš (Serbia). *Helminthologia*. 57: 109–119.
- ROBARDET, E., P. GIRAUDOUX, C. CAILLOT, D. AUGOT, F. BOUE, and J. BARRAT. 2011. Fox defecation behaviour in relation to spatial distribution of voles in an urbanised area: An increasing risk of transmission of *Echinococcus multilocularis*? *International Journal for Parasitology*. 41: 145–154.
- ROBARDET, E., P. GIRAUDOUX, C. CAILLOT, F. BOUE, F. CLIQUET, D. AUGOT, and J. BARRAT. 2008. Infection of foxes by *Echinococcus multilocularis* in urban and suburban areas of Nancy, France: influence of feeding habits and environment. *Parasite*. 15: 77–85.
- RODGERS, T. W., and J. E. JANEČKA. 2013. Applications and techniques for non-invasive faecal genetics research in felid conservation. *European Journal of Wildlife Research*. 59: 1–16.
- ROMIG, T. 2009. *Echinococcus multilocularis* in Europe - state of the art. *Veterinary Research Communications*. 33: 31–34.
- ROMIG, T., D. THOMA, and A.-K. WEIBLE. 2006. *Echinococcus multilocularis*--a zoonosis of anthropogenic environments? *Journal of Helminthology*. 80: 207–212.
- ROMIG, T., B. BILGER, A. DINKEL, M. MERLI, D. THOMA, R. WILL, U. MACKENSTEDT, and R. LUCIUS. 2007. Impact of praziquantel baiting on intestinal helminths of foxes in southwestern Germany. *Helminthologia*. 44: 137–144.
- ROMIG, T., P. DEPLAZES, D. JENKINS, P. GIRAUDOUX, A. MASSOLO, P. S. CRAIG, M. WASSERMANN, K. TAKAHASHI, and M. DE LA RUE. 2017. Ecology and Life Cycle Patterns of *Echinococcus* Species. Pp. 213–314, in *Advances in Parasitology*. vol. 95. Elsevier.
- SAID-ALI, Z., F. GRENOUILLET, J. KNAPP, S. BRESSON-HADNI, D. A. VUITTON, F. RAOUL, C. RICHOU, L. MILLON, and P. GIRAUDOUX. 2013. Detecting nested clusters of human alveolar echinococcosis. *Parasitology*. 140: 1693–1700.
- SAITOH, T., and K. TAKAHASHI. 1998. The role of vole populations in prevalence of the parasite (*Echinococcus multilocularis*) in foxes. *Researches on Population Ecology*. 40: 97–105.
- SCHWEIGER, A., R. W. AMMANN, D. CANDINAS, P.-A. CLAVIEN, J. ECKERT, B. GOTTSSTEIN, N. HALKIC, B. MUELLHAUPT, B. M. PRINZ, J. REICHEN, P. E. TARR, P. R. TORGERSON, and

- P. DEPLAZES. 2007. Human alveolar echinococcosis after fox population increase, Switzerland. *Emerging Infectious Diseases*. 13: 878–882.
- SELKOE, K. A., and R. J. TOONEN. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*. 9: 615–629.
- SHAW, D. J., B. T. GRENFELL, and A. P. DOBSON. 1998. Patterns of macroparasite aggregation in wildlife host populations. *Parasitology*. 117: 597–610.
- SHOCHAT, E., P. S. WARREN, S. H. FAETH, N. E. MCINTYRE, and D. HOPE. 2006. From patterns to emerging processes in mechanistic urban ecology. *Trends in Ecology & Evolution*. 21: 186–191.
- SHOOP, W. L. 1991. Vertical transmission of helminths: Hypobiosisis and amphiparatensis. *Parasitology Today*. 7: 51–54.
- SIMONATO, G., R. CASSINI, S. MORELLI, A. DI CESARE, F. LA TORRE, F. MARCER, D. TRAVERSA, M. PIETROBELLI, and A. FRANGIPANE DI REGALBONO. 2019. Contamination of Italian parks with canine helminth eggs and health risk perception of the public. *Preventive Veterinary Medicine*. 172: 104788.
- SLIFKO, T. R., H. V. SMITH, and J. B. ROSE. 2000. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International Journal for Parasitology*. 30: 1379–1393.
- SMITH, D. A., K. RALLS, A. HURT, B. ADAMS, M. PARKER, and J. E. MALDONADO. 2006. Assessing reliability of microsatellite genotypes from kit fox faecal samples using genetic and GIS analyses. *Molecular Ecology*. 15: 387–406.
- SORVILLO, F., L. R. ASH, O. G. W. BERLIN, J. YATABE, C. DEGIORGIO, and S. A. MORSE. 2002. *Baylisascaris procyonis*: An Emerging Helminthic Zoonosis. *Emerging Infectious Diseases*. 8: 355–359.
- SOULSBURY, C. D., P. J. BAKER, G. IOSSA, and S. HARRIS. 2008. Fitness costs of dispersal in red foxes (*Vulpes vulpes*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 62: 1289–1298.
- STAUBACH, C., H. H. THULKE, K. TACKMANN, M. HUGH-JONES, and F. J. CONRATHS. 2001. Geographic information system-aided analysis of factors associated with the spatial distribution of *Echinococcus multilocularis* infections of foxes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 65: 943–948.
- STAUBACH, C., L. HOFFMANN, V. J. SCHMID, M. ZILLER, K. TACKMANN, and F. J. CONRATHS. 2011. Bayesian space–time analysis of *Echinococcus multilocularis*-infections in foxes. *Veterinary Parasitology*. 179: 77–83.

- STIEGER, C., D. HEGGLIN, G. SCHWARZENBACH, A. MATHIS, and P. DEPLAZES. 2002. Spatial and temporal aspects of urban transmission of *Echinococcus multilocularis*. *Parasitology*. 124: 631–640.
- SVOBODOVÁ, V., and B. LENSKÁ. 2002. Echinococcosis in Dogs in the Czech Republic. *Acta Veterinaria Brno*. 71: 347–350.
- SZOSTAKOWSKA, B., A. LASS, K. KOSTYRA, H. PIETKIEWICZ, and P. MYJAK. 2014. First finding of *Echinococcus multilocularis* DNA in soil: preliminary survey in Varmia-Masuria Province, northeast Poland. *Veterinary Parasitology*. 203: 73–79.
- TABERLET, P., and G. LUIKART. 1999. Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of the Linnean Society*. 68: 41–55.
- TABERLET, P., S. GRIFFIN, B. GOOSSENS, S. QUESTIAU, V. MANCEAU, N. ESCARAVAGE, L. P. WAITS, and J. BOUVET. 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research*. 24: 3189–3194.
- TACKMANN, K., U. LÖSCHNER, H. MIX, C. STAUBACH, H.-H. THULKE, and F. J. CONRATHS. 1998. Spatial distribution patterns of *Echinococcus multilocularis* (Leuckart 1863) (Cestoda: Cyclophyllidae: *Taeniidae*) among red foxes in an endemic focus in Brandenburg, Germany. *Epidemiology and Infection*. 120: 101–109.
- TACKMANN, K., U. LÖSCHNER, H. MIX, C. STAUBACH, H. H. THULKE, M. ZILLER, and F. J. CONRATHS. 2001. A field study to control *Echinococcus multilocularis*-infections of the red fox (*Vulpes vulpes*) in an endemic focus. *Epidemiology and Infection*. 127: 577–587.
- TAYLOR, L. H., S. M. LATHAM, and M. E. WOOLHOUSE. 2001. Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 356: 983–989.
- THEVENET, P. S., H. M. ALVAREZ, C. TORRECILLAS, O. JENSEN, and J. A. BASUALDO. 2020. Dispersion of *Echinococcus granulosus* eggs from infected dogs under natural conditions in Patagonia, Argentina. *Journal of Helminthology*. 94.
- THEVENET, P. S., O. JENSEN, R. DRUT, G. E. CERRONE, M. S. GRENÓVERO, H. M. ALVAREZ, H. M. TARGOVNIK, and J. A. BASUALDO. 2005. Viability and infectiousness of eggs of *Echinococcus granulosus* aged under natural conditions of inferior arid climate. *Veterinary Parasitology*. 133: 71–77.
- THEVENET, P. S., A. ÑANCUFIL, C. M. OYARZO, C. TORRECILLAS, S. RASO, I. MELLADO, M. E. FLORES, M. G. CORDOBA, M. C. MINVIELLE, and J. A. BASUALDO. 2004. An eco-

- epidemiological study of contamination of soil with infective forms of intestinal parasites. *European Journal of Epidemiology*. 19: 481–489.
- THOMAS, F., S. P. DAoust, and M. RAYMOND. 2012. Can we understand modern humans without considering pathogens? *Evolutionary Applications*. 5: 368–379.
- THOMPSON, R. C. 2017. *Biology and Systematics of Echinococcus*. *Advances in Parasitology*.
- THOMPSON, R. C. A. 2013. Parasite zoonoses and wildlife: One health, spillover and human activity. *International Journal for Parasitology*. 43: 1079–1088.
- THOMPSON, R. C. A., and D. P. MCMANUS. 2001. Aetiology: parasites and life-cycles. Pp. 1–16, in WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern. World Organisation for Animal Health, Paris.
- THOMPSON, R. C. A., C. M. O. KAPEL, R. P. HOBBS, and P. DEPLAZES. 2006. Comparative development of *Echinococcus multilocularis* in its definitive hosts. *Parasitology*. 132: 709–716.
- TOEWS, E., M. MUSIANI, S. CHECKLEY, D. VISSCHER, and A. MASSOLO. 2021. A global assessment of *Echinococcus multilocularis* infections in domestic dogs: proposing a framework to overcome past methodological heterogeneity. *International Journal for Parasitology*.
- TOMPKINS, D. M., A. M. DUNN, M. J. SMITH, and S. TELFER. 2011. Wildlife diseases: from individuals to ecosystems. *The Journal of Animal Ecology*. 80: 19–38.
- TORGERSON, P. R., and C. M. BUDKE. 2003. Echinococcosis--an international public health challenge. *Research in Veterinary Science*. 74: 191–202.
- TORGERSON, P. R., and P. S. CRAIG. 2009. Risk assessment of importation of dogs infected with *Echinococcus multilocularis* into the UK. *The Veterinary Record*. 165: 366–368.
- TORGERSON, P. R., and C. N. L. MACPHERSON. 2011. The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: Global trends. *Veterinary Parasitology*. 182: 79–95.
- TORGERSON, P. R., K. KELLER, M. MAGNOTTA, and N. RAGLAND. 2010. The Global Burden of Alveolar Echinococcosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 4: e722.
- TORGERSON, P. R., L. J. ROBERTSON, H. L. ENEMARK, J. FOEHR, J. W. B. van der GIESSEN, C. M. O. KAPEL, I. KLUN, and C. TREVISAN. 2020. Source attribution of human echinococcosis: A systematic review and meta-analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 14: e0008382.
- TRACHSEL, D., P. DEPLAZES, and A. MATHIS. 2007. Identification of taeniid eggs in the faeces from carnivores based on multiplex PCR using targets in mitochondrial DNA. *Parasitology*. 134: 911–920.

- TRAVAILLE, E., S. LA CARBONA, G. GARGALA, D. AUBERT, K. GUYOT, A. DUMETRE, I. VILLENA, and M. HOUSSIN. 2016. Development of a qRT-PCR method to assess the viability of *Giardia intestinalis* cysts, *Cryptosporidium* spp. and *Toxoplasma gondii* oocysts. *Food Control*. 59: 359–365.
- TRAVERSA, D. 2012. Pet roundworms and hookworms: A continuing need for global worming. *Parasites & Vectors*. 5: 91.
- TRAVERSA, D., A. FRANGIPANE DI REGALBONO, A. DI CESARE, F. LA TORRE, J. DRAKE, and M. PIETROBELLI. 2014. Environmental contamination by canine geohelminths. *Parasites & Vectors*. 7: 67.
- TSUKADA, H., K. HAMAZAKI, S. GANZORIG, T. IWAKI, K. KONNO, J. T. LAGAPA, K. MATSUO, A. ONO, M. SHIMIZU, H. SAKAI, Y. MORISHIMA, N. NONAKA, Y. OKU, and M. KAMIYA. 2002a. Potential remedy against *Echinococcus multilocularis* in wild red foxes using baits with anthelmintic distributed around fox breeding dens in Hokkaido, Japan. *Parasitology*. 125: 119–129.
- TSUKADA, H., K. HAMAZAKI, S. GANZORIG, T. IWAKI, K. KONNO, J. T. LAGAPA, K. MATSUO, A. ONO, M. SHIMIZU, H. SAKAI, Y. MORISHIMA, N. NONAKA, Y. OKU, and M. KAMIYA. 2002b. Potential remedy against *Echinococcus multilocularis* in wild red foxes using baits with anthelmintic distributed around fox breeding dens in Hokkaido, Japan. *Parasitology*. 125: 119–129.
- UMHANG, S. COMTE, V. RATON, V. HORMAZ, J.-M. BOUCHER, S. FAVIER, B. COMBES, and F. BOUÉ. 2014a. *Echinococcus multilocularis* infections in dogs from urban and peri-urban areas in France. *Parasitology Research*. 113: 2219–2222.
- UMHANG, G. 2017. Surveillance et épidémiologie d'*Echinococcus multilocularis* et d'*Echinococcus granulosus sensu lato*. Université Paris Est, France, 153. pp.
- UMHANG, G., N. WORONOFF-RHEN, B. COMBES, and F. BOUE. 2011. Segmental Sedimentation and Counting Technique (SSCT): An adaptable method for qualitative diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in fox intestines. *Experimental Parasitology*. 128: 57–60.
- UMHANG, G., J. KNAPP, V. HORMAZ, F. RAOUL, and F. BOUÉ. 2014b. Using the genetics of *Echinococcus multilocularis* to trace the history of expansion from an endemic area. *Infection, Genetics and Evolution*. 22: 142–149.
- UMHANG, G., J. KARAMON, V. HORMAZ, J. KNAPP, T. CENCEK, and F. BOUÉ. 2017a. A step forward in the understanding of the presence and expansion of *Echinococcus multilocularis* in Eastern Europe using microsatellite EmsB genotyping in Poland. *Infection, Genetics and Evolution*. 54: 176–182.

- UMHANG, G., M.-A. FORIN-WIART, V. HORMAZ, C. CAILLOT, J.-M. BOUCHER, M.-L. POULLE, and F. BOUÉ. 2015. *Echinococcus multilocularis* detection in the intestines and feces of free-ranging domestic cats (*Felis s. catus*) and European wildcats (*Felis s. silvestris*) from northeastern France. *Veterinary Parasitology*. 214: 75–79.
- UMHANG, G., M. BASTIEN, C. RENAULT, M. FAISSE, C. CAILLOT, J.-M. BOUCHER, V. HORMAZ, M.-L. POULLE, and F. BOUÉ. 2017b. A flotation/sieving method to detect *Echinococcus multilocularis* and *Toxocara* spp. eggs in soil by real-time PCR. *Parasite*. 24: 28.
- UMHANG, G., V. BASTID, H. AVCIOGLU, G. BAGRADE, M. BUJANIĆ, O. BJELIĆ ČABRILO, A. CASULLI, P. DORNY, J. VAN DER GIESSEN, E. GUVEN, J. HARNA, J. KARAMON, V. KHARCHENKO, J. KNAPP, L. KOLAROVA, S. KONYAEV, L. LAURIMAA, S. LOSCH, M. MILJEVIĆ, M. MITERPAKOVA, E. MOKS, T. ROMIG, U. SAARMA, V. SNABEL, T. SRETER, H. VALDMANN, and F. BOUÉ. 2021. Unravelling the genetic diversity and relatedness of *Echinococcus multilocularis* isolates in Eurasia using the EmsB microsatellite nuclear marker. *Infection, Genetics and Evolution*. 92: 104863.
- UTAAKER, K. S., E. SKJERVE, and L. J. ROBERTSON. 2017. Keeping it cool: Survival of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts on lettuce leaves. *International Journal of Food Microbiology*. 255: 51–57.
- VALIERE, N. 2002a. Amélioration et optimisation des méthodes non-invasives et des marqueurs microsatellites en biologie des populations et de la conservation. Thesis, Université Claude Bernard - Lyon 1, France, 215. pp.
- VALIERE, N. 2002b. GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes*. 2: 377–379.
- VALIÈRE, N., C. BONENFANT, C. TOÏGO, G. LUIKART, J.-M. GAILLARD, and F. KLEIN. 2007. Importance of a pilot study for non-invasive genetic sampling: genotyping errors and population size estimation in red deer. *Conservation Genetics*. 8: 69–78.
- VALOT, B., J. KNAPP, G. UMHANG, F. GRENOUILLET, and L. MILLON. 2015. Genomic characterization of EmsB microsatellite loci in *Echinococcus multilocularis*. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*. 32: 338–341.
- VAN KESTEREN, F., A. MASTIN, B. MYTYNOVA, I. ZIADINOV, B. BOUFANA, P. R. TORGERSON, M. T. ROGAN, and P. S. CRAIG. 2013. Dog ownership, dog behaviour and transmission of *Echinococcus* spp. in the Alay Valley, southern Kyrgyzstan. *Parasitology*. 140: 1674–1684.

