

## OUTILS DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE APPLIQUES A L'EPIDEMIOLOGIE DES TRICHINELLOSES ANIMALES\*

P. Boireau<sup>1</sup>, Liu Mingyan<sup>2</sup>, Violeta Niborski<sup>1</sup>,  
T. Roman<sup>1</sup> et Isabelle Vallée<sup>1</sup>

**RESUME :** Les outils de la biologie moléculaire sont indispensables pour le suivi épidémiologique du nématode parasite *Trichinella* et cela malgré sa taille macroscopique. La distribution mondiale de *Trichinella* s'explique par le nombre d'espèces constituant le genre et leur degré variable de résistance à la température. Les techniques PCR sont très sensibles pour identifier des animaux faiblement infestés ou pour caractériser une espèce sans xénodiagnostic. Les différentes méthodes d'amplification génique permettent l'identification d'échantillons positifs qui n'auraient pas été détectés par d'autres méthodes. Ces outils sont nécessaires pour comprendre la circulation de différentes espèces de trichine dans la faune sauvage et pour comprendre l'origine de la contamination humaine.

**SUMMARY :** Despite the macroscopic size of the nematode parasite *Trichinella*, molecular tools are very useful and sensitive in epidemiological studies of trichinellosis. The worldwide distribution of *Trichinella* can be explained by the variety of species inside the genus correlated to a various degree of resistance to temperature. PCR techniques are highly sensitive techniques to identify infected animals with *Trichinella* sp and to characterize *Trichinella* species without xenodiagnosis. The various PCR strategies allows the identification of positive sample which remain undetected by other method. Such tools are necessary to follow the circulation of *Trichinella* species in wild animal and to understand the origin of human contamination.



La trichinellose est une zoonose parasitaire, dont l'agent responsable est un petit nématode d'environ 2mm de long pour 0,1mm de diamètre appartenant au genre *Trichinella*. La trichinellose a été décrite chez plus de 150 espèces de mammifères et d'oiseaux réparties sur l'ensemble de la planète [revue: Dupouy-Camet *et al.*, 1998].

La décroissance de l'incidence de la trichinellose humaine est liée à la maîtrise de l'élevage porcin de type hors sol et à la puissance des contrôles sanitaires mis en place. Le développement de l'élevage au contact de la faune sauvage ou l'insuffisance du contrôle vétérinaire (dérèglement par des conflits militaires, coût...) sont les deux causes principales de l'émergence de cette parasitose dans différentes parties du monde.

Il apparaît dans un premier temps assez contradictoire d'utiliser la finesse et la sensibilité des outils de la biologie moléculaire dans l'analyse de la diffusion de *Trichinella*, nématode parasite « macroscopique » par

rapport aux virus et bactéries. Cependant, comme nous le développerons, l'amplification de gènes ou fragments de séquences est un outil fondamental pour le typage des espèces de *Trichinella* et la compréhension des cycles parasitaires. Pendant plus d'un siècle après sa découverte et l'élucidation de son cycle, le genre *Trichinella* fut considéré comme monospécifique. Ce n'est qu'en 1992 que Pozio *et al.* ont proposé la reconnaissance de cinq espèces et trois génotypes grâce aux méthodes enzymologiques, aux critères biologiques, à la répartition géographique des espèces et plus récemment aux méthodes de biologie moléculaire (hybridation, PCR).

Nous développerons les intérêts des outils de la biologie moléculaire dans l'épidémiologie de *Trichinella* après un bref rappel de son cycle, de sa biologie et des enjeux économiques de cette parasitose. Les méthodes de diagnostic seront comparées aux outils de typage moléculaire des espèces de *Trichinella*.

\* Texte de l'exposé présenté lors de la Journée AEEMA, 17 mai 2001

<sup>1</sup> UMR BIPAR INRA-AFSSA-ENVA-Paris XII, 22 rue Pierre Curie 94700 Maisons-Alfort, France

<sup>2</sup> Quatermaster University of PLA, Changchun, RP China

## I - NOTIONS GENERALES SUR LA BIOLOGIE DE *TRICHINELLA*

### 1. RAPPEL DU CYCLE PARASITAIRE

*Trichinella* est un parasite vivipare dont le cycle parasitaire se déroule chez un seul hôte et converge étonnamment vers un cycle viral du fait de la localisation intra cytoplasmique stricte de *Trichinella*, d'une spécificité tissulaire élective (tropisme) et de son amplification chez un même hôte. Les larves infestantes L1 (L1M) sont encapsulées dans des fibres musculaires et sont libérées par la digestion chlorhydro-pepsique gastrique. Elles pénètrent dans l'épithélium intestinal où elles effectuent quatre mues en pénétrant dans la monocouche d'entérocytes avant de devenir adultes en 24-36 heures (figure 1). La fécondation et l'expulsion des larves L1 nouveau-nées (L1NN) se réalisent dans des cellules intestinales fusionnées. Ces L1NN traversent la barrière intestinale et pénètrent dans les capillaires sanguins. Elles migrent jusque dans les cellules musculaires où elles s'encapsulent en provoquant une dédifférenciation de la fibre musculaire et une néo-vascularisation. La larve L1M restera à l'état quiescent jusqu'à l'ingestion du muscle par un nouvel hôte (figure 1).

