

Université de Limoges  
École Doctorale Gay Lussac - Sciences pour l'Environnement (ED 523)  
INSERM UMR 1094  
Laboratoire de Parasitologie

Thèse pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Limoges  
Discipline / Spécialité : Parasitologie

Présentée et soutenue par  
**Abdelkrim AROUSSI**

Le 19 mai 2015

**Détection de l'ADN de *Toxoplasma gondii* et évaluation des performances  
de deux tests sérologiques dans la viande équine vendue dans  
les supermarchés en France.**

Thèse dirigée par Dr Daniel AJZENBERG

JURY :

Président du jury

Mme Marie-Laure Dardé, Professeur, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Université de Limoges

Rapporteurs

M. Pierre Marty, Professeur, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Université de Nice-Sophia Antipolis

M. Dominique Aubert, Maître de conférences, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Université de Reims Champagne-Ardenne

Examineurs

Mme Marie-Laure Dardé, Professeur, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Université de Limoges

M Daniel Ajzenberg, Maître de conférences, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Université de Limoges



*« Whenever you are asked if you can do a job, tell 'em, 'Certainly I can!' Then get busy and find out how to do it »*

*« Quand on vous demande si vous êtes capable de faire un travail répondez :  
"bien sûr, je peux !" Puis débrouillez-vous pour y arriver »*

**Theodore Roosevelt**

## Remerciements

---

*Je remercie mon directeur de thèse, Docteur Daniel AJZENBERG, et lui exprime toute ma reconnaissance pour m'avoir guidé dans ce travail.*

*Je tiens également à remercier Professeur Marie-Laure DARDÉ pour sa présence scientifique et humaine et qui m'a accueilli dans son laboratoire dès le premier jour.*

*J'adresse mes remerciements à Monsieur Le Professeur Pierre-Marie PREUX, pour l'excellent travail qu'il mène chaque jour pour la sauvegarde et le développement de notre équipe INSERM UMR 1094.*

*Je remercie sincèrement Professeur Pierre MARTY et Docteur Dominique AUBERT qui me font l'honneur de juger ce travail.*

*Je remercie chaleureusement Dr Philippe VIGNOLES et Dr François DALMAY pour leur contribution sur le plan statistique de l'étude.*

*Je tiens vivement à remercier Docteur Jitender P DUBEY qui nous a fourni le sérum de cheval positif à *T. gondii*, Docteur Joke VAN DER GIESSEN et Docteur Marieke OPSTEEGH pour l'aimable accueil dans leur institut RIVM et de m'avoir appris la technique CM-PCR. J'adresse mes remerciements également à Laurence WIMEL qui a contribué à cette étude avec les sérums de chevaux.*

*Je voudrais exprimer ma profonde gratitude et amitié à Roselyne MOUZET, Martine GATET, Homayoun RIAHI et Aurélien MERCIER pour leur contribution considérable depuis mon arrivée en Master, mais également pour leur dynamisme et enthousiasme quotidiens.*

*Je tiens à remercier Dr Jamal FATIMI, Directeur de FORMAPLUS Limoges pour son soutien financier important, sans cela je n'aurai certainement pas réalisé ma thèse. Je remercie également tous mes collègues, chacun à sa manière, a partagé ma vie au laboratoire. Je remercie également l'ensemble du personnel du service Mycologie-Parasitologie au CHU de Limoges, en particulier Muriel Matias, pour leur assistance technique et conseils avisés, ainsi que notre aimable animalier Jacques pour toutes les préparations expérimentales.*

*J'aimerais remercier mes proches, mes amis, qui m'ont accompagné durant cette période, et qui m'ont soutenu dans les moments de doutes.*

*Je remercie mon épouse, qui partage avec moi le pire et le meilleur, et pour tout le bonheur qu'on partage avec notre bout de chou.*

*Enfin, comment puis-je remercier mes chers parents qui m'ont construit avec amour et attention, élevé dans le respect et inculqué la volonté d'arriver au bout de mes intentions. Ce travail correspond à l'aboutissement d'une partie de leur éducation. Je tiens à leur exprimer toute ma gratitude et je suis extrêmement fier de les remercier pour tout cela.*



---

## Droits d'auteurs

---

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



## Table des matières

Liste des tableaux .....	- 8 -
Liste des figures.....	- 9 -
Liste d'abréviations.....	- 10 -
<b>PARTIE 1: Etude Bibliographique</b> .....	- 13 -
Introduction générale.....	- 14 -
Toxoplasmose.....	- 14 -
<i>Toxoplasma gondii</i> .....	- 15 -
Le Cycle de vie de <i>T. gondii</i> .....	- 18 -
Diversité génétique de <i>T. gondii</i> .....	- 20 -
La toxoplasmose chez les animaux .....	- 22 -
Le cheval, un hôte intermédiaire et une source d'infection humaine .....	- 23 -
Le marché de la viande de cheval.....	- 27 -
La consommation de la viande de cheval en France .....	- 28 -
<b>PARTIE 2: Etude expérimentale</b> .....	- 29 -
1. Objectif.....	- 30 -
2. Matériels et méthodes.....	- 30 -
2.1. L'échantillonnage.....	- 30 -
2.1.1. Sérums de chevaux .....	- 30 -
2.1.2. Barquettes de viandes chevalines .....	- 30 -
2.2. L'analyse moléculaire .....	- 32 -
2.2.1. Capture magnétique de l'ADN toxoplasmique (CM-PCR).....	- 32 -
2.3. L'analyse sérologique .....	- 35 -
2.3.1. MAT (Modified agglutination test).....	- 35 -
2.3.2. IFAT (immunofluorescence assay test).....	- 39 -
2.3.3. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	- 41 -
2.3.4. SFDT (Sabin Feldman Dye-test) .....	- 42 -
2.4. Bioessais chez la souris .....	- 42 -
2.5. L'analyse statistique.....	- 43 -
3. Résultats .....	- 44 -
3.1. Les données d'échantillonnage .....	- 44 -
3.2. Les résultats d'analyses des échantillons de viandes de cheval .....	- 46 -
3.3. Les résultats d'analyse des sérums de chevaux .....	- 50 -

MAT, ELISA et IFAT .....	- 50 -
3.4. Résultats des bioessais chez la souris .....	- 59 -
4. Discussion .....	- 60 -
5. Conclusion.....	- 64 -
Références bibliographiques .....	- 65 -
Annexe 1 : Résultats de l'analyse moléculaire (CM-PCR) et sérologique (MAT et ELISA) sur les échantillons de viande de cheval. ....	- 75 -
Annexe 2 : Résultats des tests sérologiques MAT, ELISA et IFAT sur les sérums de chevaux.....	- 87 -
ARTICLE ORIGINAL: Detection of <i>Toxoplasma gondii</i> DNA and performance evaluation of two serological tests in horse meat from supermarkets in France .....	- 95 -



## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Séroprévalence de <i>T. gondii</i> chez les chevaux à partir de 2007.....	- 24 -
<b>Tableau 2</b> : Cas de toxoplasmose sévères liés à la consommation de viande de cheval en France .-	26 -
<b>Tableau 3</b> : Stades d'infection des cellules TG-180.....	- 37 -
<b>Tableau 4</b> : Origine des 231 viandes chevalines et estimation de la prévalence de <i>T. gondii</i> dans la viande par rapport aux résultats de CM-PCR et des tests sérologiques MAT et ELISA (DO) en fonction du seuil utilisé. ....	- 45 -
<b>Tableau 5</b> : Mesures statistiques de la performance des tests ELISA (DO) et MAT avec différents seuils par rapport à CM-PCR pour la détection de <i>T. gondii</i> dans les échantillons de viandes chevalines. ....	- 49 -
<b>Tableau 6</b> : Estimation du meilleur seuil ELISA par rapport au MAT (MAT>0) dans les sérums de chevaux.....	- 55 -
<b>Tableau 7</b> : Estimation du meilleur seuil ELISA par rapport au MAT (MAT>1:10) dans les sérums de chevaux.....	- 55 -
<b>Tableau 8</b> : Estimation du meilleur seuil ELISA par rapport au MAT (MAT>1:20) dans les sérums de chevaux.....	- 56 -
<b>Tableau 9</b> : Estimation du meilleur seuil ELISA par rapport au MAT (MAT>1:40) dans les sérums de chevaux.....	- 56 -
<b>Tableau 10</b> : Estimation du meilleur seuil IFAT par rapport au MAT (MAT>0 et MAT>1:10) dans les sérums de chevaux.....	- 57 -
<b>Tableau 11</b> : Estimation du meilleur seuil IFAT par rapport au MAT (MAT>1:20 et MAT>1:40) dans les sérums de chevaux. ....	- 57 -
<b>Tableau 12</b> : Estimation du meilleur seuil ELISA par rapport à IFAT (IFAT>0) dans les sérums de chevaux.....	- 58 -
<b>Tableau 13</b> : Estimation du meilleur seuil ELISA par rapport à IFAT (IFAT>1:8) dans les sérums de chevaux.....	- 58 -