- VANISCOTTE, A. 2009. Eléments d'écologie de la transmission d'*Echinococcus multilocularis* en Chine (Sichuan) : modélisation des distributions spatiales de communautés et populations des hôtes : des données de terrain aux prédictions. These de doctorat, Université de Franche-Comté, France, 186. pp.
- VANISCOTTE, A., F. RAOUL, M. L. POULLE, T. ROMIG, A. DINKEL, K. TAKAHASHI, M. H. GUISLAIN, J. MOSS, L. TIAOYING, Q. WANG, J. QIU, P. S. CRAIG, and P. GIRAUDOUX. 2011. Role of dog behaviour and environmental fecal contamination in transmission of *Echinococcus multilocularis* in Tibetan communities. *Parasitology*. 138: 1316–1329.
- VEIT, P., B. BILGER, V. SCHAD, J. SCHÄFER, W. FRANK, and R. LUCIUS. 1995. Influence of environmental factors on the infectivity of *Echinococcus multilocularis* eggs. *Parasitology*. 110 (Pt 1): 79–86.
- VERVAEKE, M., J. VAN DER GIESSEN, B. BROCHIER, B. LOSSON, K. JORDAENS, R. VERHAGEN, C. de L. COULANDER, and P. TEUNIS. 2006. Spatial spreading of *Echinococcus multilocularis* in Red foxes (*Vulpes vulpes*) across nation borders in Western Europe. *Preventive Veterinary Medicine*. 76: 137–150.
- VIEL, J. F., P. GIRAUDOUX, V. ABRIAL, and S. BRESSON-HADNI. 1999. Water vole (*Arvicola terrestris scherman*) density as risk factor for human alveolar echinococcosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 61: 559–565.
- VINEY, M., and J. CABLE. 2011. Macroparasite Life Histories. *Current Biology*. 21: R767–R774.
- VUITTON, D. A., F. DEMONMEROT, J. KNAPP, C. RICHOU, F. GRENOUILLET, A. CHAUCHET, L. VUITTON, S. BRESSON-HADNI, and L. MILLON. 2015. Clinical epidemiology of human AE in Europe. *Veterinary Parasitology*. 213: 110–120.
- WAHLSTRÖM, H., A. LINDBERG, J. LINDH, A. WALLENSTEN, R. LINDQVIST, L. PLYM-FORSHELL, E. O. LIND, E. O. ÅGREN, S. WIDGREN, U. CARLSSON, D. CHRISTENSSON, M. CEDERSMYG, E. LINDSTRÖM, G. E. OLSSON, B. HÖRNFELDT, A. BARRAGAN, C. DAVELID, M. HJERTQVIST, and M. ELVANDER. 2012. Investigations and actions taken during 2011 due to the first finding of *Echinococcus multilocularis* in Sweden. *Eurosurveillance*. 17: 20215.
- WAITS, L. P., G. LUIKART, and P. TABERLET. 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology*. 10: 249–256.
- WANG, Q., R. FRANCIS, B. CHRISTINE, P. S. CRAIG, Y. XIAO, D. A. VUITTON, C.-P. MAIZA, D. QIU, P. DAVID, and G. PATRICK. 2010. Grass height and transmission ecology of

- Echinococcus multilocularis* in Tibetan communities, China. Chinese Medical Journal. 123: 61–67.
- WEIL, Z. M., L. B. MARTIN, and R. J. NELSON. 2006. Interactions among immune, endocrine, and behavioural response to infection. Pp. 443–473, in *Micromammals and Macroparasites: From Evolutionary Ecology to Management* (S. MORAND, B. R. KRASNOV, and R. POULIN, eds.). Springer Japan, Tokyo.
- WHARTON, D. A. 1983. The production and functional morphology of helminth egg-shells. *Parasitology*. 86: 85–97.
- WOOLHOUSE, M. E., L. H. TAYLOR, and D. T. HAYDON. 2001. Population biology of multihost pathogens. *Science* (New York, N.Y.). 292: 1109–1112.
- WOOLHOUSE, M. E. J. 2002. Population biology of emerging and re-emerging pathogens. *Trends in Microbiology*. 10: s3–s7.
- WOOLHOUSE, M. E. J., and S. GOWTAGE-SEQUERIA. 2005. Host Range and Emerging and Reemerging Pathogens. *Emerging Infectious Diseases*. 11: 1842–1847.
- WRIGHT, A. N., and M. E. GOMPPER. 2005. Altered parasite assemblages in raccoons in response to manipulated resource availability. *Oecologia*. 144: 148–156.
- XIAO, N., J. QIU, M. NAKAO, T. LI, W. YANG, X. CHEN, P. M. SCHANTZ, P. S. CRAIG, and A. ITO. 2005. *Echinococcus shiquicus* n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. *International Journal for Parasitology*. 35: 693–701.
- YAN, C., L.-J. LIANG, K.-Y. ZHENG, and X.-Q. ZHU. 2016. Impact of environmental factors on the emergence, transmission and distribution of *Toxoplasma gondii*. *Parasites & Vectors*. 9.
- ZHANG, L., X. YANG, H. WU, X. GU, Y. HU, and F. WEI. 2011. The parasites of giant pandas: individual-based measurement in wild animals. *Journal of Wildlife Diseases*. 47: 164–171.

Annexes

Annexe A

Escotte-Binet, S.; **Da Silva, A.M.**; Cancès, B.; Aubert, D.; Dubey, J.; La Carbona, S.; et al. 2019. A rapid and sensitive method to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in soil samples. *Veterinary Parasitology* 274: 108904.



Research paper

A rapid and sensitive method to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in soil samples



Sandie Escotte-Binet^a, Abdou Malik Da Silva^{a,1}, Benjamin Cancès^b, Dominique Aubert^{a,c}, Jitender Dubey^d, Stéphanie La Carbona^e, Isabelle Villena^{a,c}, Marie-Lazarine Poulle^{a,f,*}

^a Université de Reims Champagne Ardenne, ESCAPE EA 7510, CAP SANTE, 51097, Reims, France

^b Université de Reims Champagne Ardenne, GEGENAA EA 3795, CONDORCET, 51097 Reims, France

^c CHU Reims, Hôpital Maison Blanche, Centre National de Référence de la Toxoplasmose, CRB Toxoplasma, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, 51097, Reims, France

^d United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Beltsville Agricultural Research Center, Animal Parasitic Diseases Laboratory, Building 1001, Beltsville, MD, 20705 2350, USA

^e ACTALIA, Food Safety Department, 310 Rue Popielujko, 50000, Saint-Lô, France

^f Université de Reims Champagne Ardenne, CERFE, 08240, Boult-aux-Bois, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Soil contamination
Dispersion solution
Sucrose flotation
Density gradients
Toxoplasma gondii
qPCR detection

ABSTRACT

Documenting the extent of soil contamination by *Toxoplasma gondii* oocysts is a key issue to prevent the worldwide infection caused by this protozoan. Our aim was to improve the practicability and sensitivity of a low-cost method to detect *T. gondii* DNA in soil samples developed a few years ago. Various parameters of the reference protocol were modified to determine their effect on the detection of *T. gondii* DNA in soil samples (“natural soil” and “sand”) spiked with oocysts. We tested i) filtration using stomacher bags, ii) Tween 80, Tween 20, SDS and Triton X100 as dispersion solutions, iii) sucrose solution, zinc chloride solution, Optiprep and Percoll as density gradients, iv) freeze/thaw versus mechanical grinding as lysis methods, and v) Qiagen versus Fastprep as extraction kits. The optimized protocol is quicker and easier to use than the previous one, and includes the following items: 0.1% Tween80/PBS for dispersion, sucrose solution for flotation, mechanical grinding, and FastDNA spin kit for extraction. It accurately detects *T. gondii* DNA in both fresh and frozen soil samples and displays a detection limit below 1 oocyst/g of fresh soil.

1. Introduction

Toxoplasma gondii is the protozoan parasite responsible for toxoplasmosis, a zoonosis that potentially affects all warm-blood species. In humans, the most severe manifestations occur in immunocompromised people and women first infected during pregnancy (Hill and Dubey, 2002). Humans and other warm-blood animals can be infected by accidentally swallowing *T. gondii* oocysts released in the environment along with felid faeces. The ingestion of a single oocyst can be sufficient to infect an intermediate host (Dubey, 2006).

The soil is increasingly recognized as an important source of *T. gondii* infection in humans (Muñoz-Zanzi et al., 2013; VanWormer et al., 2013). The millions of *T. gondii* oocysts shed by an infected cat over a period of 7–20 days (Dubey, 2010), their large distribution in human environments (Afonso et al., 2008; Gotteland et al., 2014; Simon

et al., 2017), together with their high viability in the soil (Frenkel et al., 1975; Lélou et al., 2012) provide some cause of public health concern. Documenting the extent of soil contamination by *T. gondii* oocysts is pivotal in preventing toxoplasmosis (Schlüter et al., 2014; Slifko et al., 2000). This challenge raises the need for a fast, low-cost and sensitive method to detect *T. gondii* oocysts in large soil samples, even at a low density, and with the presence of soil borne inhibitors preventing DNA detection (Yan et al., 2016).

Lélou et al. (2011) developed a sensitive and low-cost method to detect *T. gondii* oocysts in the soil using flotation followed by DNA extraction and qPCR. Their method detects 10–100 oocysts/g of soil whereas the previous method detected 10³ oocysts/40 g of soil (Lass et al., 2009). However, the protocol developed by Lélou et al. (2011) requires lengthy pre-extraction steps making it difficult to analyze a large number of soil samples (Gotteland et al., 2014; Simon et al.,

* Corresponding author at: Université de Reims Champagne Ardenne, CERFE, 08240, Boult-aux-Bois, France.

E-mail addresses: sandie.escotte@univ-reims.fr (S. Escotte-Binet), abdou_malik.da_silva@univ-fcomte.fr (A.M. Da Silva), benjamin.cances@univ-reims.fr (B. Cancès), daubert@chu-reims.fr (D. Aubert), dubey@ars.usda.gov (J. Dubey), s.lacarbona@actalia.eu (S. La Carbona), ivillena@chu-reims.fr (I. Villena), marie-lazarine.poulle@univ-reims.fr (M.-L. Poulle).

¹ Present address : Université de Franche Comté, Chrono-environnement, 25030 Besançon Cedex, France.

2017). In addition, distilled water used as a dispersion buffer to detach oocysts from soil particles yielded poor results on *Cryptosporidium* oocysts as compared to other dispersion solutions, such as Triton X100 and Tween 80 (Kuczynska and Shelton, 1999; Mawdsley et al., 1996).

The present study aimed at overcoming the limitations of the protocol of L  lu et al. (2011) (referred to as the “reference protocol” hereafter) to save time and increase sensitivity. We modified or suppressed some steps of the reference protocol, and tested the efficiency of dispersion solutions other than distilled water. The experiment was conducted on two types of soil samples spiked with *T. gondii* oocysts because the soil mineral composition may affected of egg or oocyst recovery (L  lu et al., 2011; Zilberman et al., 2009). Changes in the protocol steps and results from the dispersion solution tests led to the definition of an optimized protocol whose detection and quantification limits were established. The efficiency of the optimized protocol to detect *T. gondii* oocysts in frozen samples was then tested to comply with the 7 days decontamination period at for 7 days at -80   C required to prevent any risk of infection from field-collected samples originating from endemic areas of potentially lethal parasites, such as *Echinococcus multilocularis* (Veit et al., 1995).

2. Material and methods

2.1. Reference protocol (L  lu et al., 2011)

In the reference protocol, overnight incubation of the mineral matrix with sulfuric acid is used to kill bacterial and fungal contaminants (Frenkel et al., 1975), then *T. gondii* oocysts (specific gravity (SG) of 1.10 to 1.14) are detached from soil particles with distilled water and collected by floating in a sucrose solution with SG = 1.20 (pretreatment stage). Cold (+4   C) sucrose solution is known to be effective in floating and isolating *T. gondii* and *Cryptosporidium* spp. oocysts as well as bacteria from soil samples (Kuczynska and Shelton, 1999; Liu et al., 2010). It has to be gently placed at the bottom of the tube below the sample, in order to create a gradient. This stage is very fastidious because soil sediments including oocysts should not be mixed with the sucrose gradient. The oocyst wall is then degraded by three freeze/thaw cycles (-80   C/+20   C) of 4 h each (lysis step). The DNA is extracted by the QIAamp DNA mini kit from QIAGEN (DNA extraction step) and detected by qPCR.

2.2. Spiking soil samples with *Toxoplasma gondii* oocysts

ME49 (type II strain) *T. gondii* oocysts were supplied by the Animal Parasitic Diseases Laboratory from Beltsville Agricultural Research Center, Maryland, USA. They were air-shipped to France in 2% H₂SO₄ and stored in H₂SO₄ aqueous solution (2%) at 4   C. Before the experiments, they were washed three times in sterile distilled water to remove sulfuric acid. The concentrations of the parasite suspensions used for the experiments were calibrated with disposable counting cells (Kova^{  } Slide 10) in sodium dodecyl sulfate (SDS) 0.5%.

The efficiency of *T. gondii* DNA detection in relation with the dispersion solutions was tested in the topsoil horizon (0–10 cm) of two types of soil in which cats often defecate: a vegetable garden (referred to as “Natural soil”) and a sandpit (referred to as “Sand”), both collected near Reims city, north-eastern France. The natural soil had a loamy texture, an alkaline pH, a high CaCO₃ content and moderate organic carbon content, while the sand sample has alkaline pH and

extremely low organic carbon content (Table 1). Each 10-g sample was spiked with 10⁴ oocysts by depositing the oocysts solution on the soil sample. Oocysts solution was deposited on soil sample. Then, the spiked soil samples were vortexed and left at room temperature for 30 min.

2.3. Optimization stage

2.3.1. Pretreatment of soil samples

2.3.1.1. Tests on dispersion solutions. The effectiveness of H₂O alone, PBS alone, 0.1% Tween 20, 0.1% Tween 80, 0.1% Triton X100 or 0.1% SDS (all of them diluted in PBS buffer) to separate oocysts from the soil during the pretreatment stage was tested in duplicate on two spiked soil samples. Results were then compared to those from a control sample for each dispersion solution consisting of 10 g of non-spiked soil. These tests were conducted with the modified protocol (see below). The dispersion solutions identified as the best at the end of this experiment were then used to test the recovery yield of oocysts combined with flotation and density gradient solutions.