### 2. NOTION DE SPECIATION

Actuellement, le genre *Trichinella* est divisé en sept espèces (tableau I) et trois génotypes qui n'ont pas le rang d'espèce compte tenu du faible nombre d'isolats [Pozio *et al.*, 1992 ; Murrell *et al.*, 2000]. Initialement décrites d'après les seuls critères morphologiques ou enzymatiques, les espèces peuvent actuellement être différenciées en utilisant la méthode PCR [Dupouy-Camet *et al.*, 1994] ou dans certaines conditions des anticorps monoclonaux [Boireau *et al.*, 1997]. La séquence des ARN ribosomiques révèle une variation importante inter-espèces pouvant permettre une caractérisation d'isolat, mais cette méthode n'a pas été généralisée pour toutes les espèces. L'absence de critères morphologiques discriminants ou faciles à utiliser rend particulièrement attractifs les outils de la biologie moléculaire pour typer les espèces du genre *Trichinella*.

### 3. CONTEXTE ET ENJEUX ECONOMIQUES DES TRICHINELLOSES ANIMALES

La trichine a un impact en santé publique important (plus de 10 millions de contaminés dans le monde), particulièrement marqué en France [Boireau *et al.*, 2000], Italie [Pozio, 1998], Chine, Mexique du fait des habitudes alimentaires et dans tous les pays où les contrôles sanitaires sont déstabilisés par des conflits ou rendus inefficaces du fait du sous équipement (Europe

de l'Est). C'est aujourd'hui la zoonose parasitaire la plus importante en Roumanie avec une prévalence chez le porc atteignant 30% dans certaines régions [P. Patrascu, communication personnelle]. L'Homme s'infeste le plus souvent à partir de viande de porc, de sanglier ou de carnivores contaminés, ou de façon plus exceptionnelle, en France et en Italie par la consommation de viande de cheval qui fait l'objet d'un contrôle particulier [Boireau *et al.*, 2000] ;

### 4. EPIDEMIOLOGIE DE LA TRICHINELLOSE HUMAINE

La prévalence des cas cliniques est de 2/100 000 avec des pics en Chine, en Lituanie, dans certains pays de l'Est. Le taux de mortalité est de 1% (225 morts pour 24 000 cas répertoriés en Chine pendant la période 1964 à 1999). Le nombre de séropositifs est plus difficile à évaluer, mais il est au moins 1 000 fois supérieur en Chine dans la Province de Henan (séro prévalence oscillant entre 2.6 et 8.9%). La répartition mondiale du parasite, l'infestation de nombreux mammifères marsupiaux et oiseaux, permettent l'émergence constante dans toutes les parties du globe d'anadémies humaines. La maîtrise sanitaire de l'élevage de porc en Europe n'a pas pour autant permis l'éradication de la maladie humaine qui est survenue avec de nouveaux vecteurs (herbivores) en France, en Italie. Cette souplesse dans le cycle du parasite quant à sa dissémination, le caractère incurable et invalidant de la maladie dès que le parasite est encapsulé, en font un pathogène humain redouté (classe 2 dans l'échelle des pathogènes humains comme l'Echinocoque) et justifient parfaitement l'existence d'un centre OMS de référence (Rome, E. Pozio).