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Toxoplasmose cérébrale chez un patient de 36 ans atteint du VIH. ....	14 -
<b>Figure 2</b> : Lésion rétinohoroidienne chez un patient atteint de toxoplasmose oculaire. ....	15 -
<b>Figure 3</b> : Ultrastructure de <i>T. gondii</i> (tachyzoïte).. ....	16 -
<b>Figure 4</b> : Stades biologiques de <i>T. gondii</i> . ....	17 -
<b>Figure 5</b> : Cycle de vie de <i>T. gondii</i> . ....	19 -
<b>Figure 6</b> : Arbre construit par Neighbor-Joining à partir de l'analyse par microsatellites de souches de <i>T. gondii</i> . ....	21 -
<b>Figure 7</b> : Importations de la viande de chevaux destinée à la consommation par l'Union européenne en 2010. ....	28 -
<b>Figure 8</b> : Résumé des étapes de la CM-PCR. ....	34 -
<b>Figure 9</b> : Etapes chronologiques de la fabrication de l'antigène RH de <i>T. gondii</i> . ....	38 -
<b>Figure 10</b> : Représentation des réactions positives et négative lors du test MAT. ....	39 -
<b>Figure 11</b> : Illustration du complexe antigène-anticorps de l'IFAT pour la détection des anticorps de <i>T. gondii</i> chez les chevaux. ....	40 -
<b>Figure 12</b> : Analyses des courbe ROC des tests ELISA et MAT par rapport aux résultats de CM-PCR dans les échantillons de jus de viande. ....	46 -
<b>Figure 13</b> : Analyses des courbes ROC des tests ELISA par rapport aux résultats de MAT dans les sérums de chevaux. ....	51 -
<b>Figure 14</b> : Représentation des seuils ELISA ( $DO > 0,06$ , $DO > 0,1015$ , $DO > 0,1145$ et $DO > 0,15$ ) sur des dilutions en série du sérum de cheval positif THI1813. ....	52 -
<b>Figure 15</b> : Analyses des courbes ROC des tests ELISA par rapport aux résultats du test IFAT dans les sérums de chevaux. ....	53 -
<b>Figure 16</b> : Analyses des courbes ROC du test MAT par rapport aux résultats du test IFAT dans les sérums de chevaux. ....	54 -

## Liste d'abréviations

2-ME	2-mercaptoéthanol
ADN	Acide désoxyribonucléique
BABS	Bovine albumin-buffered saline
CM-PCR	Capture magnétique - polymerase chain reaction
CRB	Centre de ressources biologiques
CNR	Centre National de Référence
Ct	Cycle threshold (Seuil de cycle)
DAT	Direct agglutination test (test d'agglutination directe)
DO	Densité optique
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
ELISA	Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
FITC	Fluorescein isothiocyanate (isothiocyanate de fluorescène)
HCl	Acide chlorhydrique
IC95%	Intervalle de confiance à 95%
IFAT	Immunofluorescence antibody test (test d'immunofluorescence)
IgG	Immunoglobuline G
IgM	Immunoglobuline M
IHAT	Indirect haemagglutination test (test d'hémagglutination indirecte)
IP	Injection intrapéritonéale
LAT	Latex agglutination test (test d'agglutination au latex)
LBA	Lavage broncho-alvéolaire

LCR	Liquide céphalo-rachidien
MAT	Modified agglutination test (test d'agglutination modifié)
Mb	Mégabase
MLST	Multilocus sequence typing (typage par séquençage multilocus)
MS	Microsatellite
NaCl	Chlorure de sodium
NR	Non reporté
p.b.	Paire de base
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction (reaction en chaîne par polymerase)
p.i.	Post-inoculation
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (polymorphisme de longueur des fragments de restriction)
ROC	Receiver operating characteristic
rpm	rotation par minute
SDS	Sodium dodecyl sulfate (dodécylsulfate de sodium)
SFDT	Sabin Feldman Dye Test
SNC	Système nerveux central
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
T.C.	Toxoplasmose congénitale
Tec	Tonnes équivalent carcasse
T.O.	Toxoplasmose oculaire
Tris HCl	Trishydroxyméthylaminométhane chlorhydrique

U.E.	Union Européenne
UNG	Uracyl DNA glycosylase

# **PARTIE 1: *Etude Bibliographique***

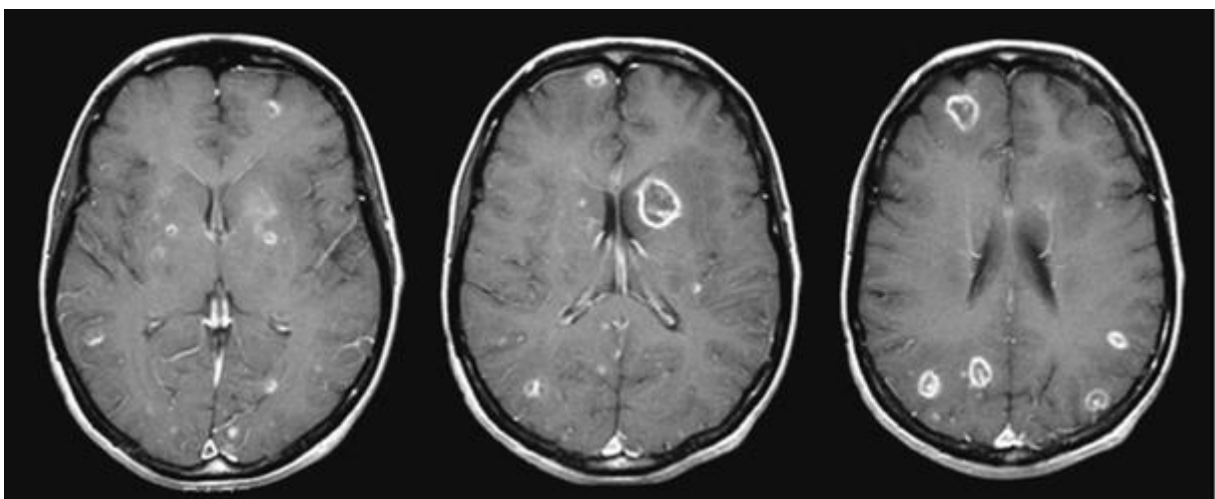
## Introduction générale

### Toxoplasmose

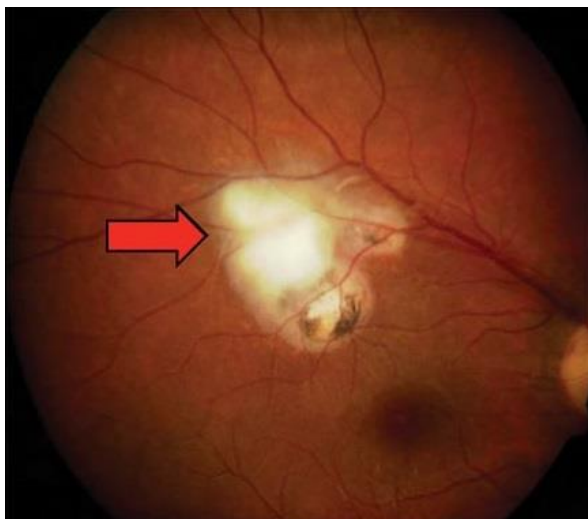
La toxoplasmose, est une zoonose causée par le protozoaire *Toxoplasma gondii*. L'infection toxoplasmique se produit le plus souvent par ingestion de viande infectée, des aliments souillés par de la terre ou par transmission congénitale de la mère au fœtus.

La toxoplasmose est généralement asymptomatique (Dupont et al., 2012), cependant, chez les personnes immunodéprimées et les fœtus infectés lors du premier trimestre de la grossesse, la maladie peut être sévère (Dupont et al., 2012). Les deux principaux organes cibles du parasite sont le cerveau et l'œil où *T. gondii* peut causer une encéphalite (Figure 1) et une rétinocoréïdite (Figure 2), respectivement.

*Toxoplasma gondii* semble être l'un des parasites les plus courants et les plus répandus dans le monde. Environ un tiers de la population humaine serait infectée (Birgisdóttir et al., 2006 ; Moncada et Montoya, 2012). Les infections chroniques, latentes chez l'homme, ont été longtemps considérées comme inoffensives, mais de nouvelles études suggèrent des associations avec des maladies neurologiques comme l'épilepsie ou psychiatriques comme la schizophrénie (Torrey et al., 2007 ; Niebuhr et al., 2008 ; Miman et al., 2010a ; Pedersen et al., 2011 ; Torrey et al., 2012 ; Flegr, 2013a ; Fabiani et al., 2015 ; Ngoungou et al., 2015).



**Figure 1** : Toxoplasmose cérébrale chez un patient de 36 ans atteint du VIH. Les lésions multiples sont mises en évidence par un balayage à résonance magnétique. Source: Fauci et al., 2008

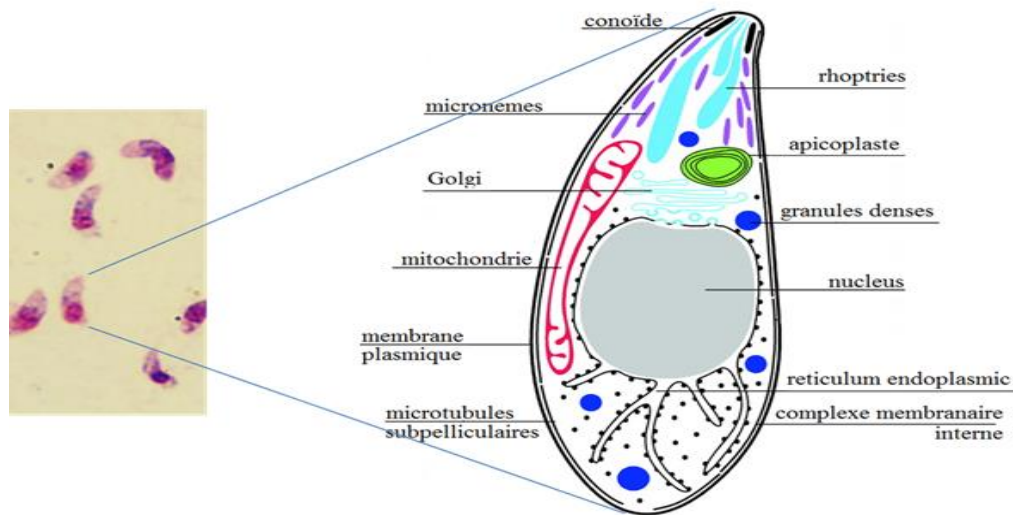


**Figure 2 :** Lésion rétinohoroïdienne chez un patient atteint de toxoplasmose oculaire. Source : Shohab et al., 2013.

### *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* est un protozoaire zoonotique ubiquiste. C'est la seule espèce décrite du genre *Toxoplasma*, appartenant à l'ordre des coccidies et le phylum des Apicomplexa. Il a été découvert en 1908 (Nicolle et Manceaux, 1908 ; Splendore, 1908) dans les tissus d'un rongeur appelé *Ctenodactylus gundi*, utilisé pour des recherches sur *Leishmania* à l'institut Pasteur de Tunis (Tunisie), mais également chez le lapin au Brésil par Splendore dans la même année. Nicolle a nommé le parasite par rapport à sa morphologie (toxos = arc et plasma = vie) (Figure 3) suivie du nom de l'hôte. Mais une erreur fût faite dans l'identification de l'hôte: son nom correct devrait être *T. gundii* (Dubey, 2008).