2.3.1.2. Changes in reference protocol. The soil samples were not incubated overnight in 2% sulfuric acid, but directly spiked with 10⁴ *T. gondii* oocysts before and then vortexed in 30 mL of each dispersion solution and placed in a stomacher bag (BagFilter^{  } R, Interscences). These bags are made of two compartments separated by a full surface filter. They were homogenized on a horizontal stirring table (15 min, 90 movements per min) to get rid of the plant debris present in the soils. During this step, the soil samples were filtered through a mesh smaller than 250   m and then centrifuged at 2500   g for 10 min. Distilled water (10 mL) was added to the pellets and mixed.

2.3.1.3. Test on flotation and density gradient solutions. To obtain oocysts from the filtrate, 8 trials (4 with 0.1% SDS/PBS buffer and 4 with 0.1% Tween 80/PBS) were performed to replace the sucrose solution by with more user-friendly solutions that can be mixed with soil filtrate by vortexing. The efficiency of solutions (20 mL) based on zinc chloride (SG = 1.42) and OptiPrepTM (SG = 1.32), which make the oocysts float, and of Percoll (SG = 1.03), which precipitates oocysts, were compared to the efficiency of a sucrose solution (SG = 1.20). The flotation solutions or density gradient solutions were then centrifuged 20 min at 1500 x g without brake and at +10   C. In the presence of Percoll, the pellets containing oocysts were kept for lysis. In the presence of zinc chloride, the sucrose solution and OptiPrepTM, the supernatants (between 20 and 25 ml) were transferred into another 50-mL tube and adjusted to 45 mL with distilled water before being mixed. After 10 min centrifugation at 2500   g, the supernatants were discarded and the pellets containing the oocysts were lysed.

2.3.2. Changes in oocyst lysis and DNA extraction

Lysis by alternate freeze-thaw cycles in the reference protocol was replaced by lysis by mechanical grinding for 2    40 s on the FastPrep system (MP Biomedicals) containing three different types of beads (1.4-mm ceramic beads, 0.1-mm silica beads and a 4-mm glass beads) (Yang et al., 2009). The QIAamp DNA mini kit (Qiagen) used in the reference protocol was also replaced by a FastDNATM SPIN kit (MP Biomedicals) following the manufacturer's instructions. This kit is especially designed for soil samples, and allows extracting non-degraded and pure DNA molecules (Cheun et al., 2003).

Table 1

Characteristics of the two types of samples used to test the efficiency of the detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the soil.

	Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)	Water holding capacity (%)	pH (%)	CaCO ₃ (%)	Organic Carbon (%)
Sand	97.1	2.4	0.5	29	9.8	12.8	< 0.2
Natural soil	43.6	46.1	10.3	35	8.1	40	1.23

2.4. *Toxoplasma gondii* qPCR

Toxoplasma gondii detection was performed by qPCR targeting the 529-bp repeat element in the *T. gondii* genome (Reischl et al., 2003). For each sample, the reactions were carried out in duplicate and consisted of 12.5 μ L of reaction mixture (iQ™ Supermix, Bio-Rad), 1 μ L of 10 μ M of each *T. gondii* primer, 0.5 μ L of 10 μ M of *T. gondii* probe, 4 μ L of H₂O, 1 μ L of bovine serum albumin (BSA, 10 mg/mL) and 5 μ L of DNA extract, for a total volume of 25 μ L. BSA was included in each mixture to avoid inhibitions. The reactions were performed on a QuantStudio™3 apparatus (ThermoFisher), with a program that includes activation of Taq polymerase for 3 min followed by 45 cycles of 15-s amplification at 95 °C and 1 min at 60 °C.

2.5. Assessment of the limits of detection and quantification

The limit of detection (LOD₅₀), corresponding to the last point allowing more than 50% positive sample, was assessed for the optimized protocol using a known concentration of *T. gondii* oocysts spiked artificially on 10 g of the “natural soil” sample. Concentrations of 1, 10, 10², 10³, 5 × 10³, 10⁴ and 5 × 10⁴ oocysts per 10 g of “natural soil” sample were used to test the linearity of the dose-response curve. Each concentration was tested in three replicates. To ensure the reliability of the results, oocyst-free negative controls were used in duplicate. All samples were processed using the optimized protocol with 0.1% Tween 80/PBS dispersion buffer, stomacher bags for filtration and sucrose flotation. Then, mechanical lysis was performed with beads. DNA was extracted with the FastDNA™ SPIN kit, and real-time qPCR was performed. The limit of quantification (LOQ), corresponding to the last dose with 100% positives for which dose/Cq relationship was linear ($r^2 > 0.98$), was also evaluated.

2.6. Test of the efficiency of the optimized protocol on frozen soil

The efficiency of the optimized protocol was tested on “natural soil” samples spiked with 10⁴ *T. gondii* oocysts and the frozen at –80 °C for 7 days.

2.7. Statistical analyses

Nonparametric Wilcoxon-Mann Whitney’s test was used to compare the mean number of qPCR quantification cycles (Cq) obtained with each modified protocol with the mean Cq obtained with the reference protocol. Samples were considered positive if Cq < 40. Statistical analyses were performed with R version 3.2.2 software (<https://www.r-project.org/>).

3. Results

3.1. Modified protocols as compared to the reference protocol

The use of distilled water along with the modified protocol led to a lower detection (mean Cq = 31.66 ± 1.36) than the use of distilled water along with the reference protocol (mean Cq = 26.73 ± 0.46, Fig. 1). In contrast, PBS produced better results with the modified protocol (mean Cq = 24.55 ± 0.21) than with the reference protocol (Fig. 1). Dispersion solutions with 0.1% Tween 20/PBS, 0.1% Tween 80/PBS, 0.1% Triton X100/PBS and 0.1% SDS/PBS, all combined with sucrose flotation, yielded mean Cq values lower (< 25) than those obtained with the reference protocol (Fig. 1). Among the dispersion solutions that yielded a mean Cq significantly lower than the reference protocol (Fig. 1), SDS/PBS 0.1% solution was the most effective in detecting the presence of *T. gondii* DNA in the soil samples, and was selected for the following experiments. We also selected Tween80/PBS buffer because it is the most commonly used in publications.

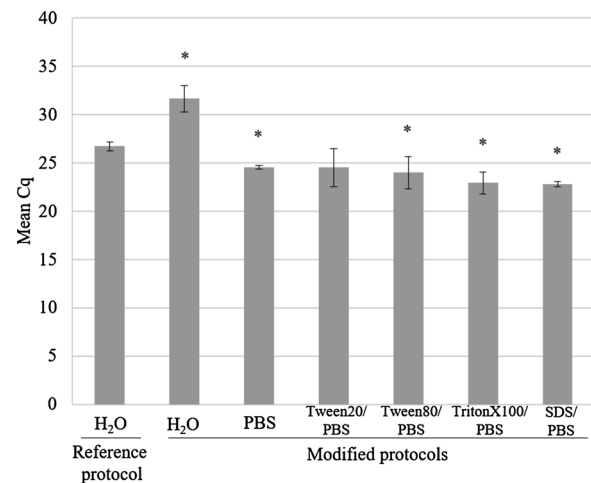


Fig. 1. Mean number of PCR cycle quantification (Cq ± standard deviation) to detect *Toxoplasma gondii* DNA in 10-g samples of natural soil spiked with 10⁴ oocysts using different dispersion solutions. The results obtained with the modified protocols are compared with those obtained with the reference protocol, * significant difference with $p < 0.05$.

3.2. Efficiency of flotation solutions and density gradients

The efficiency tests of the flotation solutions and density gradients were tested with the 0.1% SDS/PBS and the 0.1% Tween 80/PBS dispersion solutions on natural soil and sand samples (Fig. 2). With Percoll, all sediment and particles precipitated with the oocysts, making it impossible to proceed further. In the presence of zinc chloride, all oocysts were degraded when observed under the microscope after flotation and they went undetected by qPCR (Fig. 2). Therefore, Percoll and zinc chloride were not retained to isolate oocysts from the soil samples. Finally, the OptiPrep™ solution did not provide better results for oocyst recovery than the sucrose did, whether using SDS/PBS or Tween 80/PBS as dispersion solutions (Fig. 2). The sucrose solution, used in the reference protocol, was thus retained as the flotation solution, as the other flotation or gradient solutions were less efficient. The mean Cq values obtained when using 0.1% Tween 80/PBS and sucrose were significantly lower than those obtained with the reference protocol (Mann-Whitney U-test, $W = 48$, $P < 0.001$) both in natural soil and sand samples (Fig. 2).

3.3. Optimized protocol

The optimized protocol resulting from the previous experiments (Fig. 3) consisted in dispersing 10 g of soil sample in 30 mL of 0.1% Tween 80/PBS to separate the oocysts from the soil particles. The mixture was filtered in a 250- μ m stomacher bag with stirring for 15 min. The filtrate was centrifuged, the supernatant removed, and the pellet suspended in 10 mL of distilled water. Then, 20 mL of a cold (+4 °C) sucrose solution with an SG of 1.20 was gently and ex-temperaneously deposited at the bottom of the tube below the pellet homogenized in distilled water. After centrifugation without braking, the supernatant was collected and its volume was filled with distilled water to wash oocysts. Then, the supernatant was removed and the pellet was lysed on a FastPrep system. DNA was extracted with a FastDNA SPIN kit and detected by qPCR.

3.4. Limit of detection (LOD₅₀) and limit of quantification (LOQ)

The standard curve of the whole range of tested quantities (1–5 × 10⁴ oocysts) was linear (Fig. 4). The detection level was the lowest number of oocysts tested, i.e. 1 oocyst. The mean Cq values of the oocyst DNA extracts were correlated to the logarithm of the number

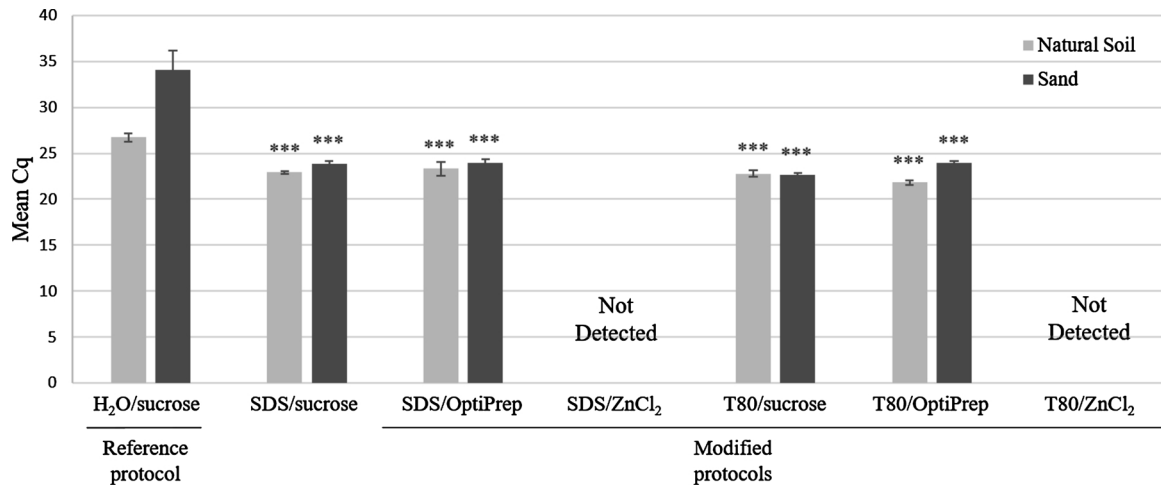


Fig. 2. Mean number of PCR cycle quantification (Cq ± standard deviation) to detect *Toxoplasma gondii* DNA in 10-g samples of natural soil or sand spiked with 10⁴ oocysts, using H₂O, SDS/PBS or Tween80/PBS with sucrose, OptiPrep™ or zinc chloride (ZnCl₂) flotation. The results obtained with the modified protocols are compared with those obtained with the reference protocol, *** significant difference with *p* < 0.001.

of spiked oocysts (*r*² = 0.9727). The qPCR detected oocyst DNA in 2 out of the 3 natural soil samples spiked with only 1 oocyst, whereas the 3 negative controls yielded negative qPCR results (Table 2). These results confirm the reliability and accuracy of detection in spiked natural soil samples with the optimized protocol, with LOD₅₀ < 10 oocysts/10 g of soil, i.e., < 1 oocyst/g of soil. LOQ was estimated to be < 10 oocysts/10 g of soil with *r*² = 0.9937, i.e., < 1 oocyst/g of soil.

3.5. Effect of freezing on *T. Gondii* detection

As expected, detection of *T. gondii* DNA was poorer on frozen soil samples (−80 °C) than in fresh soil samples (Fig. 5). The average Cq obtained from frozen soil samples was significantly higher than the average Cq obtained from fresh soil samples with the same protocol. With freezing at −80 °C for 7 days, there was an average loss of 4 Cq. However, oocyst detection in frozen soil with the optimized protocol was equivalent to oocyst detection in fresh soil with the reference protocol (Fig. 5).

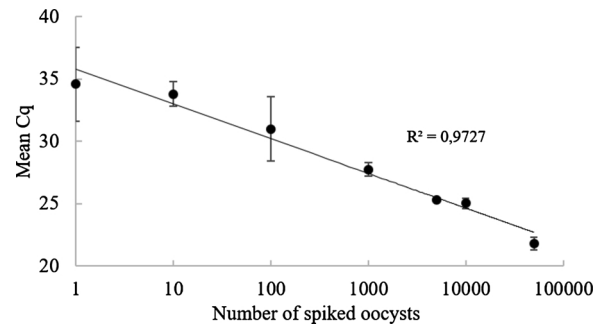


Fig. 4. Mean number of PCR cycle quantification (Cq ± standard deviation) to detect *Toxoplasma gondii* DNA in 10-g samples of natural soil spiked with 1–5 × 10⁴ *T. gondii* oocysts using 0.1% Tween 80/PBS and sucrose solution in the optimized protocol.

4. Discussion

Parasitic eggs or oocysts have long been recovered from environmental matrices by sample homogenization and large filtration and

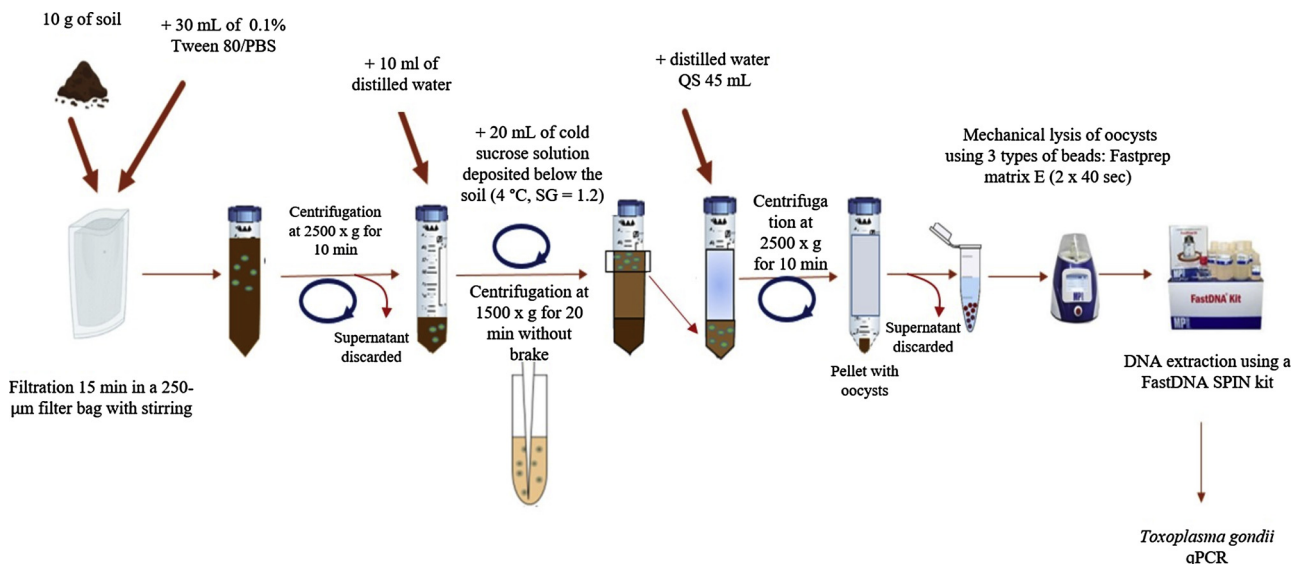


Fig. 3. Detailed diagram of the optimized protocol used to detect *Toxoplasma gondii* DNA in soil samples.