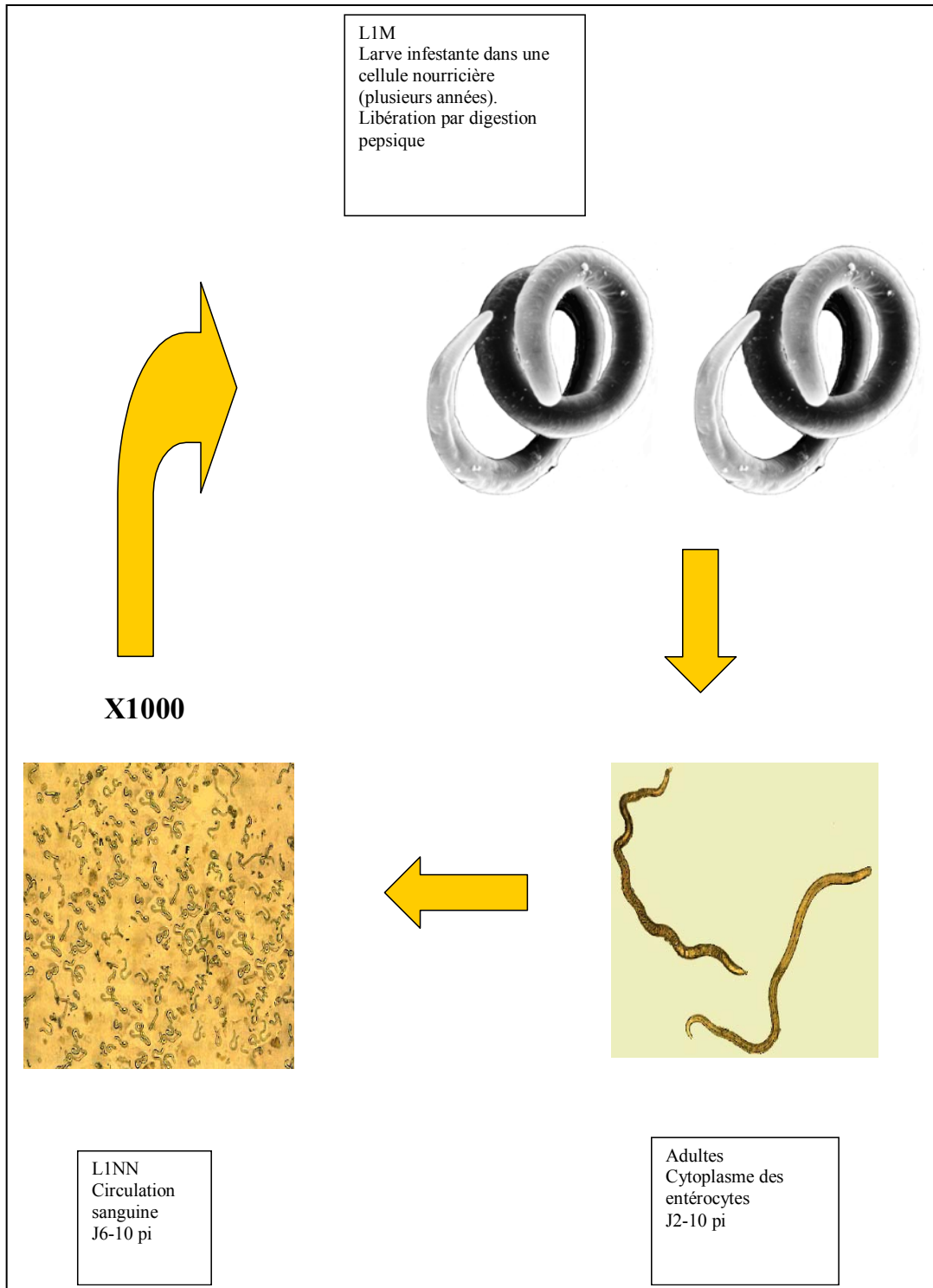
### 5. LE CONTROLE DES TRICHINELLOSES ANIMALES

Les trichinelloses animales sont diagnostiquées par un test parasitologique direct (trichinoscopie ou digestion artificielle) et, lors d'enquêtes épidémiologiques, par une sérologie (ELISA, immunofluorescence indirecte, Immunoempreinte) [Vignau *et al.*, 1999]. Les animaux infestés ne présentent pas de signe clinique. Le porc présente une tolérance exceptionnelle à l'infestation : une dose considérée comme mortelle chez l'homme de plus de 10<sup>5</sup> larves musculaires (L1M), n'altère pas l'état général de l'animal et les parasites adultes persistent dans le tube digestif pendant plus de 3 semaines suggérant une vie en quasi-symbiote de *Trichinella* chez le porc [P. Boireau, résultats non publiés].

FIGURE 1

Cycle biologique de *Trichinella*.

Les larves L1M représentent le stade infestant pouvant survivre plusieurs mois dans les muscles de son hôte avant d'être ingéré. La transformation L1 en L2, L3, L4 et adulte s'opère en quelques heures dans le cytoplasme des cellules intestinales du nouvel hôte. Les larves L1 nouveau nées (L1NN) sont émises entre J4 et J10 après l'infestation (pi). Elles pénètrent de façon élective dans les fibres musculaires striées où elles induisent une transformation de la cellule hôte en cellule nourricière. Le nouveau couple parasite-cellule hôte devient la forme résistante à l'environnement.



**TABLEAU I**  
**Génotypes de *Trichinella* et leurs principales différences**

Espèce/génotype	Aire de répartition	Hôtes	Autres caractéristiques
<i>T. spiralis</i> T.T1	Cosmopolite	Porc, animaux sauvages	Faible résistance à la congélation
<i>T. nativa</i> T.T2	Région arctique et subarctique	Faune sauvage (carnivores) sauf rat	Résistance élevée à la congélation
<i>T. britovi</i> T.T3	Région paléarctique	Animaux sauvages et domestiques en contact	Résistance modérée à la congélation
<i>T. pseudospiralis</i> T.T4	Cosmopolite	Oiseaux et mammifères	Pas de résistance à la congélation Pas de capsule
<i>T. murrelli</i> T.T5	Région néarctique	Animaux sauvages	Résistance modérée à la congélation
<i>T. nelsoni</i> T.T7	Aire équatoriale africaine, Lituanie et Ukraine	Animaux sauvages	Tolérance à des températures élevées
<i>T. papuae</i> T.T10	Nouvelle Guinée	Porc et sanglier	Pas de résistance à la congélation Pas de capsule
T.T6	Région néarctique	Animaux sauvages	Résistance élevée à la congélation
T.T8	Aire subtropicale de la région éthiopienne	Carnivores et omnivores sauvages	Résistance aux températures élevées
T.T9	Japon	Animaux sauvages	Résistance modérée à la congélation

## II - APPLICATIONS DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE DANS L'EPIDEMIOLOGIE DES TRICHINELLOSES

Un intérêt majeur de la biologie moléculaire dans le domaine de l'épidémiologie des trichinelloses animales réside dans la caractérisation rapide des espèces de trichine en cause. Les techniques d'amplification génique utilisées ne nécessitent pas un passage préalable chez l'animal de laboratoire et permettent ainsi de garder toute la diversité génétique de l'isolat proprement dit. Par ailleurs, les techniques PCR quoique nécessitant un laboratoire spécialisé sont maintenant accessibles à de nombreux laboratoires d'analyses de routine et sont beaucoup moins fastidieuses à mettre en place que les tests isoenzymatiques couramment utilisés pour le typage des parasites.

### 1. LES TESTS PCR UTILISES POUR LE TYPAGE DES ESPECES DE *TRICHINELLA*

Les techniques PCR sont hautement sensibles pour détecter des parasites monocellulaires ou typer les espèces en parasitologie [Comes *et al.*, 1996, revue]. Plusieurs protocoles ont été définis pour identifier les espèces de trichine au cours de la précédente décennie. Bandi *et al.* [1993] ont été les premiers à montrer l'utilité de la technique pour identifier des marqueurs d'espèce à partir d'une seule larve musculaire. Diverses stratégies existent actuellement pour typer les

espèces de *Trichinella* en utilisant la technique PCR et peuvent être regroupées en quatre catégories.