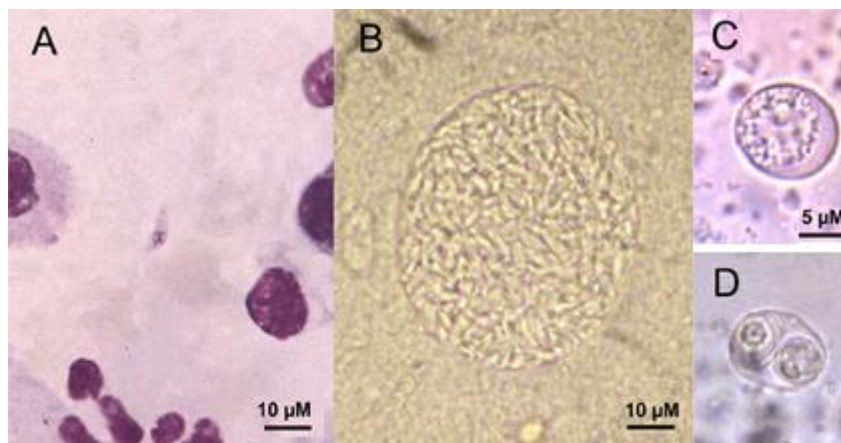




**Figure 3** : Ultrastructure de *T. gondii* (tachyzoïte). Source: Image adaptée à partir de Joiner et Roos, 2002.

*Toxoplasma gondii* est un parasite qui infecte tous les animaux sauvages et domestiques homéothermes, c'est-à-dire les mammifères et les oiseaux (Montoya et Liesenfeld, 2004). Depuis sa découverte, le parasite a été retrouvé dans différents hôtes et environnements à travers le monde (Dubey, 2010) et l'ADN de *T. gondii* a même été détecté dans des momies (Khairat et al., 2013).

*Toxoplasma gondii* est un parasite intracellulaire obligatoire des cellules nucléées (Sabin et Olitsky, 1937 ; Jones et al., 1972 ; Dubey et al., 1998) et existe sous trois formes infectieuses : tachyzoïte, bradyzoïte et sporozoïte (Figure 4). Dans la toxoplasmose aiguë, les tachyzoïtes (2 x 6  $\mu\text{m}$ ) se multiplient rapidement. La souche RH de *T. gondii* a un temps de génération estimé à environ 5 heures (Maloney et Kaufman, 1964). Les tachyzoïtes sont capables de traverser la barrière placentaire mais, en cas d'ingestion, ils sont généralement détruits dans l'estomac. Des centaines voire des milliers de bradyzoïtes (1-3 x 5-8,5  $\mu\text{m}$ ) sont enfermés dans des kystes tissulaires qui persistent de façon chronique chez les hôtes infectés. Huit sporozoïtes (2 x 6-8  $\mu\text{m}$ ) sont présents dans chaque oocyste sporulé (11 x 13  $\mu\text{m}$ ).



**Figure 4 :** Stades biologiques de *T. gondii*. Sont représentés : un tachyzoïte dans un liquide de lavage broncho-alvéolaire coloré au Giemsa (A) (Grossissement X500), un kyste contenant des bradyzoïtes dans un cerveau de souris infectée (B) (Grossissement X500) et deux oocystes à deux stades différents de maturation (C et D) (Grossissement X1000). Source : Gangneux et Dardé, 2012.

Les stades infectieux diffèrent dans leur résistance aux conditions extérieures. Les tachyzoïtes sont les plus faciles à détruire, et les conditions de l'estomac sont généralement suffisantes pour leur destruction (Dubey, 2010). La pasteurisation ou l'ébullition détruit les tachyzoïtes et les bradyzoïtes présents dans le lait. Lorsqu'ils sont placés dans un milieu de congélation optimale, les parasites cultivés en culture cellulaire peuvent être cryoconservés (Dubey, 2010).

Les kystes tissulaires de *T. gondii* peuvent être détruits par des températures égales ou supérieures à 67°C (Dubey, 2010). La cuisson dans un four à micro-ondes, le salage, le séchage, et le décapage sont également des moyens plus ou moins fiables pour détruire les kystes tissulaires (Lundén et Uggla, 1992 ; Dubey, 2010). La congélation semble détruire les kystes de *T. gondii* à -20°C pendant 54 heures, mais le parasite peut survivre dans des conditions de gel (Lundén et Uggla, 1992 ; Dubey, 2010). À + 4°C, les kystes de tissus de *T. gondii* peuvent rester viables jusqu'à 56 jours dans une solution NaCl à 0,85% (Dubey, 1997).

Les oocystes sporulés sont très résistants aux conditions environnementales (Yilmaz et Hopkins, 1972 ; Frenkel et Dubey, 1973 ; Dubey, 2010). Dans des conditions naturelles à l'extérieur, à l'ombre et exposés à une gamme de température de 5,5°C à 35,5°C, les oocystes ont survécu dans les excréments de chat à découvert pendant 2 mois et demi et presque un an dans les excréments couverts (Yilmaz et Hopkins, 1972). Des études expérimentales ont montré que les oocystes restent infectieux jusqu'à 54 mois à + 4°C et pendant quatre semaines

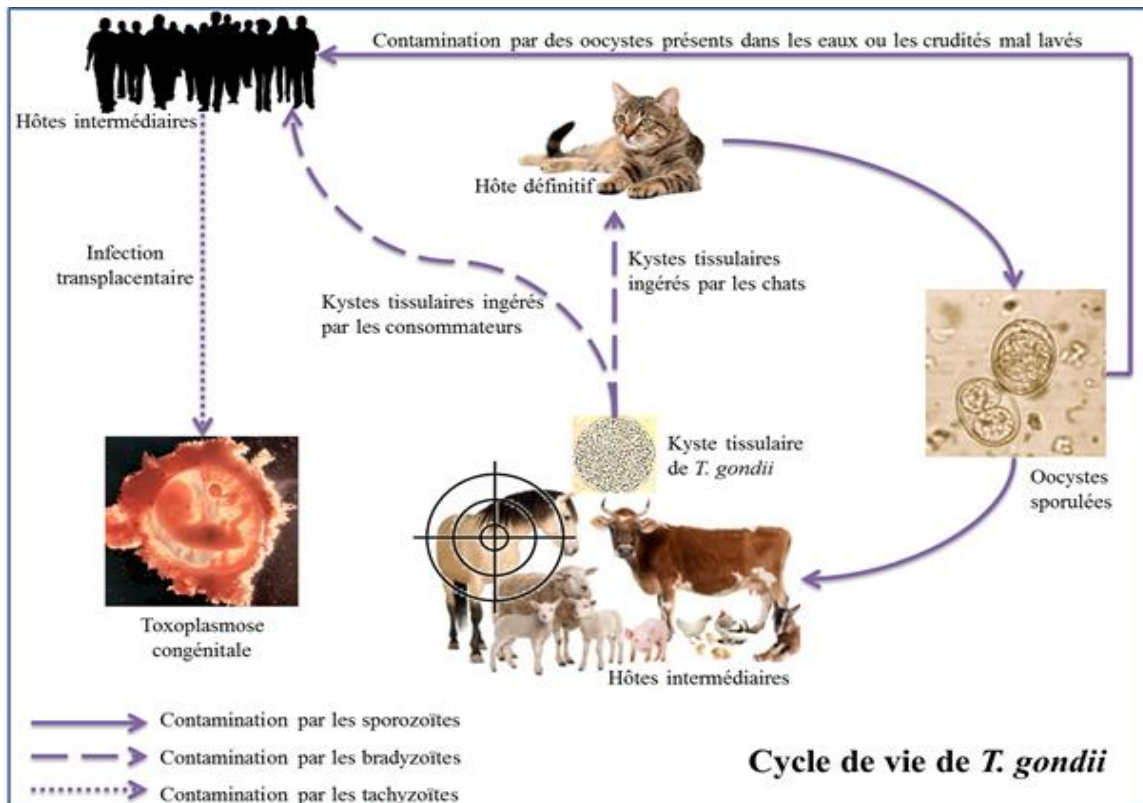
congelés à -21°C mais ils sont détruits en une minute à 60°C (Frenkel et Dubey, 1973 ; Dubey, 1998b). Une étude a montré que la proportion des oocystes survivants après 100 jours d'expérimentation a été estimée à 7,4% dans des conditions sèches et à 43,7% dans des conditions humides (Lélu et al., 2012). L'effet des désinfectants communs sur les oocystes est faible, les réactifs disponibles n'ont pas d'effet ou ont besoin d'un temps de contact long pour être efficace (Dubey, 2010).

## Le Cycle de vie de *T. gondii*

*T. gondii* est un parasite coccidien avec un cycle hétéroxène (Dubey et al., 1998). Les hôtes définitifs sont les félinés et les hôtes intermédiaires sont les mammifères et oiseaux.

*T. gondii* est transmis de diverses manières, et son cycle de vie est souvent décrit comme «complexe». Le parasite se reproduit par voie asexuée et par voie sexuée. Le carnivorisme et la transmission verticale à la progéniture sont les modes de transmission de *T. gondii* initialement découverts (Weinman et Chandler, 1954 ; Dubey, 2010). Le rôle des excréments de chat dans le cycle de vie de *T. gondii* n'a été découvert que dans les années 60-70 (Hutchison, 1965 ; Dubey et al., 1970b). L'infection peut être congénitale ou acquise par l'ingestion de kystes tissulaires ou d'oocystes. D'autres moyens d'infection par *T. gondii* ont également été reportés comme la transmission par transplantation d'organe, transfusion sanguine, accidents de laboratoire ou encore secondaires à un coup de couteau de boucher (Herwaldt 2001 ; Derouin et al., 2008). Le lait des animaux infectés peut contenir des toxoplasmes infectieux, et tout type de lait est considéré comme une source potentielle d'infection s'il n'est pas pasteurisé avant sa consommation (Fusco et al., 2007).