Table 2

Proportion of natural soil samples that yielded positive qPCR results for the detection of *Toxoplasma gondii* oocysts with the optimized protocol, as a function of the number of spiked oocysts.

	Oocysts number							
	0	1	10 ¹	10 ²	10 ³	5 × 10 ³	10 ⁴	5 × 10 ⁴
Positive Samples	0/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3

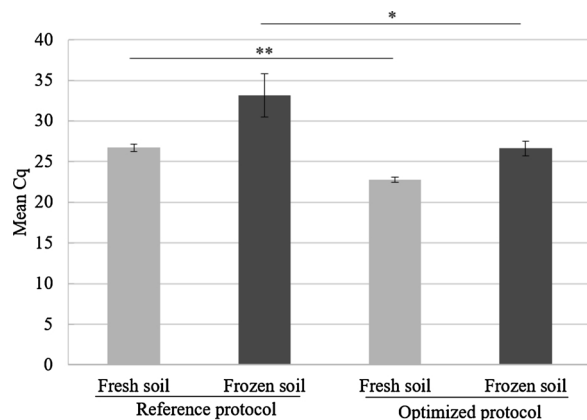


Fig. 5. Mean number of PCR cycle quantification (Cq ± standard deviation) to detect *Toxoplasma gondii* DNA in 10-g samples of fresh natural soil or 10-g of natural soil frozen at -80°C for 7 days, both spiked with 10^4 *T. gondii* oocysts. The results obtained with the optimized protocol are compared with those obtained with the reference protocol, * and ** significant difference with $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

flotation steps followed by direct observations (Dumètre and Dardé, 2003). The complex composition of soils, made of various particles and materials, makes it hard to identify small eggs and oocysts under the microscope. In addition, the methods used to recover zoonotic parasites from soils are not standardized, so that the numbers of positive samples in different geographical localities are not always comparable (Mizgajska et al., 2001; Mizgajska-Wiktor et al., 2017). The recent development of flotation techniques associated with molecular biology to detect the presence of parasitic DNA provides new insights into soil contamination but requires methodological adjustments.

The present study is aimed at contributing to these adjustments by improving both the practicability and the sensitivity of the low-cost method developed by Lélou et al. (2011) to detect *T. gondii* oocysts in the soil. Time was notably saved by removing the reference protocol overnight step in sulfuric acid to kill bacterial and fungal contaminants. The high sensitivity of the optimized protocol demonstrates that qPCR is specific enough to detect *T. gondii* in soil samples without decontamination, unlike in cell cultures. By removing this unnecessary step, the optimized protocol was reduced by 12 h. Stomacher bags, which are largely used for microbial detection in vegetables matrices to remove large particles (Caradonna et al., 2017; Highmore et al., 2017; Hohweyer et al., 2016), also saved time. These bags let particles below $250\ \mu\text{m}$ through, and are very useful with soil samples, which are generally very heterogeneous and may contain straw, pebbles, roots or other debris that can interfere at each stage of the protocol, and in particular during the flotation and extraction steps. Sediment dispersion with a dispersing solution using a detergent/surfactant, refinement of flotation procedures or density gradients could remove debris but are not sufficient (Kuczynska and Shelton, 1999). Non-ionic surfactants of the polyoxyethylene hydrophilic and hydrophobic groups, like Tween 20/PBS and Tween 80/PBS or Triton-X-100/PBS were tested, as well as SDS which belongs to the anionic group with a hydrophilic sulfate group and a mixture of hydrophobic lauryl and alkyl groups (Schick,

1966). The anionic surfactant is thought to have an effect on the hydrophobicity of particles by increasing their negative charge. Neither cationic nor amphoteric surfactants were used in this study because cationic surfactants have lower dispersive properties while amphoteric surfactants are more expensive. Treatment with a non-ionic surfactant like Tween 80/PBS was sufficient to disperse particles. The action of the anionic surfactant (SDS) on hydrophobicity and particle charge led to better results. The efficiency in dispersing particles depends on the soil composition and the nature of the particles. In our study, Tween 80, Tween 20, Triton X100 and SDS were diluted in standard PBS in order to increase the ionic strength of the solution. Surprisingly, the dispersing solutions that act by altering the ionic strength were the most efficient on all the soil types we examined. Regardless of the soil type, Tween 80/PBS had a better isolation performance than the SDS buffer. Unfortunately, our attempts to replace the sucrose solution by an easy-to-use solution failed. Zinc chloride (SG = 1.42) proved effective in floating oocysts, but microscopy observation showed that they had lost their structural integrity and their ovoid shape. Kuczynska and Shelton (1999) also noted an extremely low recovery rate of *Cryptosporidium* spp. oocysts from the ground after flotation with zinc-based solutions. Percoll (SG = 1.04) is routinely used to recover bacteria from low-density organic matter, such as vegetables; it was ineffective to recover *T. gondii* oocysts from soil samples. The OptiPrep™ solution, currently used in the laboratory as a density gradient solution for cell fractionation or bacterium purification, yielded a slightly higher Cq than the sucrose solution. Finally, the sucrose solution had to be kept to provide density gradient in the flotation step of the optimized protocol. This step is tricky because its effectiveness may depend on different parameters like sample volume, soil texture, the degree of soil contamination and pretreatment (Nunes et al., 1994).

In soils, protozoan DNA is generally enclosed in oocysts that possess very robust cell walls (Dumètre et al., 2013). Soil constituents may impair oocyst lysis, degrade nucleic acids, and/or inhibit polymerase activity if co-extracted with the target pathogen DNA (Schrader et al., 2012). For those reasons, pretreatment procedures are applied prior to protozoan oocyst DNA extraction in many studies (Elwin et al., 2014). In other studies, oocysts present in the matrix were exposed to variable numbers of freeze/thaw cycles or bursts of Fast Prep® instrument to facilitate oocyst wall disruption and nucleic acid isolation (Elwin et al., 2012; Lass et al., 2012). By replacing the 4 h of thermal shock by 2 times 40 s of mechanical lysis, we reduced the experimentation time and increased detection efficiency. Then, a DNA extraction kit adapted to soil samples was used allowing a better extraction yield than the extraction kit used by Lélou et al. (2011).

The optimized protocol resulting from the present study was more efficient to detect *T. gondii* oocysts in soil. Furthermore, the time taken for pretreatment, lysis, DNA extraction and qPCR allowed analyzing 25 soil samples/day, i.e., testing the several hundreds of soil samples required when assessing *T. gondii* distribution in a soil (Gotteland et al., 2014; Simon et al., 2017) within relatively short-time. The oocyst recovery yield was lower in soil samples frozen at -80°C for 7 days than in fresh samples. However, even in this case, its effectiveness remained equivalent to that of the reference protocol applied to fresh soil samples. The hypothesis of a change in oocyst specific gravity after freezing, as observed for bacteria (Lindqvist, 1997) cannot be ruled out, and might require adaptation of the sucrose flotation solution. Freezing can also make the oocyst wall more fragile, so that the oocyst lysis step should also be adapted (speed and lysis time).

The results from this study also confirm that the soil structure should be taken into account when assessing the occurrence of zoonotic parasites in soil samples because interactions between the soil particles and the flotation solutions can interfere with parasite recovery (Nunes et al., 1994). Many studies have shown increased adsorption in soils with high organic matter or clay contents due to their large surface area and negative charge (Petersen et al., 2012). In agreement with Zilberman et al. (2009) and Lélou et al. (2011), a high proportion of sand

decreased the detection rate of *T. gondii* oocysts in soil samples. Because of its abrasive power, sand is thought to damage the oocyst wall, let the emulsifying buffer and flotation solution into the oocysts, and thus reducing or preventing DNA detection. We chose the best optimization (Tween 80/PBS and sucrose) for all soil types in our study whether they were sand samples or natural soil samples.

As many parameters interfere with the efficiency of *T. gondii* oocyst extraction from soil samples, a compromise has to be found to obtain the best possible results despite varying soil compositions. Future investigations will adapt the protocol to make it most sensitive on frozen soil samples and on various soil compositions and, why not, on various parasites taking their wall structure and specific gravity into account. The detection of parasites oocysts in the soil should not be overlooked because of the risk of human contamination.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Declaration of Competing Interest

No competing interests to declare.

References

- Afonso, E., Lemoine, M., Pouille, M.-L., Ravat, M.-C., Romand, S., Thulliez, P., Villena, I., Aubert, D., Rabilloud, M., Riche, B., Gilot-Fromont, E., 2008. Spatial distribution of soil contamination by *Toxoplasma gondii* in relation to cat defecation behaviour in an urban area. *Int. J. Parasitol.* 38, 1017–1023.
- Caradonna, T., Marangi, M., Del Chierico, F., Ferrari, N., Reddel, S., Bracaglia, G., Normanno, G., Putignani, L., Giangaspero, A., 2017. Detection and prevalence of protozoan parasites in ready-to-eat packaged salads on sale in Italy. *Food Microbiol.* 67, 67–75.
- Cheun, H.I., Makino, S.-I., Watarai, M., Erdenebaatar, J., Kawamoto, K., Uchida, I., 2003. Rapid and effective detection of anthrax spores in soil by PCR. *J. Appl. Microbiol.* 95, 728–733.
- Dubey, J.P., 2006. Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. *Vet. Parasitol.* 140, 69–75.
- Dubey, J.P., 2010. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 336.
- Dumètre, A., Dardé, M.-L., 2003. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 651–661.
- Dumètre, A., Dubey, J.P., Ferguson, D.J.P., Bongrand, P., Azas, N., Puech, P.H., 2013. Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst wall. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 11535–11540.
- Elwin, K., Robinson, G., Hadfield, S.J., Fairclough, H.V., Iturriza-Gómara, M., Chalmers, R.M., 2012. A comparison of two approaches to extracting *Cryptosporidium* DNA from human stools as measured by a real-time PCR assay. *J. Microbiol. Methods* 89, 38–40.
- Elwin, K., Fairclough, H.V., Hadfield, S.J., Chalmers, R.M., 2014. *Giardia duodenalis* typing from stools: a comparison of three approaches to extracting DNA, and validation of a probe-based real-time PCR typing assay. *J. Med. Microbiol.* 63, 38–44.
- Frenkel, J.K., Ruiz, A., Chinchilla, M., 1975. Soil survival of *toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24, 439–443.
- Gotteland, C., Gilot-Fromont, E., Aubert, D., Pouille, M.-L., Dupuis, E., Dardé, M.-L., Forin-Wiart, M.-A., Rabilloud, M., Riche, B., Villena, I., 2014. Spatial distribution of *Toxoplasma gondii* oocysts in soil in a rural area: influence of cats and land use. *Vet. Parasitol.* 205, 629–637.
- Highmore, C.J., Rothwell, S.D., Keevil, C.W., 2017. Improved sample preparation for direct quantitative detection of *Escherichia coli* O157 in soil using qPCR without pre-enrichment. *Microb. Biotechnol.* 10, 969–976.
- Hill, D., Dubey, J.P., 2002. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin. Microbiol. Infect.* 8, 634–640.
- Hohweyer, J., Cazeaux, C., Travaillé, E., Languet, E., Dumètre, A., Aubert, D., Terryn, C., Dubey, J.P., Azas, N., Houssin, M., Loïc, F., Villena, I., La Carbona, S., 2016. Simultaneous detection of the protozoan parasites *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* and *Giardia* in food matrices and their persistence on basil leaves. *Food Microbiol.* 57, 36–44.
- Kuczynska, E., Shelton, D.R., 1999. Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts in feces, manures, and soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2820–2826.
- Lass, A., Pietkiewicz, H., Modzelewska, E., Dumètre, A., Szostakowska, B., Myjak, P., 2009. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental soil samples using molecular methods. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28, 599–605.
- Lass, A., Pietkiewicz, H., Szostakowska, B., Myjak, P., 2012. The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental fruits and vegetables samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31, 1101–1108.
- Lélu, M., Gilot-Fromont, E., Aubert, D., Richaume, A., Afonso, E., Dupuis, E., Gotteland, C., Marnef, F., Pouille, M.-L., Dumètre, A., Thulliez, P., Dardé, M.-L., Villena, I., 2011. Development of a sensitive method for *Toxoplasma gondii* oocyst extraction in soil. *Vet. Parasitol.* 183, 59–67.
- Lélu, M., Villena, I., Dardé, M.-L., Aubert, D., Geers, R., Dupuis, E., Marnef, F., Pouille, M.-L., Gotteland, C., Dumètre, A., Gilot-Fromont, E., 2012. Quantitative estimation of the viability of *Toxoplasma gondii* oocysts in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5127–5132.
- Lindqvist, R., 1997. Preparation of PCR samples from food by a rapid and simple centrifugation technique evaluated by detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Int. J. Food Microbiol.* 37, 73–82.
- Liu, J., Li, J., Feng, L., Cao, H., Cui, Z., 2010. An improved method for extracting bacteria from soil for high molecular weight DNA recovery and BAC library construction. *J. Microbiol.* 48, 728–733.
- Mawdsley, J.L., Brooks, A.E., Merry, R.J., 1996. Movement of the protozoan pathogen *Cryptosporidium parvum* through three contrasting soil types. *Biol. Fertil. Soils* 21, 30–36.
- Mizgajski, H., Jarosz, W., Rejmenciak, A., 2001. Distribution of sources of *Toxocara* spp. infection in urban and rural environments in Poland. *Wiad. Parazytol.* 47, 399–404.
- Mizgajski-Wiktor, H., Jarosz, W., Fogt-Wyrwas, R., Drzewiecka, A., 2012. Distribution and dynamics of soil contamination with *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs in Poland and prevention measures proposed after 20 years of study. *Vet. Parasitol.* 234, 1–9.
- Muñoz-Zanzi, C., Williams-Nguyen, J., Belongia, E.A., 2013. A sero-survey of toxoplasmosis in farm and non-farm children from Wisconsin, United States, 1997–1999. *BMC Public Health* 13, 837. <https://doi.org/10.3201/eid1610.091674>.
- Nunes, C.M., Sinhori, L.L., Ogassawara, S., 1994. Influence of soil texture in the recovery of *Toxocara canis* eggs by a flotation method. *Vet. Parasitol.* 53, 269–274.
- Petersen, H.H., Enemark, H.L., Olsen, A., Amin, M.G.M., Dalsgaard, A., 2012. Transport of *Cryptosporidium parvum* oocysts in soil columns following applications of raw and separated liquid slurries. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5994–6000.
- Schick, M.J. (Ed.), 1966. *Nonionic Surfactants*, Surfactant Science Series. Dekker, New York, pp. 1085.
- Reischl, U., Bretagne, S., Krüger, D., Ernault, P., Costa, J.-M., 2003. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infect. Dis.* 3, 7.
- Schlüter, D., Däubener, W., Schares, G., Groß, U., Pleyer, U., Lüder, C., 2014. Animals are key to human toxoplasmosis. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 917–929.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., John, R., 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* 113, 1014–1026.
- Simon, J.A., Kurdzielewicz, S., Jeannot, E., Dupuis, E., Marnef, F., Aubert, D., Villena, I., Pouille, M.-L., 2017. Spatial distribution of soil contaminated with *Toxoplasma gondii* oocysts in relation to the distribution and use of domestic cat defecation sites on dairy farms. *Int. J. Parasitol.* 47, 357–367.
- Slifko, T.R., Smith, H.V., Rose, J.B., 2000. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int. J. Parasitol.* 30, 1379–1393.
- Van Wormer, E., Fritz, H., Shapiro, K., Mazet, J.A.K., Conrad, P.A., 2013. Molecules to modeling: *toxoplasma gondii* oocysts at the human-animal-environment interface. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 36, 217–231.
- Veit, P., Bilger, B., Schad, V., Schäfer, J., Frank, W., Lucius, R., 1995. Influence of environmental factors on the infectivity of *Echinococcus multilocularis* eggs. *Parasitology* 110, 79–86.
- Yan, C., Liang, L.J., Zheng, K.Y., Zhu, X.Q., 2016. Impact of environmental factors on the emergence, transmission and distribution of *Toxoplasma gondii*. *Parasit. Vectors* 9, 137.
- Yang, W., Lindquist, H.D., Cama, V., Schaefer III, F.W., Villegas, E., Fayer, R., Lewis, E.J., Feng, Y., Xiao, L., 2009. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water samples concentrates by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3477–3483.
- Zilberman, A., Zimmels, Y., Starosvetsky, J., Zuckerman, U., Armon, R., 2009. A two-phase separation method for recovery of *Cryptosporidium* oocysts from soil samples. *Water Air Soil Pollut.* 203, 325–334.