- Détection d'une séquence répétée de 1,6kb [Dupouy-Camet *et al.*, 1991 ; Soulé *et al.*, 1993 ; Dick *et al.*, 1992 ; Arriaga *et al.*, 1995]. Les séquences répétées parasitaires étant dispersées dans le génome, le nombre de cibles est important, augmentant ainsi la sensibilité de la technique. Cette méthode a été utilisée pour détecter des larves LIM directement dans les muscles ou pour typer certains isolats. Des différences dans la longueur des produits amplifiés permettent de séparer *T. spiralis* de *T. nelsoni*. Aucune amplification n'est obtenue avec *T. pseudospiralis*, *T. nativa* et *T. britovi*.
- Détection d'un fragment de gène. L'identification d'une espèce de trichine peut être obtenue par un profil caractéristique d'une séquence codant pour la grande sous unité ribosomique. Cette séquence présente des « délétions » de taille variable en fonction des espèces [Zarlenga et la Rosa, 2000]. La technique est simple et permet d'identifier rapidement *T. spiralis*, *T. pseudospiralis*, *T. nelsoni* et *T. papuae*. Par contre, cette technique ne différencie pas *T. britovi* de *T. nativa* et *T. murrelli*. Nagano *et al.*, 1999 ont utilisé un

fragment du gène du cytochrome C mitochondrial qui permet de produire un profil de restriction spécifique de chacune des espèces. *T. papuae* n'a pas été testée avec cette stratégie, mais *T. T9* est identifiée comme génotype séparé.

- c. Amplification aléatoire par PCR (RAPD) [Dupouy-Camet *et al.*, 1994 ; Bandi *et al.*, 1995 ; Liu Mingyuan *et al.*, 2001]. Dans les conditions opératoires, le fragment amplifié n'est pas connu puisque la séquence nucléotidique servant à l'amplification par la polymérase est courte (<10 nucléotides) multiple ou unique, mais toujours aléatoire. Cette méthode est utilisée sur des larves purifiées ou l'ADNc d'un isolat (figure 2).
- d. PCR multiplex nichée [Zarlenga *et al.*, 1999 ; Kapel *et al.*, 2001]: compte tenu de la multiplicité des espèces dans le genre *Trichinella*, un seul couple d'amorces ne permet pas d'amplifier une séquence d'une longueur caractéristique d'une espèce donnée de *Trichinella*. Il est nécessaire d'amplifier plusieurs fragments spécifiques d'une seule espèce avec des amorces différentes pour obtenir un profil type pour un des 10 génotypes de *Trichinella*. La PCR multiplex est ciblée sur le segment V (ESV) du gène de la grande sous unité ribosomique avec une combinaison de cinq oligonucléotides différents. Elle est dite nichée puisque la localisation du fragment d'ADN génomique à amplifier nécessite une amplification préalable plus vaste de la séquence génomique. Cette technique augmente de façon considérable la sensibilité et évite toute hybridation moléculaire secondaire. La PCR s'effectue dans ces conditions en deux temps. Un premier temps permet d'amplifier un grand fragment d'ADN non visible en gel d'agarose. Une seconde amplification ciblée sur une séquence interne de ce fragment permet la visualisation directe en gel d'agarose coloré par le BET de bande(s) d'ADN spécifique(s).

#### ANALYSE COMPARATIVE DES DIFFERENTES METHODES DE TYPAGE MOLECULAIRE (tableau II)

Les procédures RAPD produisent généralement un profil à bandes multiples. Le nombre élevé de bandes co-migrant à la même taille peut être utilisé comme témoin interne. Cependant, la RAPD permet l'identification d'une espèce si l'échantillon est

conservé correctement et si la larve est extraite du tissu musculaire. Cette méthodologie ne s'applique pas au typage direct dans un tissu infesté et ne sera pas opérante lors d'infestations mixtes. Wu *et al.*, 1998, ont identifié des différences de séquences nucléotidiques spécifiques d'espèce à partir de fragments amplifiés de façon aléatoire. Des oligonucléotides spécifiques de ces séquences ont été établis pour permettre une amplification ciblée spécifique d'une espèce. La longueur de ces séquences n'étant pas spécifique d'espèce, seule une cartographie de restriction secondaire permet d'établir un profil de restriction unique. Aussi, le test d'amplification multiplex développé par Zarlenga apparaît-il actuellement comme l'outil le plus simple et puissant pour typer les espèces de *Trichinella*. C'est un outil majeur pour les enquêtes épidémiologiques. Cependant, cette technique ne permettra pas l'identification de nouveau génotype d'où l'intérêt de l'utilisation en parallèle de la technique RAPD.

L'extraction de l'ADN à partir d'une pièce musculaire, la qualité de la matrice à amplifier sont des facteurs limitants importants pour le typage de *Trichinella*. Un échantillon de 1g a été utilisé par Viveros *et al.* (2001), pour détecter 2 chevaux positifs sur 90. Une autre analyse par les mêmes auteurs avait permis d'identifier 11 chevaux infestés à l'abattoir municipal de Mexico sur 80 testés. La limite de sensibilité est de 0,06L1M (7ng d'ADN génomique). La PCR apparaît comme la méthode la plus sensible assurant l'identification d'échantillons positifs non détectés par d'autres méthodes (tableau III).

#### LIMITES ACTUELLES DU TYPAGE PAR PCR

La caractérisation par PCR d'un isolat particulier au sein de l'espèce est cependant limitée. Une variation intra espèce a été mise en évidence au niveau de certains microsatellites pour l'espèce *T. pseudospiralis*, mais cette méthode n'apparaît pas généralisable actuellement aux autres espèces. Une forte homozygotie allélique existant dans le genre *Trichinella*, les techniques PCR décrites se révèlent insuffisantes pour caractériser un isolat [Liu Mingyuan *et al.*, 2001].