L'illustration typique du cycle de vie de *T. gondii* représente un hôte définitif et plusieurs hôtes intermédiaires (Figure 5). Un chat devient infecté après avoir mangé un rongeur ou un oiseau et élimine les oocystes dans ses fèces qui seront source d'infection pour les herbivores. Le parasite peut également se propager entre hôtes intermédiaires par carnivorisme (Dubey, 2009a).



**Figure 5 :** Cycle de vie de *T. gondii* adapté à partir de Dubey et Beattie, 1988. .

Du point de vue épidémiologique, le chat domestique est considéré comme l'hôte définitif le plus important (Däbritz et Conrad, 2010). Les chats s'infectent généralement par carnivore et ne nécessitent qu'un seul bradyzoïte pour devenir infectés et ensuite rejeter des millions d'ocystes trois à dix jours post-infection (Dubey, 2010). Bien que le temps estimé pour que le chat rejette des oocystes soit limité, le nombre d'ocystes produits peut varier de 3 à 810 millions d'ocystes (Dubey, 2001 ; Däbritz et Conrad, 2010). Les oocystes sporulent en un à cinq jours en fonction de l'aération et de la température. La plupart des chats rejettent les oocystes une seule fois après leur primo-infection, mais il est possible qu'ils les rejettent une seconde fois (Dubey, 2010).

Les données des études de toutes les régions du monde montrent que la majorité des infections par *T. gondii* pour différents hôtes sont chroniques (Dubey, 2010) mais il existe quelques espèces animales hautement sensibles (Brown et al., 2005). Les parasites se multiplient de façon asexuée dans les cellules de l'hôte, et les réponses immunitaires de l'hôte gardent en général le parasite sous contrôle en un équilibre presque parfait de coexistence dans l'organisme de l'hôte (Maubon et al., 2008). Les hôtes intermédiaires hébergent les kystes de *T. gondii* dans leurs tissus, sans doute pour toute leur vie, et les parasites sont

transmis à de nouveaux hôtes par carnivorisme (Jones et Dubey, 2012). Les parasites envahissent et se multiplient dans un large éventail de types de cellules, mais au final s'enkystent dans les muscles et le système nerveux central (SNC) (Dubey, 1997).

### Diversité génétique de *T. gondii*

Le génome de *T. gondii* est d'environ 65 Mb, constitué de 14 chromosomes et 8155 gènes, est légèrement plus grand que celui de *Neosporacanium*, mais est trois fois plus grand que celui de *Plasmodium falciparum* et sept fois plus grand que celui de *Cryptosporidium parvum* (Khan et al., 2007 ; Reid et al., 2012 ; TOXO DB ressources génomique *Toxoplasma*, 2015).

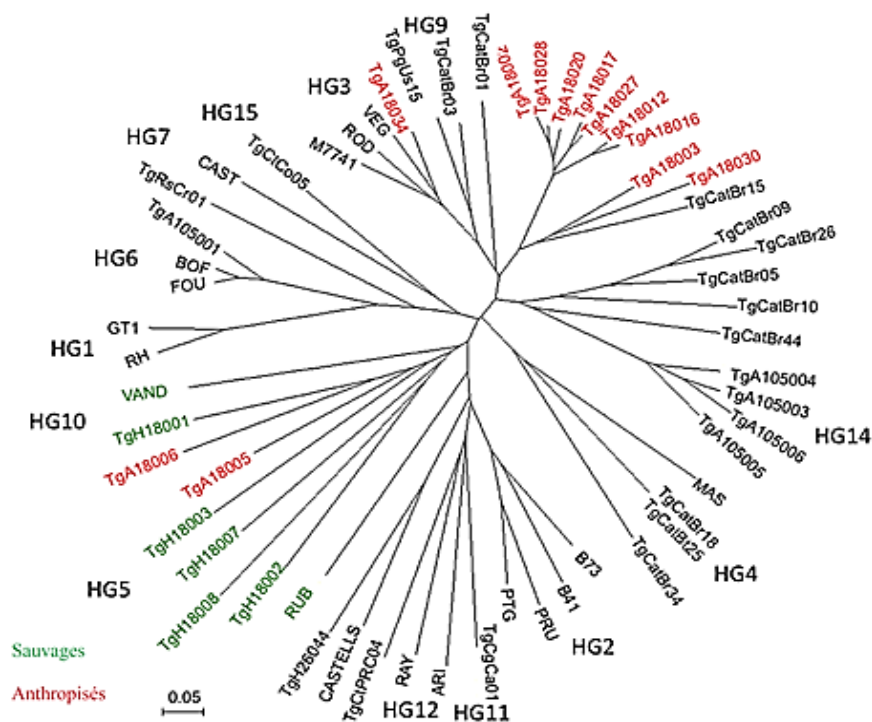
*Toxoplasma gondii* est un organisme haploïde, seul le macrogamète fécondé est diploïde. La possibilité de parthénogenèse semble exister pour la production d'oocystes en raison du faible nombre de microgamètes formés par rapport aux macrogamètes (Ferguson, 2002).

Le génotypage multilocus a révélé un polymorphisme plus ou moins important entre les souches de *T. gondii* (Ajzenberg et al., 2004 ; Aubert et al., 2010) et les méthodes moléculaires actuelles de typage sont en mesure de distinguer des isolats très proches génétiquement (Ajzenberg et al., 2010). Trois types de procédés sont largement utilisés :

1. Le typage par polymorphisme de longueur des fragments de restriction (PCR-RFLP) qui est basé sur l'analyse du polymorphisme de longueur de fragments d'ADN après amplification par PCR et digestion avec des enzymes de restriction (Su et al., 2010).
2. Le typage par microsatellites (MS) qui est basé sur l'analyse du polymorphisme de longueur de motifs de base di-nucléotidiques répétés en tandem (Ajzenberg et al., 2005, 2010).
3. Le typage par séquençage multilocus (MLST) qui est une approche basée sur le séquençage complet de plusieurs introns mais qui est coûteuse pour le criblage de grandes séries d'échantillons (Khan et al., 2007).

Les études phylogénétiques d'un grand nombre de souches en combinant ces trois méthodes ont révélé 138 génotypes distincts qui sont regroupés en 15 haplogroupes (figure 6) et en six grands clades (Su et al., 2012).

Après les 3 lignées clonales historiques (type I, II, III) décrites en Amérique du Nord et en Europe (Dardé, 1996), une quatrième lignée clonale a été décrite dans la faune sauvage en Amérique du Nord (Khan et al., 2011). Il existe d'autres lignées clonales majeures en Afrique, en Asie, au Brésil et dans la zone Caraïbes (Mercier et al., 2011). Les génotypes qui sont génétiquement divergents de ces lignées clonales sont regroupés sous la dénomination générale d'atypiques (Ajzenberg et al., 2004) et sont souvent associés à des formes cliniques plus sévères chez l'homme (De Salvador- Guillouet et al., 2006 ; Elbez-Rubinstein et al., 2009 ; Pomares et al., 2011 ; Sobanski et al., 2013).



**Figure 6 :** Arbre construit par Neighbor-Joining à partir de l'analyse par microsatellites de souches de *T. gondii*. Source : Khan et al., 2014.

## La toxoplasmose chez les animaux

Les différentes études de séroprévalences de *T. gondii* montrent que c'est une infection très répandue chez les mammifères et les oiseaux. La prévalence de *T. gondii* chez les animaux peut varier en fonction de différents facteurs comme la nature de l'alimentation des animaux, la concentration en oocystes dans l'environnement, la présence d'hôtes définitifs ou le climat. L'infection toxoplasmique chez les animaux a été reportée à maintes reprises dans la littérature, que ce soit chez des animaux sauvages ou domestiques.

En diagnostic clinique de la toxoplasmose chez le chat, l'infection par ingestion orale de kystes ou d'oocystes est le plus souvent asymptomatique mais elle peut présenter occasionnellement des troubles digestifs en relation avec la multiplication du parasite au stade asexué dans la muqueuse de l'intestin grêle. Chez les félidés sauvages, une forme grave de toxoplasmose congénitale et une méningo-encéphalite toxoplasmique ont été reportées chez le lynx roux (*Felis rufus*) (Dubey et al., 1987; Smith et al., 1995) et le parasite a même été isolé à partir des tissus de cet animal (Dubey et al., 2004b). Les oocystes excrétées par des cougars (*Felis concolor*) étaient certainement la cause d'une épidémie d'infection toxoplasmique humaine à l'île de Victoria, Colombie-Britannique, Canada. De plus, des oocystes ont été isolés à partir de fèces de cougars lors de l'investigation de cette épidémie (Aramini et al., 1998). *T. gondii* a été également isolé par bioessai chez la souris à partir d'un jaguarundi (*Puma yagouaroundi*) (Pena et al., 2011), d'un jaguar (*Panthera onca*) (Demar et al., 2008) et d'un chat des sables, appelé également chat du désert (*Felis margarita*) (Dubey et al., 2010).

Chez la chèvre et le mouton, l'infection est peu symptomatique et caractérisée par une forte prévalence de la transmission fœtale provoquant des avortements. Chez les autres espèces d'animaux de boucherie comme le porc, les bovins ou le cheval, l'infection est cliniquement inapparente ou peu symptomatique et le risque de transmission fœtale semble beaucoup plus faible que chez le mouton ou la chèvre. Chez les animaux sauvages, les manifestations cliniques sont très mal connues (Afssa, 2005).

## Le cheval, un hôte intermédiaire et une source d'infection humaine

Les chevaux, comme tous les animaux à sang chaud, peuvent être infectés par *T. gondii* et sont donc des hôtes intermédiaires. Ils restent cliniquement asymptomatiques aux infections expérimentales alors même que les doses utilisées dans les études de Al-Khalidi et al (1980) et Dubey (1985) étaient élevées ( $10^5$  et  $10^4$  oocystes respectivement) et ils sont considérés comme l'une des espèces animales les plus résistantes à développer une toxoplasmose clinique (Al-Khalidi et al., 1980). Il a été également démontré que *T. gondii* peut persister jusqu'à 476 jours dans les muscles de chevaux (Dubey, 1985). Bien que des kystes tissulaires de *T. gondii* soient isolés à partir des muscles de chevaux, il n'existe à ce jour aucun rapport confirmant une toxoplasmose symptomatique chez les chevaux.