Annexe B

Table of samples taken from caged red foxes of both sexes for the screening and optimisation step, showing in succession the sample ID, sample type (faeces or hair samples), genotype ID (Gen_ID), genotype sex (Gen_sex), sample sex, list of alleles for each microsatellite locus and sex marker (K9-AM).

Sample_ID	Sample_type	Gen_ID	Gen_sex	Sample_sex	AHT121	AHT137	CO1.424	INU055	CPH2	AHT171	C08.618	FH2010	CPH11	FH2457	CXX0279	C04.140	REN169	FH2848	K9-AM
F4068C133	faeces	1	M	M	097097	141145	177177	212216	093099	159159	187187	216224	120120	194206	092102	148150	186190	224242	201215
P4068C133	hair	1	M	M	097097	141145	177177	212216	093099	159159	187187	216224	120120	194206	092102	148150	186190	224242	201215
F4073C151	faeces	2	F	F	099099	141143	175175	212212	099099	159159	187187	220220	120120	194210	092102	150150	190190	224224	215215
P4073C151	hair	2	F	F	099099	141143	175175	212212	099099	159159	187187	220220	120120	194210	092102	150150	186190	224224	215215
F4090C137	faeces	3	F	F	097099	141145	175177	212212	113113	159159	187187	220220	118120	206206	102102	150150	186190	224224	215215
P4090C137	hair	3	F	F	097099	141145	175177	212212	113113	159159	187187	220220	118120	206206	102102	150150	186190	224224	215215
F4102C155	faeces	4	M	M	097099	141143	175175	212212	099099	159159	177187	220220	118120	194194	100102	150150	190190	224224	201215
P4102C155	hair	4	M	M	097099	141143	175175	212212	099099	159159	177187	220220	118120	194194	100102	150150	190190	224224	201215
F4145C105	faeces	5	F	F	097103	141145	177177	212216	093099	159159	187187	224224	120120	194206	092102	148150	186190	224242	215215
P4145C105	hair	5	F	F	097103	141145	177177	212216	093099	159159	187187	224224	120120	194206	092102	148150	186190	224242	215215
F4201C139	faeces	6	F	F	097097	141145	175177	212212	099099	159159	187187	220220	120120	206206	092102	148150	186186	224224	215215
P4201C139	hair	6	F	F	097097	141145	175177	212212	099099	159159	187187	220220	120120	206206	092102	148150	186186	224224	215215
F4204C135	faeces	7	F	F	099103	141145	175177	212214	093099	159159	177187	220220	120120	184200	102102	148150	190190	224224	215215
P4204C135	hair	7	F	F	099103	141145	175177	212214	093099	159159	177187	220220	120120	184200	102102	148150	190190	224224	215215
F4218C109	faeces	8	M	M	097097	141145	175177	212212	093099	159159	181187	220220	118118	206214	092092	148150	186190	224242	201215
P4218C109	hair	8	M	M	097097	141145	175177	212212	093099	159159	181187	220220	118118	206214	092092	148150	186190	224242	201215
F4222C121	faeces	9	M	M	099099	141143	175175	212212	099099	159159	187187	220220	120120	194194	092102	150150	186190	224224	201215
P4222C121	hair	9	M	M	099099	141143	175175	212212	099099	159159	187187	220220	120120	194194	092102	150150	186190	224224	201215
F4223C127	faeces	10	F	F	097097	141145	175181	212220	093099	159159	177187	216220	120120	194206	102102	150150	186190	232232	215215
P4223C127	hair	10	F	F	097097	141145	175181	212220	093099	159159	177187	216220	120120	194206	102102	150150	186190	232232	215215
F4265C113	faeces	11	M	M	097099	145145	175175	210212	093095	159159	187187	220224	120120	206214	102102	148158	186186	224224	201215
P4265C113	hair	11	M	M	097099	145145	175175	210212	093095	159159	187187	220224	120120	206214	102102	148158	186186	224224	201215
F4270C117	faeces	12	M	M	097103	141145	175177	212212	093093	159159	177187	220220	118120	210210	092100	148148	190190	224242	201215
P4270C117	hair	12	M	M	097103	141145	175177	212212	093093	159159	177187	220220	118120	210210	092100	148148	190190	224242	201215
F4272C111	faeces	13	M	M	097103	141143	175177	212220	099099	159159	187187	220220	118120	210210	092100	150150	186190	224224	201215
P4272C111	hair	13	M	M	097103	141143	175177	212220	099099	159159	187187	220220	118120	210210	092100	150150	186190	224224	201215
F4276C119	faeces	14	F	F	097099	141145	177181	214220	093093	159159	187187	220220	116118	198198	100102	148148	186190	224224	215215
P4276C119	hair	14	F	F	097099	141145	177181	214220	093093	159159	187187	220220	116118	198198	100102	148148	186190	224224	215215
F4277C115	faeces	15	M	M	097099	141145	177181	212214	093093	159159	187187	220220	116120	198198	102102	148148	186190	224242	201215
P4277C115	hair	15	M	M	097099	141145	177181	212214	093093	159159	187187	220220	116120	198198	102102	148148	186190	224242	201215
F4306C129	faeces	16	M	M	097099	143143	175175	212212	099099	159159	177187	220220	118120	194194	092092	150150	186190	224224	201215
P4306C129	hair	16	M	M	097099	143143	175175	212212	099099	159159	177187	220220	118120	194194	092092	150150	186190	224224	201215
F4311C153	faeces	17	F	F	097097	145145	175175	212212	099099	159159	187187	220220	118120	200214	102102	150150	186190	224242	215215
P4311C153	hair	17	F	F	097097	145145	175175	212212	099099	159159	187187	220220	118120	214214	102102	150150	186190	224242	215215
F4318C131	faeces	18	F	F	097103	141143	175181	212212	093099	151159	185187	220224	120120	206206	102102	148150	186190	242242	215215
P4318C131	hair	18	F	F	097103	141143	175181	212212	093099	151159	185187	220224	120120	206206	102102	148150	186190	242242	215215
F4359C107	faeces	19	F	F	097101	141145	177177	212212	099099	159159	187187	216224	120120	206206	092102	150150	186190	222224	215215
P4359C107	hair	19	F	F	097101	141145	177177	212212	099099	159159	187187	216224	120120	206206	092102	150150	186190	222224	215215
F4374C157	faeces	20	M	M	097099	145145	175175	212212	093093	159159	187187	220220	120120	194214	102102	148148	186186	224232	201215
P4374C157	hair	20	M	M	097099	145145	175175	212212	093093	159159	187187	220220	120120	194214	102102	148148	186186	224232	201215

Annexe C

Table of successfully genotyped field fox faecal samples, showing in succession the sample ID, date of collection, geographical location information (LongL93, LatL93), *Echinococcus multilocularis* DNA status (Em, 0 for negative and 1 for positive), genotype ID (Gen_ID), genotype sex (Gen_sex), sample sex, list of alleles for each microsatellite locus and sex marker (K9-AM, 00 for missing data).

Sample_ID	Date	LongL93	LatL93	Em	Gen_ID	Gen_sex	Sample_sex	AHT121	AHT137	C01.424	INU055	CPH2	AHT171	C08.618	FH2010	CPH11	FH2457	CXX0279	C04.140	REN169	FH2848	K9-AM
17AL006	15/09/2017	962212.9218	6655806.266	0	1	F	F	081099	139141	169175	212218	095095	151151	185185	216224	118118	184184	092100	148152	182188	236242	215215
17AL074	16/03/2017	962358.0279	6655435.287	1	1	F	F	081099	139141	169175	212218	095095	151151	185185	216224	118118	184184	092100	148152	182188	236242	215215
17AL091	16/03/2017	962285.9929	6655529.637	1	1	F	F	081099	139141	169175	212218	095095	151151	185185	224224	118118	184184	092100	148152	182188	236242	215215
17AL1068	23/11/2017	962537.767	6655776.559	1	1	F	F	081099	139141	169175	212218	095095	151151	185185	216224	118118	184184	092100	148152	182188	236242	215215
17AL116	16/03/2017	962288.8775	6655782.349	0	1	F	F	081099	139141	169175	212218	095095	151151	185185	216224	118118	184184	092100	148152	182188	236242	215215
18AL042	05/04/2018	962265.5292	6655882.83	1	1	F	F	081099	139141	169175	212218	095095	151151	185185	216224	118118	184184	092100	148152	182188	236242	215215
18AL255	12/07/2018	963078.8927	6656129.004	1	1	F	F	081099	139141	169175	212218	095095	151151	185185	216224	118118	184184	092100	148152	182188	236242	215215
17AL016	15/09/2017	962131.3	6655729.881	1	2	F	F	081101	141147	175175	218218	095097	151151	185187	216220	118126	184200	092100	144152	170176	226242	215215
17AL081	16/03/2017	962965.5511	6656022.866	0	2	F	F	081101	141147	175175	218218	095097	151151	185185	216220	118118	184200	092100	146152	170176	226242	215215
17AL084	16/03/2017	962686.9451	6655890.371	1	2	F	F	081101	141147	175175	218218	095097	151151	185185	216220	118126	184200	092100	144152	170176	226242	215215
17AL1072	23/11/2017	962311.2736	6655560.87	0	2	F	F	081101	141147	175175	218218	095097	151151	185185	216220	118126	184200	092100	144152	170176	226242	215215
17AL1122	23/11/2017	962064.1385	6655533.283	1	2	F	F	081101	141147	175175	218218	095097	151151	185185	216220	118126	184200	092100	144152	170176	226242	215215
18AL046	25/01/2018	962618.1178	6655845.334	0	2	F	F	081101	141147	175175	218218	095097	151151	185185	216220	118126	184200	092100	144152	170176	226242	215215
18AL262	24/05/2018	962278.4049	6655077.941	0	2	F	F	081101	141147	175175	218218	095097	151151	185185	216220	118126	184200	092100	144152	170176	226242	215215
18AL527	22/11/2018	962220.492	6655464.072	0	2	F	F	081101	141147	175175	218218	095097	151151	185185	216220	118126	184200	092100	144152	170176	226242	215215
17AL030	20/07/2017	961996.0958	6655239.927	1	3	M	M	081101	139147	175175	214222	093097	151151	185187	216216	118126	200206	102106	144156	184184	234234	201215
17AL033	20/07/2017	961931.8172	6655772.309	1	4	F	F	101103	141147	175175	210218	095095	151151	185185	220224	118118	184200	100106	148152	184184	226242	215215
17AL042	20/07/2017	961988.6275	6656197.248	1	4	F	F	101103	141147	175175	210218	095095	151151	185185	220224	118118	184200	100106	148152	184184	226242	215215
17AL118	16/03/2017	961893.8958	6656133.523	1	4	F	NA	101103	141147	175175	210218	095095	151151	185185	220224	118118	184200	100106	148152	184184	226242	00
17AL119	16/03/2017	961813.0091	6656082.188	0	4	F	F	101103	141147	175175	210218	095095	151151	185185	220224	118118	184200	100106	148152	184184	226242	215215
17AL120	16/03/2017	961817.3402	6656087.603	0	4	F	F	101103	141147	175175	210218	095095	151151	185185	220224	118118	184200	100106	148152	184184	226242	215215
17AL121	16/03/2017	961816.7987	6656087.801	1	4	F	F	101103	141147	175175	210218	095095	151151	185185	220224	118118	184200	100106	148152	184184	226242	215215
17AL126	16/03/2017	962071.9701	6656255.03	1	4	F	F	101103	141147	175175	210218	095095	151151	185185	220224	118118	184200	100106	148152	184184	226242	215215
17AL213	23/05/2017	962100.1412	6655707.731	1	4	F	F	101103	141147	175177	210218	095095	151151	185185	220224	118118	184200	100106	148152	184184	226242	215215
17AL224	23/05/2017	961524.2436	6655799.888	1	4	F	F	101103	141147	175175	210218	095095	151151	185185	220224	118118	184200	100106	148152	184184	226242	215215
17AL241	23/05/2017	962214.9623	6655881.509	0	4	F	F	101103	141147	175175	210218	095095	151151	185185	220224	118118	184200	100106	148152	184184	226242	215215
17AL244	23/05/2017	962238.5814	6655884.542	1	4	F	F	101103	141147	175175	210218	095095	151151	185185	220224	118118	184200	100106	144152	184184	226242	215215
18AL167	05/04/2018	961658.899	6655894.475	0	4	F	F	101103	141147	175175	210218	095095	151151	185185	220224	118118	184200	100106	148152	184184	226242	215215
18AL174	05/04/2018	961887.4894	6656133.8	0	4	F	F	101103	141147	175175	210218	095095	151151	185185	220224	118118	184200	100106	148152	184184	226242	215215
18AL314	22/11/2018	NA	NA	1	4	F	F	101103	141147	175175	210218	095095	151151	185185	220224	118118	184200	100106	148152	184184	226242	215215
19AL070	11/04/2019	962104.7853	6655439.339	1	4	F	F	101103	141147	175175	210218	095095	151151	185185	220224	118118	184200	100106	148152	184184	226242	215215
17AL039	20/07/2017	961824.3241	6655688.573	1	5	M	M	101109	147147	169175	218218	093095	151151	185185	216220	118126	184184	090100	148148	184188	226226	201215
17AL040	20/07/2017	961869.8393	6655723.689	1	5	M	M	101109	147147	169175	218218	093095	151151	185185	216220	118126	184184	090100	148148	184188	226226	201215
17AL041	20/07/2017	961907.385	6655753.01	1	5	M	M	101109	147147	169175	218218	093095	151151	185185	216220	118126	184184	090100	148148	184188	226226	201215
17AL043	20/07/2017	962092.0623	6656265.58	0	6	F	F	081081	139141	175175	206218	093093	151151	181185	216220	118126	178214	102104	148150	170192	220238	215215
17AL049	16/03/2017	962065.9878	6655341.034	1	7	F	F	081099	139143	175175	200206	093093	151151	181185	220220	118118	178184	092106	148158	186188	218234	215215
18AL047	25/01/2018	962190.9655	6655261.669	0	7	F	F	081099	139143	175175	200206	093093	151151	181185	220220	118118	178184	092106	148158	186188	218234	215215
18AL059	25/01/2018	962420.4672	6654961.527	0	7	F	F	081099	139143	175175	200206	093093	151151	181185	220220	118118	178184	092106	148158	186188	218234	215215
18AL194	05/04/2018	962403.0938	6654960.101	1	7	F	F	081099	139143	175175	200206	093093	151151	181185	220220	118118	178184	092106	148158	186188	218234	215215
18AL431	12/07/2018	962343.9043	6654978.191	0	7	F	F	081099	139143	175175	200206	093093	151151	181185	220220	118118	178184	092106	148158	186188	218234	215215
18AL432	12/07/2018	962568.5704	6655091.742	1	7	F	F	081099	139143	175175	200206	093093	151151	181185	220220	118118	178184	092106	148158	186188	218234	215215
17AL059	16/03/2017	962911.141	6655492.516	0	8	M	M	097097	139143	175175	206210	093095	151151	181181	216220	118118	184210	104104	148148	186190	234234	201215
17AL077	16/03/2017	963266.2166	6656134.664	0	9	M	M	099101	143147	175181	212218	093095	151151	185185	220220	116118	190208	090092	148148	188192	234234	201215
17AL1067	23/11/2017	963123.2767	6656016.107	0	9	M	M	099101	145147	175181	212218	093095	151151	185185	220220	116118	190208	090092	148148	188192	224234	201215