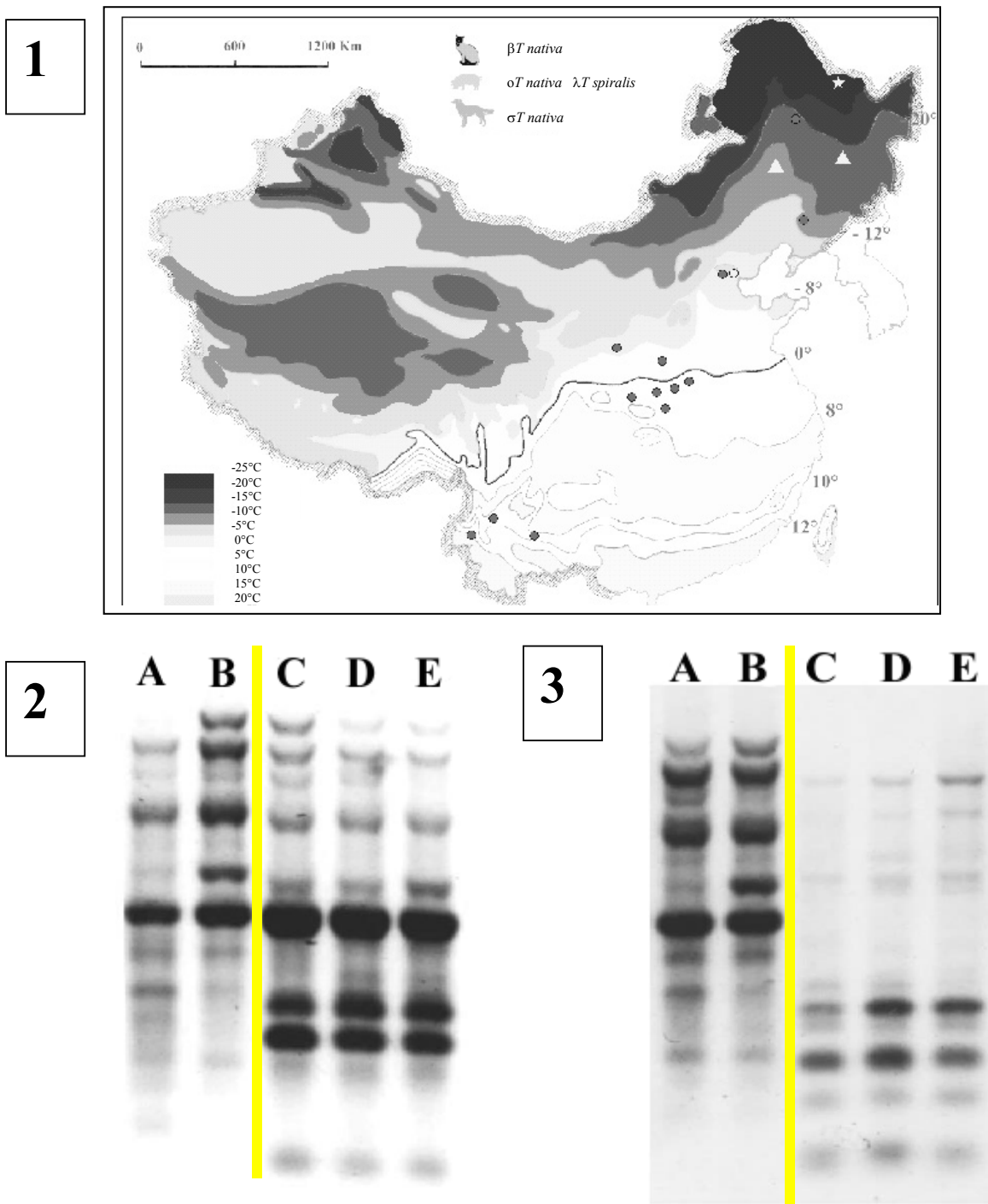
FIGURE 2

**Typages par RAPD de différents isolats de trichine obtenus à partir d'animaux domestiques en Chine.**

1 Répartition géographique des isolats analysés. Les marques rondes gris-foncé représentent les isolats de *T. spiralis*, les marques rondes gris-clair ou les triangles, ceux de *T. nativa*. La ligne continue divisant en 2 la Chine représente l'isotherme 0°C de janvier. Le gradient de température est représenté par le gradient de gris (gris foncé=très froid, clair=très chaud).

2 et 3 Analyses par RAPD de l'ADNc de différents isolats de *Trichinella* correspondant à deux espèces différentes et des stades parasitaires variés. Les analyses présentées sur les gels d'agarose 2 et 3 colorés par le BET sont obtenues avec deux amorces différentes courtes de 8 nucléotides.

A: *T. nativa* ISS 531 (Tn), stade L1M, B: Tn, pool Adultes/L1NN (Ad/l1NN), C: *T. spiralis* (souche référence française isolat ISS 406), stade L1M, D: *T. spiralis* (isolat chinois ISS 534) Ad/L1NN, E: *T. spiralis* (isolat ISS 406) Ad/L1NN.