Les études de prévalences de *T. gondii* chez les chevaux montrent une grande variabilité allant de 1% à 90%. Cette prévalence peut également varier au sein d'un même pays: 13-67% en Argentine, 14-53% en Belgique, 5-90% au Brésil, 17-80% en Italie, et 4-55% en Suisse (Tassi, 2007). Cette variabilité de la séroprévalence peut avoir des explications biologiques et épidémiologiques en lien avec l'âge des chevaux (la prévalence devant augmenter avec l'âge de l'animal car il est de plus en plus exposé à un risque d'infection toxoplasmique), leur mode de vie (élevage en plein air dans la nature ou à l'intérieur d'une structure ou d'un établissement), l'environnement (abondance des oocystes dans le sol en fonction de l'importance de la population locale des félinés) et la pratique des normes d'hygiène dans les exploitations agricoles (Tenter, 2009).

Cependant, une autre explication de la variabilité dans la séroprévalence de *T. gondii* chez les chevaux peut simplement venir de l'absence d'un test de référence pour détecter les anticorps contre *T. gondii* chez les chevaux et l'absence de validation des méthodes sérologiques utilisées dans toutes ces études. L'absence de test gold-standard est évidente du fait de la diversité des tests sérologiques utilisés dans la littérature, tels que ELISA, DAT, IFAT, IHAT, LAT, MAT et SFDT comme on peut le voir dans le tableau 1 qui synthétise les principales études de séroprévalence de *T. gondii* chez les chevaux depuis la grande revue de Tassi en 2007. Le manque de validation des tests sérologiques est manifesté de par l'utilisation de différents seuils pour un même test sans aucune donnée sur la sensibilité, spécificité, et niveaux d'accord entre tests.



**Tableau 1** : Séroprévalence de *T. gondii* chez les chevaux à partir de 2007.

<b>Pays</b>	<b>Prévalence (%)</b>	<b>Cut-off</b>	<b>Test</b>	<b>Référence</b>
<b>Corée</b>	24/816 (2,9)	NR	ELISA	Lee et al., 2014
<b>Japon</b>	0/100 (0)	1:64	LAT	Kayoko et al., 2014
<b>Portugal</b>	23/173 (13,3)	1:20	MAT	Lopes et al., 2013
<b>China</b>	81/266 (30,5)	1:64	IHA	Miao et al., 2013
<b>China</b>	178/711 (25)	1:25	MAT	Yang et al., 2013
<b>Brésil</b>	46/398 (11,6)	1:64	IFAT	Evers et al., 2013
<b>Brésil</b>	17/100 (17)	1:64	IFAT	Finger et al., 2013
<b>Mexique</b>	30/495 (6,1)	1:25	MAT	Alvarado-Esquivel et al., 2012
<b>Espagne</b>	49/454 (10,8)	1:25	MAT	Garcia-Bocanegra et al., 2012
<b>Tunisie</b>	28/158 (17,7)	1:20	MAT	Boughattas et al., 2011
<b>Costa Rica</b>	107/315 (34)	1:25	MAT	Dangoudoubiyam et al., 2011
<b>Arabie Saoudite</b>	84/266 (31,6)	1:16	SFDT	Alanazi et al., 2011
<b>Ré. Tchèque</b>	125/552 (23)	NR	LAT	Bartova et al., 2010
<b>Grèce</b>	14/753 (1,8)	NR	ELISA	Kouam et al., 2010
<b>Turquie</b>	9/125 (7,2)	1:16	SFDT	Karatepe et al., 2010
<b>Egypte</b>	25/100 (25)	NR	ELISA	Haridy et al., 2009
<b>Turquie</b>	28/100 (28)	1:16	SFDT	Guclu et al., 2007
<b>Egypte</b>	170/420 (40,5)	1:64	IFAT	Ghazy et al., 2007
	202/420 (48,1)	1:25	MAT	

Note : NR = non reporté.

L'infection des chevaux par *T. gondii* présente une importance épidémiologique majeure du fait que leurs viandes et laits sont utilisés pour la consommation humaine (Machačová et al., 2014).

En France, ce n'est pas la première fois où une certaine méfiance s'installe autour de la consommation de la viande de cheval. Depuis les années 60, des cas de trichinellose et de salmonellose liés à la viande de cheval ont conduit les autorités à mettre en place des mesures pour se protéger de ces infections comme l'interdiction d'utiliser la viande de cheval dans les restaurants de collectivités scolaires ou d'universités françaises (Circulaire interministérielle

du 6 mars 1968) ou celle de préparer, à l'avance, des viandes hachées à partir de viandes chevalines (Arrêté ministériel du 15 mai 1974) (Magras et al., 1997).

Plusieurs cas de toxoplasmose sévère dus à la consommation de viande de cheval ont été décrits en France (Pomares et al., 2011 ; Sobanski et al., 2013) (Tableau 2). Le génotypage des souches ou ADN de *T. gondii* isolés a montré un profil génétique atypique par rapport aux souches de type II et III qui circulent habituellement en Europe. Certains de ces génotypes atypiques étaient proches des génotypes qui sont communs en Amérique du Sud. Lors des investigations épidémiologiques, une seule souche (CA-CAB-EQU001) a été isolée à partir d'une viande de cheval d'origine canadienne achetée dans un supermarché à Nice en rapport avec le cas TgH 23018 (tableau 2).

La particularité de la viande de cheval consommée en France réside dans le fait que plus de 80% de cette viande est importée du continent Américain, notamment du Canada, de l'Argentine, de l'Uruguay, du Mexique et du Brésil où les souches atypiques de *T. gondii* sont beaucoup plus fréquentes qu'en Europe.

**Tableau 2 :** Cas de toxoplasmose sévères liés à la consommation de viande de cheval en France (données recueillies à partir des rapports du CNR toxoplasmose).

<b>Isolat</b>	<b>Immuno-dépression</b>	<b>Clinique</b>	<b>Anticorps détectés</b>	<b>PCR+</b>	<b>Type d'infection</b>	<b>Evolution clinique</b>
<b>TgH 20005</b>	Non	hypotonie, thrombocytopénie	IgG+ IgM+	Sang nouveau-né	réinfection T.C.	Guérison incomplète
<b>TgH 23018</b>	Non	asthénie, bronchite, fièvre	IgM+	Sang	Acquise	Mort
<b>TgH 13117</b>	Oui	fièvre, T.O.	IgG+ IgM+ IgA+	Sang, LCR	Acquise	Guérison
<b>TgH 23028</b>	Non	NR	IgG+ IgM+ IgA+	Placenta	T.C.	NR
<b>TgH 22022</b>	Non	fièvre, pneumonie, T.O.	IgG+ IgM+	LBA	Acquise	Guérison incomplète
<b>TgH 22016</b>	Non	fièvre, pneumonie, T.O., hépatite	IgG+ IgM+ IgA+	LBA, Nœud inguinal	Acquise	Guérison incomplète
<b>TgH 14011</b>	Non	Anomalie fœtale	NR	Liquide amniotique	T.C.	NR
<b>MAS</b>	NR	NR	IgM+	Placenta	T.C.	NR

LCR : liquide céphalo-rachidien ; NR : non reporté ; T.O.: toxoplasmose oculaire ; LBA : lavage broncho-alvéolaire ; T.C.: toxoplasmose congénitale.

## Le marché de la viande de cheval

Même si les échanges de la viande de cheval ne représentent que 0,3% (70,000 tonnes en 2010) des échanges mondiaux de toutes les viandes, la viande équine est toujours la viande la plus échangée dans le monde (FranceAgriMer 11, 2011). Ainsi, l'Argentine et le Canada dominent les exportations totales de viande de cheval avec 37% et 23% respectivement en 2010, suivis par le Mexique 15%, l'Uruguay 8%, la Mongolie 7%, le Brésil 5%, l'Australie 2% et d'autres pays avec 3% (FranceAgriMer 11, 2011).

Il n'existe actuellement que quatre institutions au Canada (deux au Québec et deux en Alberta), quatre en Argentine, quatre au Mexique, trois au Brésil et trois en Uruguay qui sont agréés pour l'abattage des chevaux, la production et l'exportation de viande de cheval vers l'Europe (Figure 7). L'Europe totalise 44% des importations mondiales (FranceAgriMer 11, 2011) : la Belgique (19% des importations mondiales en 2010), les Pays-Bas (10%), la France (8%) et l'Italie (4%) sont les principaux pays importateurs.

L'analyse des données d'exportations de la viande de cheval vers l'UE est complexe parce que certaines viandes sont exportées une première fois vers un pays européen, puis une deuxième fois à un autre pays européen. La Belgique joue un rôle majeur sur le marché de la viande de cheval puisqu'elle est considérée comme une plate-forme d'échange de viandes de cheval en réexportant une partie de ses importations, c'est d'ailleurs le premier pays importateur de viandes extra-européennes (15 900 tonnes en 2012). En outre, plusieurs abattoirs, y compris ceux qui sont agréés en Argentine, Canada, Brésil, Mexique et Uruguay, sont connus pour être des propriétés belges.

De l'autre côté de l'Atlantique, le débat d'abattage des chevaux aux Etats-Unis a toujours été un sujet brûlant. Pour une question d'éthique, les américains estiment que le cheval est un animal de compagnie et qu'il n'est donc pas destiné à la consommation humaine. Le dernier abattoir de chevaux américains a été fermé en 2007. Désormais, les chevaux américains migrent vers le Canada et le Mexique pour leur abattage et exportation en Europe en Asie.



**Figure 7** : Importations de la viande de chevaux destinée à la consommation par l’Union européenne en 2010. Source : Image adaptée à partir de FranceAgriMer 2011.