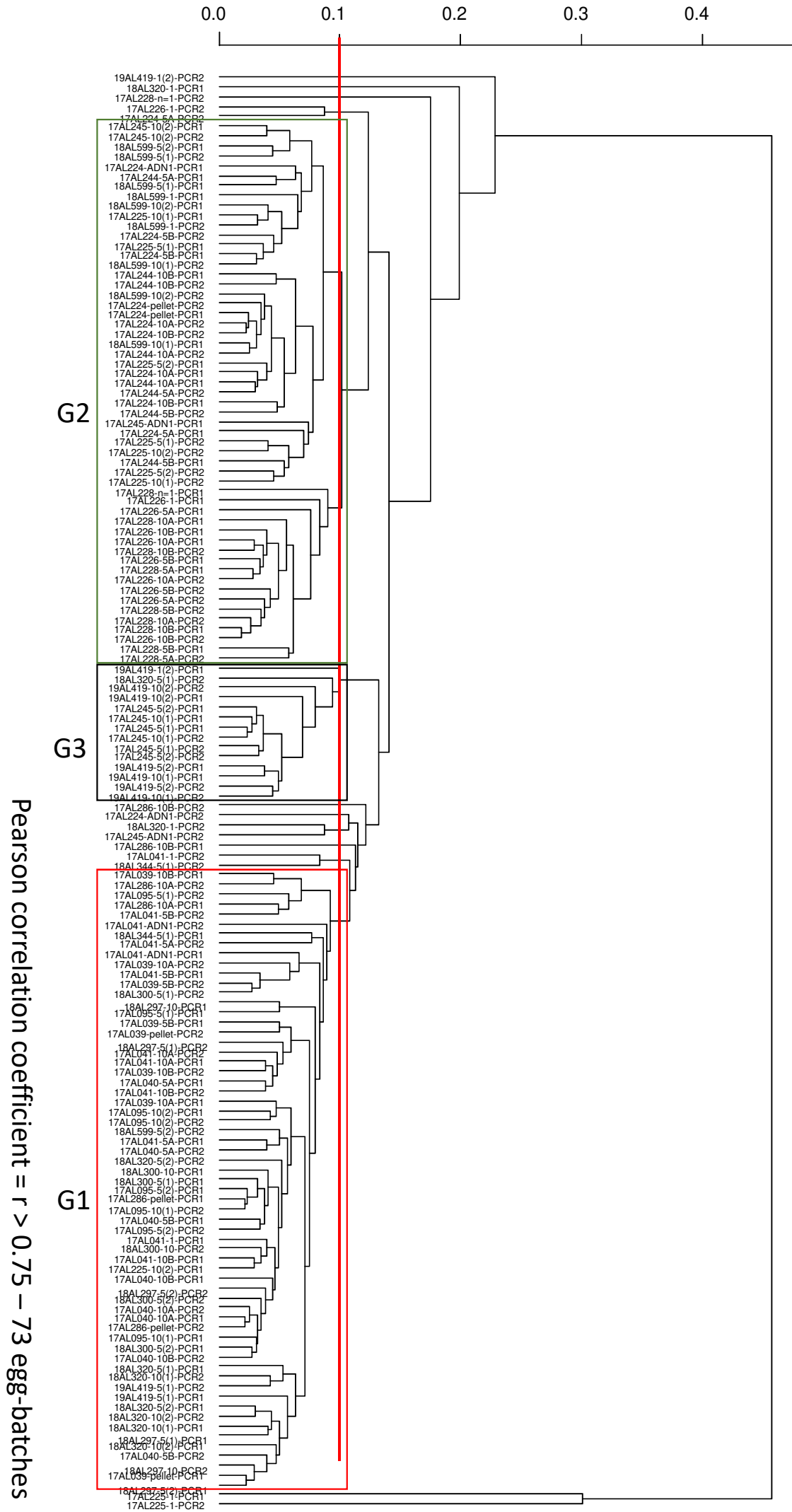
18AL166	05/04/2018	962971.9691	6656428.711	1	9	M	M	099101	145147	175181	212218	093095	151151	181185	220220	116118	190208	090092	148148	188192	234234	201215
20AL174	23/01/2020	963037.3527	6656479.16	0	9	M	M	099101	145147	175181	212218	093095	151151	181185	220220	116118	190208	090092	148148	188192	234234	201215
17AL079	16/03/2017	963006.7234	6656056.133	0	10	M	M	081099	139143	169177	212212	093095	151151	185185	220224	118118	184204	100106	146152	188192	220236	201215
17AL117	16/03/2017	962440.8199	6656021.013	0	10	M	M	081099	139143	169177	212212	093095	151151	185185	220224	118118	184204	100106	146152	188192	220236	201215
17AL265	23/05/2017	963009.2666	6656053.688	0	10	M	M	081099	139143	169177	212212	093095	151151	185185	220224	118118	184204	100106	146152	188192	220236	201215
17AL273	20/07/2017	962260.2137	6655879.04	0	10	M	M	081099	139143	169177	212212	093095	151151	185185	220224	118118	184184	100106	146152	188192	220236	201215
17AL347	15/09/2017	962100.3723	6655704.183	0	10	M	M	081099	139143	169177	212212	093095	151151	185185	220224	118118	184204	100106	146152	188192	220236	201215
18AL606	22/11/2018	962908.3463	6655975	0	10	M	M	081099	139143	169177	212212	093095	151151	185185	220224	118118	184204	100106	146152	188192	220236	201215
17AL080	16/03/2017	963004.8621	6656060.387	1	11	M	M	097103	139145	169175	212212	095095	151151	183185	220220	118128	188188	104104	142152	176184	238238	201215
17AL1006	23/11/2017	962002.482	6655703.91	0	11	M	M	097103	139145	169175	212212	095095	151151	183185	220220	118128	188188	104104	142152	176184	238238	201215
17AL263	23/05/2017	963099.2647	6656152.243	0	11	M	M	097103	139145	169175	212212	095095	151151	183185	220220	118128	188188	104104	142152	176184	238238	201215
18AL152	25/01/2018	961993.4224	6656204.239	1	11	M	M	097103	139145	169175	212212	095095	151151	183185	220220	118128	188188	104104	142152	176184	238238	201215
18AL180	05/04/2018	961817.6103	6656088.393	1	11	M	M	097103	139145	169175	212212	095095	151151	183185	220220	118128	188188	104104	142152	176184	238238	201215
17AL1027	23/11/2017	961615.2881	6654878.009	1	12	M	M	081099	141143	175175	206222	095097	151151	185187	216220	118118	204216	104106	140146	178188	220226	201215
18AL396	12/07/2018	961944.8394	6655289.163	0	12	M	M	081099	141143	169175	206222	095097	151151	185187	216220	118118	204216	104106	140146	178188	220226	201215
18AL632	22/11/2018	961922.2012	6655291.51	0	12	M	M	081099	141143	169175	206222	095097	151151	185187	216220	118118	204216	104106	140146	178188	220226	201215
17AL1031	23/11/2017	961966.4918	6655117.567	0	13	M	M	081099	139147	169181	200212	093095	151151	181185	216224	116118	174184	094102	148152	170188	220238	201215
17AL1046	23/11/2017	962569.5679	6656105.802	1	14	M	M	099109	139143	169175	212218	093095	151151	177185	216224	116118	174184	100106	148156	182192	234242	201215
17AL1055	23/11/2017	963040.2614	6656091.623	0	15	M	NA	099109	139139	177179	206208	093093	151151	181181	224224	118118	174206	102110	148148	182182	242242	00
17AL303	20/07/2017	963480.399	6656568.754	1	15	M	M	099109	139139	177179	206208	093093	151151	181181	224224	118118	174206	102110	148148	182182	238242	201215
17AL1066	23/11/2017	962410.5978	6654960.874	0	16	M	M	099103	139141	169175	200208	095095	151151	181183	216220	118118	184184	092104	144148	170178	238242	201215
17AL1138	23/11/2017	962311.5048	6655562.547	0	16	M	M	099103	139141	169175	200208	095095	151151	181183	216220	118118	184184	092104	144148	170178	238242	201215
17AL125	16/03/2017	961997.2341	6656200.626	1	17	F	F	097103	141143	175175	210214	093095	151151	185185	220220	118118	200214	104106	144152	170184	226242	215215
17AL245	23/05/2017	962480.0615	6656054.97	1	17	F	F	097103	141143	175175	210214	093095	151151	185185	220220	118118	200214	104106	144152	170184	226242	215215
17AL128	16/03/2017	962206.9284	6656298.726	1	18	F	F	081097	141143	175175	206206	095097	151151	185187	216220	118118	184184	104106	142148	184186	216226	215215
17AL132	16/03/2017	961002.5871	6655686.9	1	19	M	M	081099	141145	175177	212218	095095	151151	181187	216220	118118	184184	090100	148148	184188	216234	201215
18AL103	25/01/2018	961032.921	6655799.837	0	19	M	M	081099	141145	175177	212218	095095	151151	181187	216220	118118	184184	090100	148148	184188	216234	201215
18AL109	25/01/2018	961033.9545	6655802.328	1	19	M	M	081099	141145	175177	212218	095095	151151	181187	216220	118118	184184	090100	148148	184188	234234	201215
17AL134	16/03/2017	961269.6441	6655742.882	1	20	F	F	099101	139147	175177	206214	093093	151151	177183	216224	118126	170214	106106	148150	176192	220234	215215
17AL135	16/03/2017	961302.0835	6655739.18	0	20	F	F	099101	139147	175177	206214	093093	151151	177183	216224	118126	170214	106106	148150	176192	220234	215215
17AL136	16/03/2017	961318.6713	6655734.122	0	20	F	F	099101	139147	175177	206214	093093	151151	177183	216224	118126	170214	106106	148150	176192	220234	215215
17AL225	23/05/2017	961020.857	6655781.414	1	20	F	F	099101	139147	175177	206214	093093	151151	177183	216224	118126	170214	106106	148150	176192	220234	215215
17AL229	23/05/2017	961045.0697	6655725.324	1	20	F	F	099101	139147	175177	206214	093093	151151	177183	216224	118126	170214	106106	148150	176192	220234	215215
17AL233	23/05/2017	961431.0792	6655752.359	0	20	F	F	099101	139147	175177	206214	093093	151151	177183	216224	118126	170214	106106	148150	176192	220234	215215
17AL232	23/05/2017	961283.933	6655738.168	0	21	M	M	099101	141147	175181	218218	093095	151151	177187	220226	118118	184200	094100	148152	176192	224242	201215
17AL237	23/05/2017	961916.0131	6656153.5	1	22	M	M	081103	141147	175175	210210	095097	151151	185185	216224	118118	184206	100106	144152	184184	234234	201215
17AL267	23/05/2017	962630.2859	6655177.712	1	23	M	M	101103	139143	175177	216216	093095	151151	181185	216224	118126	182194	100110	146152	170192	220236	201215
17AL306	15/09/2017	962125.2584	6655725.282	0	23	M	M	101103	139143	175177	200216	093095	151151	181185	216224	118126	182194	100110	146152	170192	220236	201215
17AL284	20/07/2017	962680.1845	6655888.296	0	24	F	F	081101	139147	169177	212218	093095	151151	185187	220220	118126	174204	100106	146152	170192	226234	215215
17AL290	20/07/2017	962216.9755	6655455.691	0	24	F	NA	081101	139147	169177	212218	093095	151151	185187	220220	118126	174204	100106	146152	170192	226236	00
18AL010	05/04/2018	962344.4767	6654959.872	1	25	F	F	099099	139141	169175	200220	093095	151151	181181	216216	118126	200210	092100	146148	188192	218222	215215
18AL160	25/01/2018	961989.3141	6655128.458	1	25	F	F	099099	139141	169175	200220	093095	151151	181181	216216	118126	200210	092100	146148	188192	218222	215215
18AL200	05/04/2018	962397.5495	6654961.526	0	25	F	F	099099	139141	169175	200220	093095	151151	181181	216216	118126	200210	092100	146148	188192	218222	215215
19AL036	11/04/2019	961487.9911	6655113.706	0	25	F	NA	099099	139141	169175	200220	093095	151151	181181	216220	118126	200210	092100	146148	188192	218222	00
19AL046	11/04/2019	961441.8078	6654737.264	1	25	F	F	099099	139141	169175	200220	093095	151151	181181	216216	118126	200210	092100	146148	188192	218222	215215
18AL115	25/01/2018	960982.1559	6655673.56	1	26	M	M	081107	139145	175175	206218	093093	151151	181181	216216	118126	184214	104104	146150	188192	220226	201215
18AL147	25/01/2018	961042.3611	6655794.578	1	26	M	M	081107	139145	175175	206218	093093	151151	181181	216216	118126	184214	104104	146150	188192	220226	201215
19AL064	11/04/2019	961587.2882	6655799.635	0	26	M	M	081107	139145	175175	206218	093093	151151	181181	216216	118126	184214	104104	146150	188192	220226	201215