**TABLEAU II**  
**Tests PCR utilisés pour typer les espèces du genre *Trichinella***

Nature de la PCR	Séquence cible	Source d'ADN amplifié	Profil des bandes amplifiées	Limite
PCR simple	Séquence répétée	L1M purifiée, Muscle infesté	Simple	Analyse complémentaire nécessaire (digestion enzymatique)
PCR simple	Séquence spécifique d'espèce	L1M purifiée	Simple	Analyse complémentaire nécessaire (digestion enzymatique)
PCR multiple	Séquences ITS1 et ITS2	L1M purifiée, Muscle infesté	Simple	Témoin interne à inclure, séquence de l'ADN amplifié connu
RAPD	Séquences aléatoires	L1M purifiée	Complexe	ADN amplifié de bonne qualité indispensable

**TABLEAU III**  
**Sensibilité des méthodes de diagnostic des trichinelloses animales.**

Les méthodes sérologiques indirectes sont utilisées pour les seules enquêtes épidémiologiques.  
 Le test PCR est la plus sensible de toutes les méthodes.

Nombre de larves par gramme	Techniques	Principale utilisation
3	Trichinoscopie	Diagnostic à l'abattoir sans installation spécialisée
1	Méthodes de digestion artificielle avec des échantillons mélangés (100x1g)	Méthode diagnostique de référence
0.1	Test d'immunofluorescence indirecte	Enquête épidémiologique pour des échantillons de taille limitée
0.01	Méthodes de digestion artificielle avec des échantillons mélangés (5x20g)	Méthode diagnostique de référence
0,01 à 0.001	PCR simple à PCR multiple nichée	Enquête épidémiologique pour des échantillons de taille limitée, typage
< 0.01	ELISA indirect ou ELISA indirect amplifié	Intérêt en épidémiologie pour des échantillons de grande taille (>100)

## 2. APPLICATIONS DU TYPAGE MOLECULAIRE

### 2.1. SUIVI DES SOURCES DE CONTAMINATION ET DES RESERVOIRS

Le typage des espèces infestantes en Chine (figure 2) a permis de montrer l'existence de deux cycles parasitaires. L'un fait intervenir *T. spiralis* et le porc domestique, le second les carnivores sauvages ou domestiques (canidés en particuliers) et *T. nativa* [Liu Mingyuan *et al.*, 2001]. Le cycle « domestique » est essentiellement rencontré en dessous de l'isotherme 0 de janvier alors qu'au nord de la Chine coexistent les deux cycles. Le cycle « sauvage » avec *T. nativa* semble subsister seul dans les provinces les plus nordiques où la température hivernale décroît vers –

30°C ou –40°C en hiver. La viande de carnivores est particulièrement consommée par l'homme dans ces provinces nordiques, compte tenu de l'habitus alimentaire fondé sur un potentiel pouvoir calorifique de cette viande. Ainsi, plus de 300 chiens provenant d'élevages artisanaux hautement infestés (séroprévalence atteignant 20-30%) sont consommés chaque jour à Harbin en période hivernale. L'infection élective des carnivores par *T. nativa*, sa résistance à la congélation expliquent la circulation importante de ce parasite à l'origine de contaminations humaines dans le nord de la Chine et de la Corée.

## 2.2. IDENTIFICATION D'INFESTATIONS MIXTES OU D'INFESTATIONS FAIBLES

La sensibilité des techniques PCR ne nécessitant aucune amplification préalable de l'isolat sur espèce de laboratoire permet des caractérisations directes des espèces de *Trichinella* sévissant à bas bruit ou des infestations multiples chez un même hôte. Ainsi, une étude récente a été réalisée par Kapel *et al.* [2001] en Finlande dans la faune sauvage et domestique. Cette étude était justifiée par la forte croissance de la prévalence de *Trichinella* dans les zones entourant les élevages de porc et la réintroduction de la trichinellose dans les élevages de moins de 400 têtes. Il apparaît dans le tableau IV que quatre espèces de trichine sévissent en Finlande dans la faune sauvage ou domestique. L'espèce *T. pseudospiralis* classiquement inféodée aux espèces aviaires est rencontrée chez le racoon. Ce résultat est à rapprocher d'un cas de trichinellose familiale détecté en 1998 après la consommation d'un sanglier abattu en Camargue [Ranque *et al.*, 2000]. *T. pseudospiralis* circule donc dans la faune sauvage des mammifères et des oiseaux en Europe à bas bruit et peut atteindre l'homme selon des sources variées.

Des infestations mixtes par *T. nativa* et *T. spiralis* ont été identifiées chez le racoon (tableau IV). Les infestations expérimentales ont montré que la primo-infestation par *T. spiralis* est protectrice. La contamination primitive par *T. nativa* est donc probable puisque c'est une espèce cryorésistante particulièrement bien inféodée aux carnivores et fréquente dans la région. Ce cycle peut d'ailleurs être amplifié par l'homme. Ainsi, en Sibérie dans les régions de Tvier et de Smoliensk, la prévalence très élevée de *T. nativa* chez le loup s'explique par le dépôt dans des zones de chasse de carcasses de carnivores tués et infestés [Casulli *et al.*, 2001]. *T. nativa* résistant

bien au froid sibérien hivernal pendant des mois pourra infester un nouveau carnivore au printemps si l'appât était recouvert par la glace, et assurer son amplification dans la région.

L'absence d'isolat de *T. nativa* chez le rat dans le tableau IV traduit non pas une absence de contact avec des réservoirs mais une résistance naturelle à l'infestation par *T. nativa* chez cet hôte qui doit toujours être prise en compte au regard de la sensibilité des tests PCR pour réellement interpréter un cycle épidémiologique.