## La consommation de la viande de cheval en France

En France, la consommation de la viande de cheval représente seulement 0,4% par rapport aux autres viandes. Plus de 50% des ménages français se procurent la viande de cheval dans les hypermarchés et supermarchés, 25,1 % au marché et 15,6 % chez le boucher (France AgriMer, Février 2013).

La disponibilité de la viande équine en France dépend des importations. Ces dernières ont tendance à diminuer au fil des années en passant d’environ 27000 tec de viande chevaline importée en 2000 à un peu plus de 15000 tec en 2013 (FranceAgriMer, 2013). La consommation de viande de cheval chute également : elle était en moyenne de 1,7 kg / habitant / an dans les années 70 contre 0,3 kg / habitant / an au début des années 2000 (FranceAgriMer, Février 2013).

En France, comme en Italie, il est habituel de consommer la viande de cheval crue (steak tartare) ou peu cuite par rapport à certaines croyances et coutumes culinaires, ce qui rend le risque d’infection toxoplasmique plus important lors de la consommation de la viande chevaline.

## **PARTIE 2: *Etude expérimentale***

## 1. Objectif

L'objectif principal de cette étude était de détecter l'ADN de *T. gondii* par capture magnétique suivie de PCR quantitative (CM-PCR) dans la viande de cheval destinée à la consommation humaine et pour évaluer la performance des tests sérologiques MAT et ELISA dans les jus de viande de ces échantillons.

Les différentes mesures statistiques utilisées dans cette étude nous ont permis d'identifier des seuils de positivité dans les jus de viande de cheval. Ainsi, nous avons déterminé la meilleure sensibilité et spécificité pour ces tests sérologiques.

Du fait que les concentrations en anticorps sont différentes entre le jus de la viande et les sérums, nous avons également testé des sérums de chevaux avec les mêmes tests sérologiques MAT et ELISA pour vérifier si les seuils que nous avons identifiés dans les échantillons de viande de cheval peuvent également être utilisés dans les sérums de chevaux.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. L'échantillonnage

#### 2.1.1. Sérums de chevaux

Notre étude a été menée en deux phases. Tout d'abord, au mois de Février 2012, Laurence Wimel a prélevé 196 sérums de chevaux de l'institut français du cheval et de l'équitation, 19370 Chamberet, France. L'âge des chevaux variait entre 1 et 21 ans et plus de 70% avaient plus de 3 ans au moment de la prise de sang.

**Sérum de cheval positif :** Un échantillon de sérum positif (THI1813) d'un poney infecté expérimentalement en 1985 avec des oocystes de *T. gondii* nous a été aimablement fourni par le Dr JP Dubey, Beltsville, MD, Etats-Unis. Le titre MAT de cet échantillon été positif au 1:65536 à la 18<sup>ème</sup> semaine post-infection (Dubey, 1985). Cet échantillon a été titré avec le test MAT à la dilution de 1:102400 dès sa réception dans notre laboratoire le 16 mai 2014.

#### 2.1.2. Barquettes de viandes chevalines

Dans un second temps, 231 échantillons de viandes chevalines destinées à la consommation humaine ont été achetés dans différents supermarchés en France (annexe).

Les données de la littérature sur la prévalence de *T. gondii* chez les chevaux n'étant pas fiables du fait de l'absence de validation des tests sérologiques utilisés, nous avons décidé de calculer la taille d'échantillon requise pour notre étude sur la base d'une prévalence préliminaire après analyse parCM-PCR de 50 viandes de chevaux. Cette prévalence préliminaire estimée à 41% [IC95%, 31,87%-50,80%] nous a permis de calculer à 227 le nombre d'échantillons de viande de cheval nécessaire pour notre étude selon la formule suivante:

$$n = [t^2 \times p(1-p)] / m^2 \text{ où:}$$

**n** = taille d'échantillon requise

**t** = niveau de confiance à 95% (valeur type de 1,96)

**p** =prévalence estimative de *T. gondii* chez les chevaux

**m** = marge d'erreur à 5% (valeur type de 0,05)

Les échantillons de viandes de chevaux étaient recueillis principalement dans des barquettes vendues dans les grandes surfaces (Hyper-U, Carrefour, E-Leclerc, Cora, Auchan). Les viandes ont été achetées de Novembre 2012 à Avril 2014 dans différentes villes en France (Angoulême, Argentan, Aurillac, Bordeaux, Brive-La-Gaillarde, Caen, Cahors, Châteauroux, Clermont-Ferrand, Ermont, Le Mans, Limoges, Paris, Perpignan, Poitiers, Toulouse, Tours, Tulle). Au vu de la difficulté de l'échantillonnage, une grande partie de viandes chevaline a été achetée dans la région limousine. Au moins 150 grammes par échantillon de viande de cheval ont été nécessaires pour effectuer tous les tests (50 grammes pour les bioessais et 100 grammes pour CM-PCR). Le numéro de lot, l'origine géographique, les dates d'abattage, d'emballage et d'expiration des viandes ont été recueillies pour tous les échantillons de viande de cheval, mais malheureusement, certaines de ces données n'étaient pas toujours disponibles (modalité « inconnu » dans l'Annexe 1).

Les échantillons de viandes de chevaux ont été analysés aussi tôt que possible afin de maximiser la viabilité de *T. gondii* qui pourrait être présent dans les muscles. Les jus des



viandes ont été récupérés directement ou obtenus après une étape de congélation / décongélation, ce qui permet aux muscles de libérer le jus, puis stockés à -20 ° C avant de réaliser les tests sérologiques.

## 2.2. L'analyse moléculaire

### 2.2.1. Capture magnétique de l'ADN toxoplasmique (CM-PCR)

Afin de détecter l'ADN toxoplasmique dans les échantillons de viande de cheval, la technique de capture magnétique de l'ADN de *T. gondii* a été réalisée comme elle a été décrite par Marieke Opsteegh (Opsteegh et al., 2010).

100 g de viande de cheval de chaque échantillon a été préparé en enlevant les tissus adipeux, la viande a été découpée en cubes de 1 cm<sup>3</sup> et 250 ml d'une solution de digestion contenant 100 mM Tris HCl pH = 8, EDTA 5 mM, 0,2% de SDS, 200 mM de NaCl et 500 µl de protéinase K (Qiagen réf: 19133) ont été ajoutés aux 100 g de viande découpée dans un sac à filtre (réf : BA6041 STR, Seward, UK).

Les sacs ont été ensuite placés dans le stomacher-400 (Seward, UK) pendant 2 minutes à vitesse maximale. Cet appareil est un instrument d'homogénéisation dans lequel l'échantillon est mélangé dans une poche jetable. Il agit sur la poche comme un estomac, d'où le nom de stomacher®.

La digestion a été effectuée à 55°C pendant toute la nuit. Ensuite, les sacs ont été à nouveau placés dans le stomacher pendant 1 minute à vitesse maximale pour homogénéiser le produit de digestion. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 3500 x g pendant 45 min, et 12 ml du surnageant ont été prélevés et chauffés à 100°C pendant 10 minutes pour inactiver la protéinase K.

Pour chaque échantillon, la biotine, appelée également vitamine B8 et possède une forte affinité de liaison avec la streptavidine (protéine tétramérique de 52800 Da, purifiée à partir de la bactérie *Streptomyces avidinii*), elle a été éliminée par incubation avec 50 µl de streptavidine-sepharose (capacité d'union de 300 nmol / mL de biotine; Fisher Sci réf: W7358B). Après 45 min d'incubation à température ambiante sur un agitateur rotatif (Stuart

®) à 10 rpm (tours par minute), trois lavages ont permis d'éliminer la streptavidine-sepharose (contenant la biotine du lysat piégée) par centrifugation à 3500 x g pendant 15 min.

La capture de l'ADN toxoplasmique a été effectuée en utilisant des billes magnétiques recouvertes de streptavidine (Dynabeads M-270 Streptavidin, Invitrogen) et des amorces marquées à la biotine :

Tox-Cap-F:5'biotine-TEG-

cttgagccacagaagggacagaagtcgaaggggactacagacgcgatgccgctctccagccgtcttgg 3'

Tox-Cap-R:5'biotine-TEG-

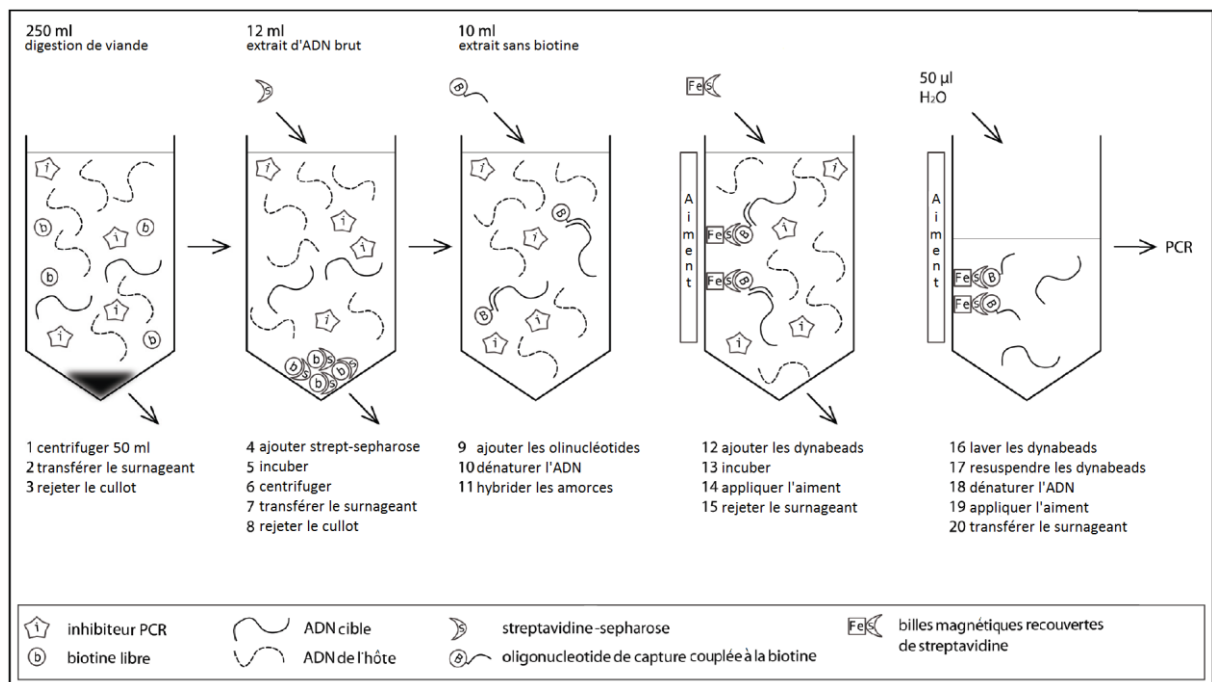
aagcctccgactctgtctccctcgcctcttctccacttcaattctctccgcatcaccacaggaaa 3'

Ces deux amorces sont complémentaires de la région de 529 pb répétée dans le génome de *T. gondii* (GenBank AF146527) (Homan et coll., 2000) et 10 µg de chaque oligonucléotide marqué à la biotine ont été ajoutés au lysat de digestion.