18AL146	25/01/2018	960718.0906	6655755.354	1	27	F	F	081107	139139	175177	206214	095095	151151	177183	216216	118118	170218	092106	148152	184184	216220	215215
18AL151	25/01/2018	961825.2749	6655031.693	0	28	M	M	099099	139147	169181	200212	093095	151151	181185	216220	118118	174184	094102	148152	170188	220238	201215
18AL155	25/01/2018	961580.4462	6654844.139	0	29	F	F	099103	143147	169169	210220	093097	151151	181185	220224	116118	214214	102104	148152	184186	220232	215215
18AL257	12/07/2018	962586.7097	6655813.275	0	30	F	F	081099	141143	175177	212212	093095	151151	185185	216224	118118	184184	100106	146152	188188	220242	215215
18AL259	12/07/2018	962425.3226	6655668.692	0	30	F	F	081099	141143	175177	212212	093095	151151	185185	216224	118118	184184	100106	146152	188188	220242	215215
18AL547	20/09/2018	962529.0035	6655768.059	1	30	F	F	081099	141143	175177	212212	093095	151151	185185	216224	118118	184184	100106	146152	188188	220242	215215
19AL119	11/04/2019	962488.9065	6655732.731	0	30	F	F	081099	141143	175177	212212	093095	151151	185185	216224	118118	184184	100106	146152	188188	220242	215215
19AL127	11/04/2019	962314.0575	6655575.555	1	30	F	F	081099	141143	175177	212212	093095	151151	185185	216224	118118	184184	100106	146152	188188	220242	215215
18AL320	22/11/2018	961613.4577	6655155.75	1	31	M	M	081101	141141	169177	206210	093097	151151	187187	216220	118118	170218	100104	140148	184188	226234	201215
18AL344	22/11/2018	961390.65	6655084.895	1	31	M	M	081101	141141	169177	206210	093097	151151	187187	216220	118118	170218	100104	140148	184188	226234	201215
18AL403	20/09/2018	961745.8125	6654978.754	1	31	M	M	081101	141141	169177	206210	093097	151151	187187	216220	118118	170218	100104	140148	184188	226234	201215
18AL382	12/07/2018	961619.1965	6655865.729	1	32	M	M	097103	139141	169175	210218	095095	151151	185185	220220	118118	184184	100104	142152	176184	242242	201215
18AL460	20/09/2018	962017.4694	6655721.574	1	32	M	M	097103	139141	169175	210218	095095	151151	183185	220220	118118	184184	100104	142152	176184	242242	201215
18AL587	22/11/2018	NA	NA	0	32	M	M	097103	139141	169175	210218	095095	151151	183185	220220	118118	184184	100104	142152	176184	242242	201215
18AL417	20/09/2018	961834.0063	6655035.742	0	33	F	F	081101	141147	175177	210214	093097	151151	183187	220224	118118	170184	092100	144148	184184	234242	215215
18AL575	22/11/2018	961894.7135	6655282.861	0	33	F	F	081101	141147	175177	210214	093097	151151	183187	220224	118118	170184	092100	144148	184184	234242	215215
18AL594	22/11/2018	961880.1454	6655063.659	0	33	F	F	081101	141147	175177	210214	093097	151151	183187	220224	118118	170184	092100	144148	184184	234242	215215
18AL595	22/11/2018	961872.7109	6655059.555	0	33	F	F	081101	141147	175177	210214	093097	151151	183187	220224	118118	170184	092100	144148	184184	234242	215215
18AL454	20/09/2018	962015.0864	6655720.358	1	34	F	F	101103	139141	169175	210212	095095	151151	185185	220224	118128	188200	104106	152152	184184	226236	215215
18AL481	20/09/2018	961891.8822	6655743.662	0	35	M	M	101103	139147	169175	212212	095095	151151	185185	220224	118118	184184	100104	142148	184184	224238	201215
18AL534	20/09/2018	962489.8475	6655732.105	0	36	M	M	099107	141143	175177	212216	095095	151151	185187	216224	118118	184184	092100	148152	170182	236236	201215
18AL546	20/09/2018	962640.2311	6655858.42	0	37	M	M	099107	141143	175177	212216	095095	151151	185187	216224	116118	184184	092100	148148	170182	236236	201215
18AL577	22/11/2018	961888.5725	6655277.035	1	38	M	M	081101	143147	175175	214222	097097	151151	187187	220224	118118	184216	100104	140144	184188	226234	201215
18AL598	22/11/2018	961606.9551	6654868.308	1	38	M	M	081101	143147	175175	214222	097097	151151	187187	220224	118118	184216	100104	140144	184188	226234	201215
18AL589	22/11/2018	NA	NA	1	39	M	M	097101	139147	175175	210218	095095	151151	183185	220224	118118	188200	100104	142148	176184	226238	201215
18AL599	22/11/2018	NA	NA	1	39	M	M	097101	139147	175175	210218	095095	151151	183185	220224	118118	188200	100104	142148	176184	226238	201215
19AL005	11/04/2019	961613.6421	6655156.759	0	40	M	M	099099	139147	175175	208212	095097	151151	177185	216220	118118	174184	102106	148152	170192	216238	201215
19AL136	21/05/2019	962213.0158	6655870.307	0	41	F	F	081107	139143	175177	206212	095095	151151	183185	216224	118126	184200	092100	148152	184184	224242	215215
19AL240	24/09/2019	963206.9992	6656292.379	0	42	M	M	099101	145147	175181	212218	093095	151151	185185	220220	118118	190208	090092	148148	188192	226238	201215
20AL050	23/01/2020	962189.2061	6655247.918	0	43	F	F	081099	141143	175177	212212	093097	151151	181185	216220	118118	184192	092100	146146	188194	220242	215215
20AL144	23/01/2020	962097.8353	6655452.042	0	44	F	F	097097	135135	187187	208216	097097	161161	173181	228228	116116	184184	094094	138140	168176	224224	215215
20AL187	23/01/2020	963127.3455	6656178.489	0	45	M	M	099101	143143	175177	210212	093097	151151	181185	216220	118118	184192	092100	144148	188194	220230	201215

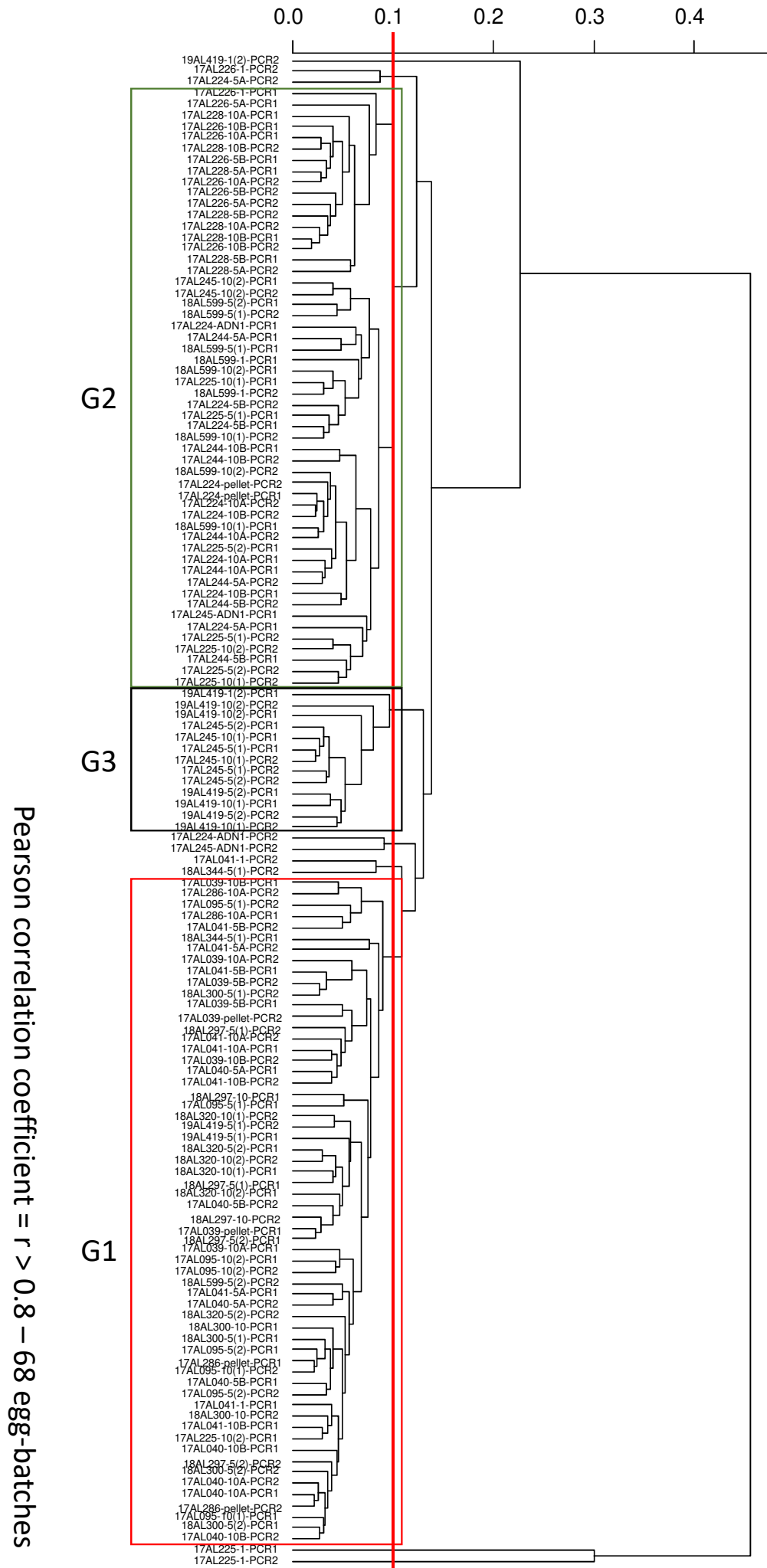
Annexe D1

Dendrograms constructed using (a) all available EmsB PCR duplicates (102 batches) and after Pearson correlation coefficient sorting (B to D).

(b)

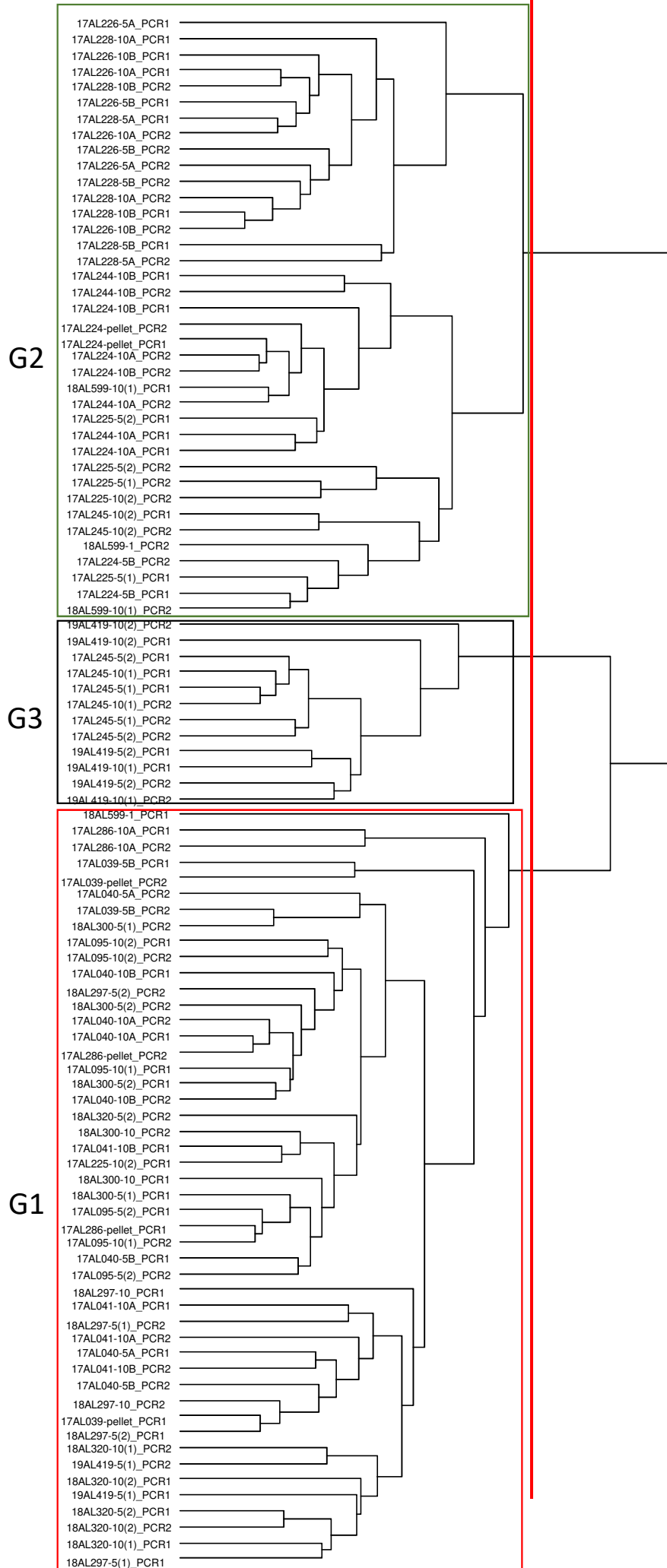


(c)



(d)

0.00 0.02 0.04 0.06 0.08 0.10 0.12 0.14



Pearson correlation coefficient = $r > 0.9$ – 49 egg-batches

Annexe D2

Table showing sample ID, egg batch collection, molecular identifications, and EmsB genotyping depending on the Pearson correlation coefficient (r) sorting.

Code_faeces	Batch code	No eggs/batch	qPCR_rn	qPCR_Alea	PCR Trachsel	Sanger typing (Ces5seq)	PCR EmsB	HCA	Pearson corr. coef. Sorting			
									r > 0.75	r > 0.8	r > 0.9	
17AL039	17AL039-1	1	35.15	31.53	Em		pos	OT	/	/	/	
	17AL039-n=1	1	34.99	31.66			pos	OT	/	/	/	
	17AL039-5A	5	30.73	32.64			pos	Gr1 ¹	/	/	/	
	17AL039-5B	5	29.10	32.22	Em		pos	Gr1	Gr1	Gr1	Gr1	
	17AL039-10A	10	30.08	32.34			pos	Gr1	Gr1	Gr1	/	
	17AL039-10B	10	27.85	32.43			pos	Gr1	Gr1	Gr1	/	
	17AL039-pellet	pellet	27.67	32.49			pos	Gr1	Gr1	Gr1	Gr1	
17AL040	17AL040-1	1	31.57	32.36	Em		pos	OT	/	/	/	
	17AL040-ADN1	1	36.04	31.55			pos	Gr3 ¹	/	/	/	
	17AL040-5A	5	28.94	32.29			pos	Gr1	Gr1	Gr1	Gr1	
	17AL040-5B	5	27.94	32.01			pos	Gr1	Gr1	Gr1	Gr1	
	17AL040-10A	10	26.08	32.40			pos	Gr1	Gr1	Gr1	Gr1	
	17AL040-10B	10	27.35	32.01			pos	Gr1	Gr1	Gr1	Gr1	
17AL041	17AL041-1	1	30.21	32.08	Em		pos	Gr1 ¹	Gr1 ¹	Gr1 ¹	/	
	17AL041-ADN1	1	32.35	31.79			pos	Gr1	Gr1	/	/	
	17AL041-5A	5	28.97	32.52			pos	Gr1	Gr1	Gr1	/	
	17AL041-5B	5	28.04	32.02			pos	Gr1	Gr1	Gr1	/	
	17AL041-10A	10	28.68	32.59			pos	Gr1	Gr1	Gr1	Gr1	
	17AL041-10B	10	27.32	32.34			pos	Gr1	Gr1	Gr1	Gr1	
17AL095	17AL095-1	1	>45	32.84	neg		neg	-	-	-	-	
	17AL095-n=1	1	33.06	31.56			pos	OT	/	/	/	
	17AL095-5(1)	5	29.11	32.03			pos	Gr1	Gr1	Gr1	/	
	17AL095-5(2)	5	27.30	32.51			pos	Gr1	Gr1	Gr1	Gr1	
	17AL095-10(1)	10	26.92	32.73		Em		pos	Gr1	Gr1	Gr1	Gr1
	17AL095-10(2)	10	26.49	32.70				pos	Gr1	Gr1	Gr1	Gr1
17AL224	17AL224-1	1	26.59	32.28			pos	Gr2 ¹	/	/	/	
	17AL224-ADN1	1	35.24	31.85			pos	Gr2 ¹	Gr2 ¹	Gr2 ¹	/	
	17AL224-5A	5	34.94	31.70			pos	Gr2 ¹	Gr2 ¹	Gr2 ¹	/	