## 2.3. VALEUR PRONOSTIQUE DU TYPAGE DES ESPECES DE TRICHINELLA

Lors de la dernière anadémie de trichinellose provoquée par de la viande infestée d'origine équine, le typage moléculaire de l'espèce incriminée a pu être réalisé pour la première fois pendant l'épidémie, au cours de la 4ème semaine après la période d'exposition. Or, les complications neurologiques ou cardiaques interviennent principalement entre la 4ème et la 5ème semaine après l'ingestion du parasite. Compte tenu de la charge parasitaire en cause (27 LIM/g) et de l'espèce typée par PCR (*T. spiralis*), les médecins ont été informés du risque de complications graves prévisibles. Deux cas de complications neurologiques (dont un coma de plusieurs jours) sont effectivement survenus. Récemment, un cheval d'origine serbe a pu être bloqué après réalisation du test de digestion artificielle (figure 3). L'espèce *T. spiralis* est à nouveau en cause et une enquête dans la faune sauvage a pu être mise en place dans la région d'origine du cheval. Le caractère accidentel de l'infection équine par *Trichinella* n'en demeure pas moins une énigme que le suivi moléculaire des isolats devrait nous permettre d'éclairer si des marqueurs intra espèces sont identifiables.

TABLEAU IV

Identification d'espèces de *Trichinella* chez neuf hôtes par les techniques de RAPD et d'amplification multiple [d'après Kapel *et al.*, 2001]

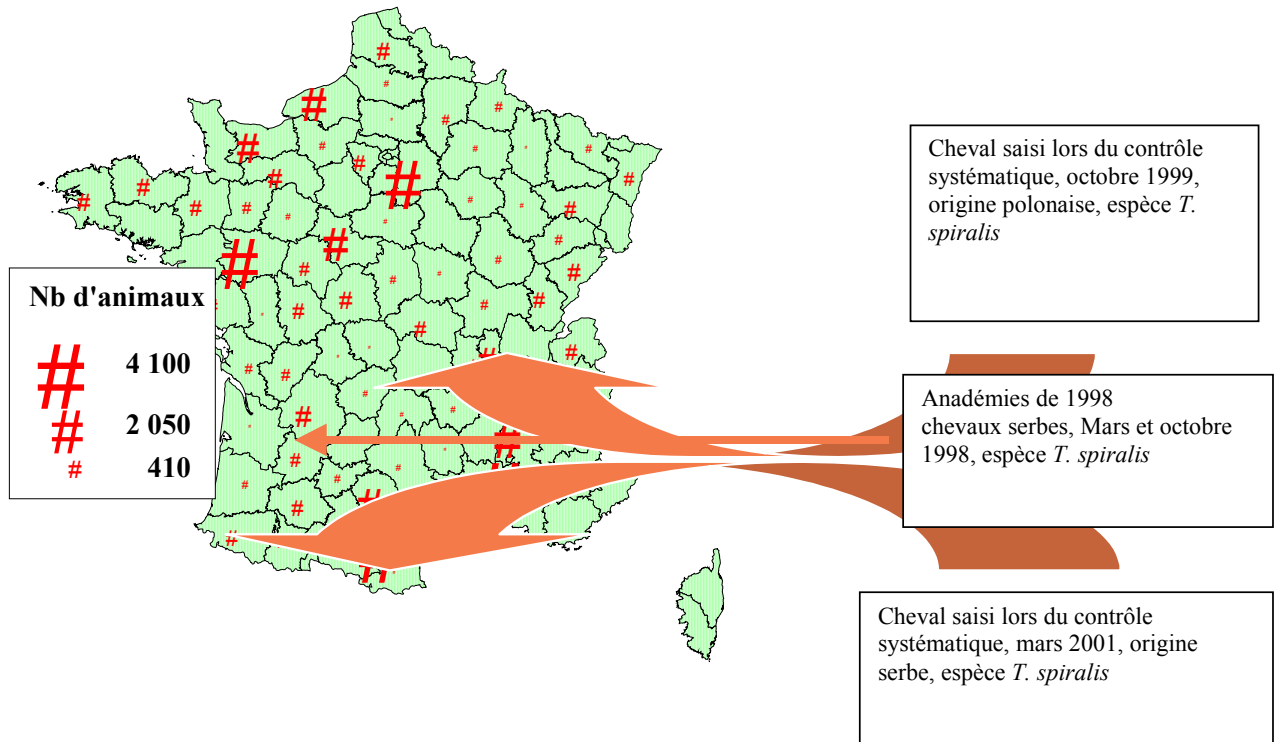
Espèces hôtes	Ours	Chat	Renard	Lynx	Rat	Sanglier	Loup	Porc	Raccoon
<i>T. spiralis</i>		+	+		+	+		+	+
<i>T. nativa</i>	+		+	+			+		+
<i>T. britovi</i>			+						
<i>T. pseudospiralis</i>									+
<i>T. spiralis</i> + <i>T. nativa</i>									+



FIGURE 3

**Localisation des lieux d'abattage et de contrôle systématique de la viande de cheval en France.**

La flèche centrale indique la localisation des anadémies récentes (1998) et les flèches courbées les abattoirs où ont été saisis pour trichinellose les chevaux infestés. La taille des ronds est proportionnelle au nombre annuel de chevaux contrôlés par la méthode de digestion artificielle.