Les échantillons ont été ensuite chauffés à 95°C pendant 15 minutes afin de dénaturer l'ADN, puis ont été incubés avec agitation à 55°C pendant 45 min pour permettre l'hybridation des amorces sur l'ADN cible toxoplasmique.

Les échantillons ont été refroidis à température ambiante avec agitation rotative pendant 15 minutes à 10 rpm afin de permettre la renaturation de l'ADN. Ensuite, 80 µl d'une suspension de billes magnétiques recouvertes de streptavidine avec une capacité d'union de 650 à 1350 pmol de biotine / mg dans 2 ml de NaCl à 5 M ont été ajoutés à la suspension.

Après incubation pendant 60 minutes à température ambiante avec agitation rotative à 10 rpm, les billes magnétiques et les complexes formés entre la streptavidine et les oligonucléotides biotinylés ont été séparés en utilisant l'aimant DynaMag™ -2. Les particules magnétiques ont été lavées au préalable deux fois avec 1,5 ml de solution de lavage contenant 1M de Tris HCl pH 8, EDTA 0,5M pH 8,0 et NaCl 5M (appelé tampon B&W). Les billes magnétiques ont été remises en suspension dans 50 µl d'eau Milli-Q et portées à ébullition pendant 10 min pour séparer l'ADN capturé à partir des billes magnétiques (Figure 8). Les échantillons d'ADN ont été maintenus à -20°C jusqu'à utilisation.



**Figure 8 :** Résumé des étapes de la CM-PCR. Source : Image adaptée à partir de Opsteegh et al., 2010.

Pour vérifier s'il y'a eu capture de l'ADN toxoplasmique et le quantifier, une PCR quantitative en temps réel a été réalisée en utilisant les oligonucléotides et sonde Taqman suivants :

**SE :** 5'-AGGCGAGGGTGAGGATGA-3'

**AS :** 5'-TCGTCTCGTCTGGATCGAAT-3'

**Sonde TaqMan :** 5'-6FAM-CGACGAGAGTCGGAGAGGGAGAAGATGT-BHQ1a-3'

L'amplification de l'ADN a été effectuée dans un thermo-cycleur Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science) dans un volume final de 20 µl. Chaque réaction contenait 2 µl de Taqman master mix (Roche), 0,5 µM de chaque oligonucléotide (SE et AS), 0,2 µM de la sonde Taqman et 5 µl d'ADN capturé.

Les échantillons ont d'abord été chauffés à 50°C pendant 2 min pour activer la Taq-polymerase et ensuite chauffés à 95°C pendant 10 min pour la dénaturation de l'ADN, suivi de 50 cycles comportant une étape de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 20 s et une étape d'hybridation des amorces à 60°C pendant 30 s. La fluorescence a été mesurée à 510 nm.

## 2.3. L'analyse sérologique

### 2.3.1. MAT (Modified agglutination test)

Les anticorps IgG dirigés contre *T. gondii* dans les jus de viande et les sérums ont été recherchés par le test MAT selon le protocole décrit par Desmonts et Remington (Desmonts et Remington, 1980). Le test MAT est utilisé chez les humains et autres espèces animales et implique l'utilisation d'un antigène de *T. gondii*, du sérum et un tampon contenant du 2-mercaptoéthanol qui contribue à augmenter la sensibilité du test (Desmonts et Remington, 1980).

La lecture des microplaques se fait sur un fond noir pour apercevoir le fond des puits (Desmonts et Remington, 1980). Quand au moins 50% d'un puits est recouvert par un voile d'agglutination opaque, l'échantillon analysé est considéré comme positif (Seefeldt et al., 1989).

Le MAT est un test simple, facile et qui ne nécessite pas de matériels sophistiqués. Des kits commerciaux sont disponibles en vente et sont préférés à l'IFAT et à l'ELISA car ils nécessitent moins de temps de travail (Desmonts et Remington, 1980 ; Seefeldt et al, 1989 ; Shaapan et al, 2008). Le MAT peut *a priori* être utilisé chez toutes les espèces animales et peut être réalisé sur des échantillons de sérums lysés (Seefeldt et al., 1989).

Le MAT peut également être réalisé sur le jus de viande si le sérum ne peut être récupéré. Cependant, le jus de viande est environ dix fois moins riche en anticorps que le sérum. Le MAT ne détecte que les anticorps de type IgG dirigés contre *T. gondii* suite à l'utilisation du 2-mercaptoéthanol qui détruit les anticorps IgM (Seefeldt et al, 1989 ; Dubey, 1997). Pour une meilleure interprétation des résultats, il est préférable de tester des échantillons à plusieurs dilutions pour éviter des résultats faussement négatifs (Seefeldt et al., 1989).

#### *Obtention de l'antigène RH pour MAT*

L'antigène de *T. gondii* (souche RH) a été obtenu à partir du protocole de fabrication d'antigène toxoplasmique mis au point au laboratoire de Parasitologie de l'équipe INSERM UMR-1094. Le protocole est adapté à partir de celui décrit par Desmonts et Remington (Desmonts et Remington, 1980). L'objectif du protocole est de produire des toxoplasmes en grandes quantités afin de pouvoir les utiliser tant qu'antigène pour le test MAT. Ce même antigène peut servir également pour d'autres tests comme l'IFAT avec utilisation de lames préparées localement.

Le principe du protocole d'obtention de l'antigène de *T. gondii* repose sur une co-infection de souris SWISS (20-25 g) par un mélange d'ascite de cellules cancéreuses TG-180 avec une ascite de la souche RH de *T. gondii* pour une multiplication rapide des parasites. Un entretien des cellules TG-180 est effectué au préalable, les souris SWISS sont inoculées avec les cellules TG-180, puis leurs ascites fraîches sont récupérées à environ 10 jours post-inoculation. De même, l'entretien de la souche RH est effectué en inoculant des souris SWISS avec de l'ascite RH de *T. gondii* pour obtenir une ascite fraîche. Après comptage sur cellule de Malassez, des souris SWISS saines sont inoculées avec le mélange RH/TG-180 de façon à ce que chaque souris soit inoculée avec 0,2 ml de mélange contenant  $1 \times 10^6$  de parasites RH et  $1 \times 10^6$  de cellules TG-180.

Des prélèvements d'ascite sont effectués pour vérifier l'état d'infection des cellules TG-180 par la souche RH de *T. gondii*. La ponction péritonéale totale de l'ascite des souris est ensuite effectuée lorsque le stade 4 ou le stade 5 de l'infection des cellules TG-180 est atteint (Tableau 3). Les souris sont ensuite euthanasiées par injection intramusculaire de 0,5 ml de kétamine (kétamine à 50 mg/ml). L'ascite récoltée est ensuite centrifugée à 700 x g pendant 10 minutes et une étape de trypsination des cellules TG-180 est effectuée en rajoutant au culot une solution de 50 ml de PBS (Phosphate Buffer Saline, pH 7,2 ; BioMérieux, 150mmol/l, réf:75511) contenant 25 mg de trypsine (Trypsin powder, porcine 1:250, SIGMA-ALDRICH) et 0,2 ml d'héparine. Cette étape de trypsination est effectuée dans un bain-marie sous agitation à 37°C.

**Tableau 3 :** Stades d'infection des cellules TG-180.

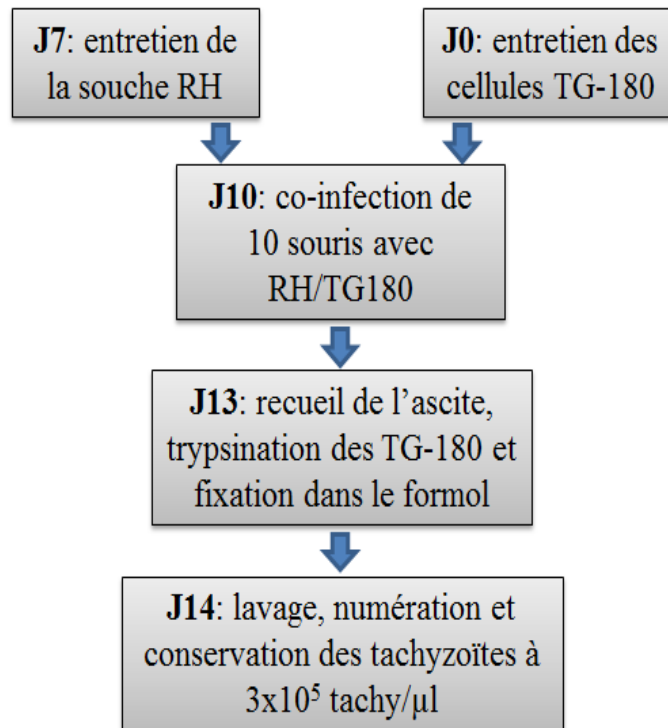
<b>Stades d'infection des TG180</b>	<b>Caractéristiques microscopiques</b>
<b>I</b>	Pas d'infection des cellules TG-180
<b>II</b>	30% des cellules TG-180 sont infectées
<b>III</b>	80% des cellules TG-180 sont infectées
<b>IV</b>	100% des cellules TG-180 sont infectées et début de lyse cellulaire
<b>V</b>	70% des cellules TG-180 sont lysées avec libération massive de tachyzoïtes
<b>VI</b>	Lyse totale des cellules TG-180 et mort de 50% des tachyzoïtes

La trypsination est arrêtée dès que les cellules TG-180 sont détruites pour éviter une plus longue exposition dégradante de la trypsine sur les parasites RH. Les tachyzoïtes sont lavés immédiatement 3 fois en PBS à 700 x g pendant 10 minutes et au final, les tachyzoïtes sont formolés dans du PBS contenant 6% de formaldéhyde pendant au moins 16 heures et stockés à + 4°C. Le formol est ensuite éliminé par 3 lavages en PBS à 700 x g pendant 10 minutes et 0,1% d'azide de sodium est ajouté comme conservateur. La suspension finale est ensuite ajustée à  $3 \times 10^5$  tachyzoïtes /  $\mu\text{L}$  et est conservée à + 4°C dans le tampon PBS avant utilisation (Figure 9). L'antigène produit est utilisé après une étape de validation.