	17AL224-5B	5	28.66	31.92			pos	Gr2	Gr2	Gr2	Gr2
	17AL224-10A	10	26.52	32.45	Em		pos	Gr2	Gr2	Gr2	Gr2
	17AL224-10B	10	27.21	32.37			pos	Gr2	Gr2	Gr2	Gr2
	17AL224-pellet	pellet	22.41	32.29			pos	Gr2	Gr2	Gr2	Gr2
17AL225	17AL225-1	1	35.33	31.66	Taenia	<i>Taenia polyacantha</i>	pos	OT	OT	OT	/
	17AL225-ADN1	1	>45	31.93	Taenia	<i>Taenia polyacantha</i>	neg	-	-	-	-
	17AL225-5(1)	5	30.29	31.68	Em/Taenia	<i>Taenia polyacantha</i>	pos	Gr2	Gr2	Gr2	Gr2
	17AL225-5(2)	5	27.33	31.97			pos	Gr2	Gr2	Gr2	Gr2
	17AL225-10(1)	10	26.50	32.60			pos	Gr2	Gr2	Gr2	/
	17AL225-10(2)	10	27.00	32.70			pos	Gr1/Gr2	Gr1/Gr2	Gr1/Gr2	Gr1/Gr2
17AL226	17AL226-1	1	32.63	32.49			pos	Gr2 ¹	Gr2 ¹	Gr2 ¹	/
	17AL226-ADN1	1	33.86	31.79			pos	OT	/	/	/
	17AL226-5A	5	27.46	32.40			pos	Gr2	Gr2	Gr2	Gr2
	17AL226-5B	5	27.27	32.23			pos	Gr2	Gr2	Gr2	Gr2
	17AL226-10A	10	25.86	32.35	Em		pos	Gr2	Gr2	Gr2	Gr2
	17AL226-10B	10	27.40	32.56			pos	Gr2	Gr2	Gr2	Gr2
17AL228	17AL228-1	1	30.03	32.23			pos	Gr2 ¹	/	/	/
	17AL228-n=1	1	33.15	31.59			pos	Gr2 ¹	Gr2 ¹	/	/
	17AL228-5A	5	33.68	32.86	Em		pos	Gr2	Gr2	Gr2	Gr2
	17AL228-5B	5	27.35	32.22			pos	Gr2	Gr2	Gr2	Gr2
	17AL228-10A	10	27.00	32.77			pos	Gr2	Gr2	Gr2	Gr2
	17AL228-10B	10	27.10	32.80			pos	Gr2	Gr2	Gr2	Gr2
17AL244	17AL244-1	1	33.80	32.46			pos	OT	/	/	/
	17AL244-ADN1	1	34.73	32.03	Em/Taenia	<i>Taenia crassiceps</i>	neg	-	-	-	-
	17AL244-5A	5	28.38	32.32			pos	Gr2	Gr2	Gr2	/
	17AL244-5B	5	29.29	32.82	Em		pos	Gr2	Gr2	Gr2	/
	17AL244-10A	10	35.20	32.46			pos	Gr2	Gr2	Gr2	Gr2
	17AL244-10B	10	26.97	31.86			pos	Gr2	Gr2	Gr2	Gr2
17AL245	17AL245-1	1	>45	32.18	Taenia	<i>Taenia polyacantha</i>	neg	-	-	-	-
	17AL245-ADN1	1	33.62	31.92			pos	Gr2 ¹	Gr2 ¹	Gr2 ¹	/

	17AL245-5(1)	5	27.31	32.92	Em		pos	Gr3	Gr3	Gr3	Gr3
	17AL245-5(2)	5	26.65	32.52			pos	Gr3	Gr3	Gr3	Gr3
	17AL245-10(1)	10	25.81	32.28			pos	Gr3	Gr3	Gr3	Gr3
	17AL245-10(2)	10	26.34	32.19			pos	Gr2	Gr2	Gr2	Gr2
17AL286	17AL286-n=1(1)	1	34.50	31.61			pos	Gr1 ¹	/	/	/
	17AL286-n=1(2)	1	35.32	31.65	Em		neg	-	-	-	-
	17AL286-5A	5	33.47	33.09			pos	OT	/	/	/
	17AL286-5B	5	30.21	31.74			pos	Gr1 ¹	/	/	/
	17AL286-10A	10	28.63	32.25	Em		pos	Gr1	Gr1	Gr1	Gr1
	17AL286-10B	10	32.78	32.92			pos	Gr1 ¹	OT	/	/
	17AL286-pellet	pellet		24.93	32.54			pos	Gr1	Gr1	Gr1
18AL297	18AL297-1	1	30.38	32.36			pos	Gr2	/	/	/
	18AL297-n=1	1	36.05	31.78			pos	OT	/	/	/
	18AL297-5(1)	5	27.99	32.17			pos	Gr1	Gr1	Gr1	Gr1
	18AL297-5(2)	5	27.68	32.11			pos	Gr1	Gr1	Gr1	Gr1
	18AL297-10	10	26.96	31.73	Em		pos	Gr1	Gr1	Gr1	Gr1
18AL300	18AL300-n=1(1)	1	32.04	31.82			pos	Gr1 ¹	/	/	/
	18AL300-n=1(2)	1	33.44	31.84	Em		pos	OT	/	/	/
	18AL300-5(1)	5	28.26	32.87			pos	Gr1	Gr1	Gr1	Gr1
	18AL300-5(2)	5	27.14	32.56	Em		pos	Gr1	Gr1	Gr1	Gr1
	18AL300-10	10	28.65	33.23			pos	Gr1	Gr1	Gr1	Gr1
18AL320	18AL320-1	1	30.99	31.99			pos	Gr1 ¹	OT	/	/
	18AL320-n=1	1	39.12	31.96	Em		neg	-	-	-	-
	18AL320-5(1)	5	29.65	32.49			pos	Gr1 ¹	Gr1/Gr3	/	/
	18AL320-5(2)	5	28.13	31.91	Em		pos	Gr1	Gr1	Gr1	Gr1
	18AL320-10(1)	10	31.10	31.78			pos	Gr1	Gr1	Gr1	Gr1
	18AL320-10(2)	10	26.28	32.01			pos	Gr1	Gr1	Gr1	Gr1
18AL344	18AL344-1	1	34.18	31.52			pos	OT	/	/	/
	18AL344-n=1	1	32.52	31.98			pos	OT	/	/	/
	18AL344-5(1)	5	29.79	32.52			pos	Gr2 ¹	Gr1 ¹	Gr1 ¹	/

	18AL344-5(2)	5	31.41	32.29			pos	OT	/	/	/
	18AL344-10(1)	10	29.35	32.60	Em		pos	OT	/	/	/
	18AL344-10(2)	10	28.49	32.12			pos	Gr1 ¹	/	/	/
18AL460	18AL460-1	1	>45	32.49	Taenia	<i>Taenia crassiceps</i>	neg	-	-	-	-
	18AL460-5(1)	5	>45	32.12	Taenia	<i>Taenia crassiceps</i>	neg	-	-	-	-
	18AL460-5(2)	5	34.56	32.26	Taenia	<i>Taenia crassiceps</i>	pos	OT	/	/	/
	18AL460-10(1)	10	>45	>45	Taenia	<i>Taenia crassiceps</i>	neg	-	-	-	-
	18AL460-10(2)	10	>45	31.79	Taenia	<i>Taenia crassiceps</i>	neg	-	-	-	-
18AL599	18AL599-1	1	36.24	32.92	Em		pos	Gr2	Gr2	Gr2	Gr1/Gr2
	18AL599-n=1	1	36.37	31.69	neg		pos	OT	/	/	/
	18AL599-5(1)	5	29.14	32.70			pos	Gr2	Gr2	Gr2	/
	18AL599-5(2)	5	29.62	32.63			pos	Gr1/Gr2	Gr1/Gr2	Gr1/Gr2	/
	18AL599-10(1)	10	27.73	32.55	Em		pos	Gr2	Gr2	Gr2	Gr2
	18AL599-10(2)	10	28.02	32.53			pos	Gr2	Gr2	Gr2	/
19AL127	19AL127-1(1)	1	33.79	32.55			pos	OT	/	/	/
	19AL127-1(2)	1	33.07	32.54			pos	OT	/	/	/
	19AL127-5	5	32.68	32.85			pos	OT	/	/	/
	19AL127-10	10	30.63	32.69	Em		pos	OT	/	/	/
19AL419	19AL419-1(1)	1	31.08	32.68			pos	Gr1 ¹	/	/	/
	19AL419-1(2)	1	30.81	32.10			pos	Gr3 ¹	Gr3 ¹	Gr3 ¹	/
	19AL419-5(1)	5	28.23	32.54			pos	Gr1	Gr1	Gr1	Gr1
	19AL419-5(2)	5	28.97	32.11			pos	Gr3	Gr3	Gr3	Gr3
	19AL419-10(1)	10	28.21	32.54	Em		pos	Gr3	Gr3	Gr3	Gr3
	19AL419-10(2)	10	29.17	33.07			pos	Gr3	Gr3	Gr3	Gr3

¹ EmsB duplicate for which only one fragment size analysis was classified in a profile, the other being classified out

Annexe E

Table showing in sequence the 50 soil-sampled rural vegetable gardens ID, surface area, number of *E. multilocularis*-positive soil samples, number of fox faeces collected, number of *E. multilocularis*-positive fox faeces, number of positive fox faeces found prior to soil sampling, number of cat faeces collected, number of positive cat faeces, number of positive cat faeces found prior to soil sampling, number of dog faeces collected and number of positive dog faeces.

ID rural vegetable gardens	Surface area (m ²)	Number <i>E. multilocularis</i> - positive soil samples	Number fox faeces	Number <i>E. multilocularis</i> - positive fox faeces	Number <i>E. multilocularis</i> - positive fox faeces prior to soil sampling	Number cat faeces	Number <i>E. multilocularis</i> - positive cat faeces	Number <i>E. multilocularis</i> - positive cat faeces prior to soil sampling	Number dog faeces	Number <i>E. multilocularis</i> - positive dog faeces
BAB01	15.6	0	4	1	1	5	0	0	0	0
BAB02	240	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BAB03	1794	0	10	4	4	4	0	0	2	0
BAB04	441	0	0	0	0	7	0	0	0	0
BAB05	74	0	0	0	0	12	0	0	0	0
BAB06	220	0	3	2	1	5	0	0	0	0
BAB07	181.5	1	3	0	0	0	0	0	0	0
BAB08	86	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BAB09	170	1	0	0	0	0	0	0	0	0
BAB10	97	0	0	0	0	4	0	0	0	0
BAB11	97	1	8	1	1	2	0	0	2	0
BAB12	84	1	0	0	0	0	0	0	2	0
BAB13	145	0	4	2	1	2	1	0	0	0
BLB01	240	1	0	0	0	4	0	0	0	0
BLB02	225	1	0	0	0	17	0	0	0	0
BLB03	194	2	0	0	0	7	0	0	0	0
BLB04	91	1	0	0	0	11	0	0	0	0
BLB05	130	0	4	0	0	2	0	0	0	0
BLB06	370.5	1	0	0	0	9	0	0	0	0
BLB08	319.5	0	4	1	1	4	0	0	3	0
BLB11	104	0	2	0	0	6	0	0	0	0
BRI01	251	0	3	0	0	5	0	0	2	0
BRI02	525	1	3	0	0	12	0	0	0	0
CR02	6160	0	4	1	1	3	0	0	2	0
GRA01	1276	0	11	1	1	17	0	0	0	0
GRA03	360	0	5	3	3	0	0	0	0	0
GRA05	179.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GRA06	84.4	1	0	0	0	0	0	0	0	0
GRA08	74.8	1	0	0	0	2	1	0	2	0
GRA09	577.5	1	3	1	1	13	0	0	0	0
GRA10	110.6	2	0	0	0	0	0	0	3	0
ILL05	8384	0	32	0	0	15	0	0	3	0
ROU02	95	0	2	0	0	2	0	0	0	0
ROU03	344	1	0	0	0	8	0	0	0	0
ROU04	88	0	3	0	0	5	0	0	0	0
ROU06	88	0	0	0	0	2	0	0	0	0
ROU10	206	3	2	0	0	14	0	0	2	0
ROU11	76	1	2	0	0	0	0	0	0	0
SF01	355	2	6	0	0	3	0	0	0	0

Titre : Etude du rôle des hôtes définitifs impliqués dans la contamination environnementale par *Echinococcus multilocularis* en zone d'endémie

Mots clés : *Echinococcus multilocularis*, fèces de carnivores, identification individuelle, copro-génotypages, contamination environnementale, persistance

L'échinococcose alvéolaire demeure une zoonose en expansion malgré l'amélioration des mesures sanitaires, le changement des habitudes alimentaires et la diminution des populations des catégories socio-économiques les plus à risque. La contamination de l'environnement par *Echinococcus multilocularis*, le parasite responsable de cette zoonose, et le risque d'infection pour l'homme dépendent de la distribution des fèces des carnivores hôtes définitifs du parasite. Cette étude visait à caractériser la contribution des renards, chiens et chats dans la contamination environnementale par *E. multilocularis* en zone d'endémie. La présence des œufs d'*E. multilocularis* a été confirmée plus significativement dans les fèces de renards. De plus, nos travaux ont démontré une hétérogénéité spatiale locale du risque d'exposition aux œufs d'*E. multilocularis* via les fèces de renards, ce qui représente un paramètre clé dans la transmission locale du parasite. Par ailleurs, l'étude de la contamination des sols de potagers par *E. multilocularis* laisse penser que les œufs du parasite pouvaient persister pendant au moins une année après la disparition des fèces porteuses du parasite.

La contribution individuelle des renards dans la contamination de l'environnement par *E. multilocularis* a été explorée par l'identification de leurs fèces par génotypage à l'aide de marqueurs microsatellites. Parmi les renards infestés, nous avons mis en évidence quelques individus (35%) ayant déposé la majorité des fèces testées positives pour *E. multilocularis* (60%). Enfin, l'identification des profils génétiques EmsB des œufs d'*E. multilocularis* isolés des fèces des hôtes suggère une transmission du parasite des renards, alors considérés comme un réservoir local du parasite, vers les chiens et chats via la prédation d'une même population locale de rongeurs. L'ensemble du travail démontre le rôle majeur du cycle sylvatique entretenu par les renards dans le maintien du cycle synanthropique du parasite. Il semble alors que les mesures de contrôle d'abondance d'*E. multilocularis* sur le terrain doivent nécessairement couvrir le territoire des renards super-propagateurs du parasite pour espérer interrompre le cycle local du parasite.

Title : Study of the role of definitive hosts involved in environmental contamination by *Echinococcus multilocularis* in endemic area

Keywords : *Echinococcus multilocularis*, carnivore faeces, individual identification, copro-genotyping, environmental contamination, persistence

Alveolar echinococcosis remains an expanding zoonosis despite improved sanitary measures, changing dietary habits and decreasing populations in the most at-risk socio-economic categories. Environmental contamination with *Echinococcus multilocularis*, the parasite responsible for this zoonosis, and the risk of infection for humans depend on the distribution of carnivore faeces, as definitive hosts of the parasite. This study aimed to characterise the contribution of foxes, dogs and cats to environmental contamination with *E. multilocularis* in endemic area. The presence of *E. multilocularis* eggs was confirmed most significantly in fox faeces. Furthermore, our studies demonstrated local spatial heterogeneity in the exposure risk to *E. multilocularis* eggs via fox faeces, which represents a key parameter in the local transmission of the parasite. In addition, investigation of soil contamination with *E. multilocularis* in vegetable gardens suggests that *E. multilocularis* eggs could persist for at least one year after the disappearance of faeces carrying the parasite.

Individual contribution of foxes to environmental contamination with *E. multilocularis* was explored by genotyping their faeces with microsatellite markers. Among infested foxes, we identified a few individuals (35%) that deposited the majority of faeces tested positive for *E. multilocularis* (60%). Finally, the identification of EmsB genetic profiles of *E. multilocularis* eggs isolated from definitive host faeces suggests transmission of the parasite from foxes, then considered as a local reservoir, to dogs and cats via predation of the local rodent population. The whole study demonstrates the major role of the sylvatic cycle perpetuated by foxes in maintaining the synanthropic cycle of the parasite. It seems then measures to control *E. multilocularis* abundance in the field must necessarily cover the territory of fox individuals that are super-spreaders for the parasite in order to succeed in interrupting the local cycle of the parasite.