### III - BIBLIOGRAPHIE

- Arriaga C., Yopez-Mulia L., Viveros N., Adame L.A., Zarlenga D.S., Lichtenfels J.R., Benitez E., Ortega-Pierres M.G. ~ Detection of *Trichinella spiralis* muscle larvae in naturally infected horses. *Journal of Parasitology*, 1995, **81**, 781-783.
- Bandi C., La Rosa G., Bardin M.G., Damiani G., Comincini S., Tasciotti L., Pozio E. ~ Random amplified polymorphic DNA fingerprints of the eight taxa of *Trichinella* and their comparison with allozyme analysis. *Parasitology*, 1995, **110**, 401-407.
- Bandi C., La Rosa G., Bardin M.G., Damiani G., de Carneri I., Pozio E. ~ Arbitrarily primed polymerase chain reaction of individual *Trichinella* specimens. *Journal of Parasitology*, 1993, **79**, 437-440.
- Boireau P., Vallée I., Roman T., Perret C., Fabien J.F., Liu Mingyuan, Gamble H.R., Gajadhar A. ~ Horse trichinellosis: a low frequency for a high human risk. *Vet. Parasitol.*, 2000, **93**, 309-320.
- Boireau P., Vayssier M., Fabien J.F., Perret C., Calamel M., Soulé C. ~ Antigenic analysis of LIM of *Trichinella* T1 and T5 using 40 monoclonal antibodies: characterization of eleven antigenic groups and identification of new species markers. *Parasitology*, 1997, **115**, 641-651.
- Comes A.M., Humbert J.F., Cabaret J. and Elard L. ~ Using molecular tools for diagnosis in veterinary parasitology. *Vet. Res.*, 1996, **27**, 333-42.
- Dick T.A., Lu M.C., deVos T., Ma K. ~ The use of the polymerase chain reaction to identify porcine isolates of *Trichinella*. *Journal of Parasitology*, 1992, **78**, 145-148.

- Dupouy-Camet J., Ancelle T., Fourestié V., Boireau P., Soulé C. ~ Trichinelloses. *Encycl. Méd. Chir.* (Elsevier Paris) Maladies infectieuses, 1998, 517-A-10, 11p.
- Dupouy-Camet J., Robert F., Guillou J.P., Vallet C., Perret C., Soulé C. ~ Identification of *Trichinella* isolates with random amplified polymorphic DNA markers. *Parasitol. Res.*, 1994, **80**, 358-360.
- Kapel C., Oivanen L., La Rosa G., Mikkonen T., Pozio E. ~ Evaluation of two PCR-based techniques for molecular epidemiology in Finland, a high-endemic area with four sympatric *Trichinella* species. *Parasite.*, 2001, **8**, 39-43.
- Liu Mingyuan, Zhu X.P., Xu K.C., Lu Q., Boireau P. ~ Biological and genetic characteristics of two *Trichinella* isolates in China; comparison with European species. *Parasite.*, 2001, **8**, 34-38.
- Murrell K.D., Lichtenfels R.J., Zarlenga D.S., Pozio E. ~ The systematics of the genus *Trichinella* with a key to species. *Veterinary Parasitology*, 2000, **93**, 293-307.
- Nagano I., Wu Z., Matsuo A., Pozio E., Takahashi Y. ~ Identification of *Trichinella* isolates by polymerase chain reaction--restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial cytochrome c-oxidase subunit I gene. *International Journal for Parasitology*, 1999, **29**, 1113-1120.
- Pozio E., La Rosa G., Murrell K.D., Lichtenfels J.R. ~ Taxonomic revision of the genus *Trichinella*. *J. Parasitol.*, 1992, **78**, 654-659.
- Pozio E. ~ Trichinellosis in the European Union: Epidemiology, Ecology and Economic Impact. *Parasitology Today*, 1998, **14**, 35-38.
- Pozio E., Kapel C., Gamble R. ~ Specificity and sensitivity of random amplified polymorphic DANN analysis for the identification of single larvae of *Trichinella* after experimental infection of pigs. *Parasitol. Res.*, 1999, **85**, 504-506.
- Ranque S., Faugere B., Pozio E., La Rosa G., Tamburrini A., Pellissier J.F., Brouqui P. ~ *Trichinella pseudospiralis* outbreak in France. *Emerging Infectious Diseases*, 2000, **6**, 543-547.
- Soulé C., Guillou J.P., Dupouy-Camet J., Vallet C., Pozio E. ~ Differentiation of *Trichinella* isolates by polymerase chain reaction. *Parasitology Research.*, 1993, **79**, 461-465.
- Vignau M.L., del Valle Guardis M., Risso M.A., Eiras D.F. ~ Comparison between two methods for diagnosis of trichinellosis: trichinoscopy and artificial digestion. *Vet. Res.*, 1999, **30**, 559-571.
- Viveros N., Arriaga C., Banda V., Ortega-Pierres M.G., Yopez-Mulia L. ~ Detection of *Trichinella* infection in slaughter horses by artificial digestion, ELISA and PCR. *Parasite*, 2001, **8**, in press.
- Wu Z., Nagano I., Pozio E., Takahashi Y. ~ Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) for the identification of *Trichinella* isolates. *Parasitology*, 1999, **118**, 211-218.
- Wu Z., Nagano I., Takahashi Y. ~ The detection of *Trichinella* with polymerase chain reaction (PCR) primers constructed using sequences of random amplified polymorphic DNA (RAPD) or sequences of complementary DNA encoding excretory-secretory (E-S) glycoproteins. *Parasitology*, 1998, **117**, 173-183.
- Zarlenga D.S., Aschenbrenner R.A., Lichtenfels J.R. ~ Variations in microsatellite sequences provide evidence for population differences and multiple ribosomal gene repeats within *Trichinella pseudospiralis*. *Journal of Parasitology*, 1996, **82**, 534-538.
- Zarlenga D.S., La Rosa G. ~ Molecular and biochemical methods for parasite differentiation within the genus *Trichinella*. *Veterinary Parasitology*, 2000, **93**, 279-292.