#### *Validation de l'antigène RH obtenu*

Une fois l'antigène RH produit, il est impératif de valider la qualité de cet antigène avant qu'il ne soit utilisé pour le test MAT. Cette étape de validation nécessite de s'assurer de la sensibilité et la spécificité de cet antigène. Un test MAT de validation est alors effectué sur 3 échantillons dont le titre en MAT est connu et validé : un échantillon faiblement positif, un fortement positif et un négatif.

Le but de cette validation est donc de s'assurer que le test est bien spécifique en confirmant le résultat positif ou négatif des échantillons utilisés et de s'assurer de la bonne sensibilité de l'antigène MAT produit en retrouvant un titre égal au titre de l'échantillon faiblement positif.



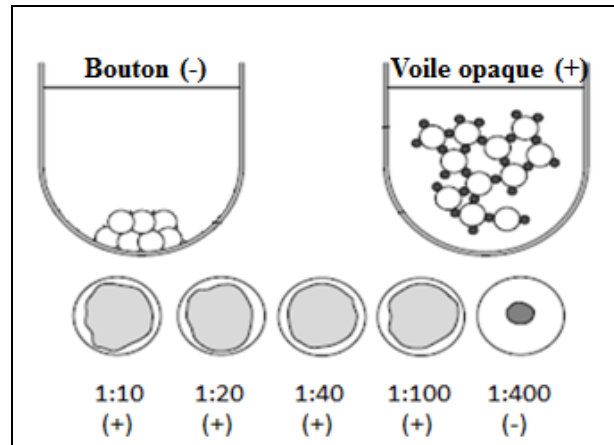
**Figure 9 :** Etapes chronologiques de la fabrication de l'antigène RH de *T. gondii*.

#### Détection des anticorps spécifiques à *T. gondii* par le test MAT

Les échantillons à analyser (sérums ou jus de viandes) avec le test MAT pour détecter les anticorps anti-*T. gondii* doivent être dilués dans le tampon PBS contenant 0,2 mol/L de 2-mercaptoéthanol. Selon la littérature, plusieurs seuils de positivité ont été rapportés pour détecter les anticorps de *T. gondii* chez les chevaux (1:20, 1:25 ou 1:40). Nous avons donc défini les dilutions à utiliser pour ce test comme suit : 1:10, 1:20, 1:40, 1:100 et 1:400.

Dans chaque puits à fond rond de la plaque de microtitration, 50  $\mu$ l de sérums ou jus de viandes dilués ont été déposés avec 50  $\mu$ l de l'antigène RH dilué dans le tampon BABS (bovine albumin buffered saline) selon les recommandations de l'étape de validation de cet antigène. Les plaques de microtitration sont ensuite recouvertes d'un film autocollant puis incubées à température ambiante à l'abri de la lumière pendant au moins 7 heures. Les tachyzoïtes s'agglutinent en présence de l'immunoglobuline spécifique d'anticorps IgG, le 2-mercaptoéthanol détruit les IgM et est utilisé pour éviter l'agglutination non spécifique.

Un résultat positif se présente avec une formation d'un voile circulaire opaque dont le diamètre est égal ou supérieur à la moitié du diamètre du puits. Cette formation de voile s'explique par l'agglutination qui se crée entre les antigènes de surface de *T. gondii* et les anticorps spécifiques. Un résultat négatif se traduit par la formation d'un bouton au milieu du puits : il s'agit des tachyzoïtes seuls qui précipitent au fond du puits (Figure 10).



**Figure 10 :** Représentation des réactions positives avec formation d'un voile opaque à différentes dilutions (1:10, 1:20, 1:40, 1:100) et de la réaction négative avec formation d'un bouton au fond du puits à la dilution 1:400 lors du test MAT.

### 2.3.2. IFAT (immunofluorescence assay test)

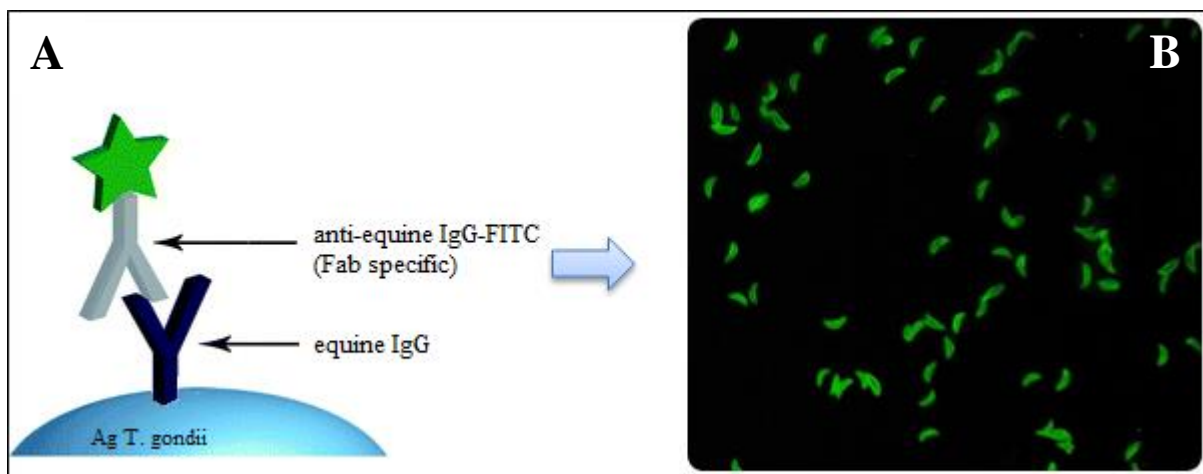
Les anticorps IgG dirigés contre *T. gondii* dans les sérums ont été recherchés par IFAT. Cette technique a été mise au point par Goldman en 1957 (Goldman, 1957). Le principe de cette technique repose sur des toxoplasmes formolés, inactifs et fixés sur une lame de verre qui sont mis en contact avec le sérum à analyser préalablement dilué pour déterminer son titre. Si des anticorps anti-*T. gondii* se lient aux antigènes membranaires présents sur tout le long du contour des parasites (toxoplasmes formolés), ils sont révélés par l'isothiocyanate de fluorescéine après lecture avec un microscope à fluorescence.

Un résultat positif se traduit donc par une fluorescence nette au niveau du contour de *T. gondii*. Les dilutions permettent de déterminer le titre de positivité du sérum à tester. Parmi les inconvénients de cette technique, on peut citer la difficulté de la lecture des lames en cas d'échantillons faiblement positifs car la fluorescence peut paraître très faible, ce qui peut entraîner des faux-négatifs.



Dans notre étude, nous avons utilisé des lames commercialisées (Toxo-Spot IF, bioMérieux, France) qui comportent des puits (10 puits dans chaque lame) recouverts par des toxoplasmes formolés et fixés sur la surface des puits à fond plat. Les sérums des chevaux à analyser par IFAT dans notre étude ont été dilués en PBS (Phosphate Buffer Saline, pH 7,2 ; BioMérieux, 150mmol/l, réf:75511) au 1:8 et au 1:16.

20 µl de chaque sérum dilué à tester sont déposés dans un puits de lame à IFAT et la lame est ensuite incubée à 37°C pendant 30 minutes dans une chambre humide. Les puits des lames sont ensuite lavés au PBS puis 20 µl du conjugué FITC anti-IgG équin (Equine IgG, FITC anti-immunoglobulin conjugate, réf : 043-10, VMRD) sont déposés dans chaque puits et les lames sont de nouveau incubées à 37°C pendant 30 minutes. Un dernier lavage des puits au PBS est réalisé, puis les lames sont prêtes pour la lecture au microscope équipé en fluorescence (Figure 11).



**Figure 11** : Illustration du complexe antigène-anticorps de l'IFAT pour la détection des anticorps de *T. gondii* chez les chevaux (A). Réaction IFAT positive et fluorescence en vert des contours de *T. gondii* sous microscopie à fluorescence (B). Source : [www.orbio.fr](http://www.orbio.fr).

### 2.3.3. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Les anticorps IgG dirigés contre *T. gondii* dans les sérums et jus de viande ont été recherchés par le test ELISA en suivant les instructions du fabricant du kit ID Screen Toxoplasmosis Multi-species (IDvet, Montpellier, France).

Les réactifs ont été ramenés à température ambiante ( $21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) et ont été homogénéisés avant leur utilisation. Une dilution au 1:10 pour les sérums de chevaux et une dilution au 1:2 pour les jus de viande sont préconisées par le fournisseur (IDvet) dans le tampon de dilution numéro 2. Les témoins négatifs et positifs sont fournis dans le kit et sont également dilués au 1:10. Un volume de 50  $\mu\text{l}$  des échantillons et de deux témoins dilués est déposé dans chacun des puits de la plaque à 96 puits fournie dans le kit pour une incubation pendant 45 minutes à température ambiante. Trois lavages avec la solution de lavage sont effectués en évitant le dessèchement des cupules entre les lavages et 100  $\mu\text{l}$  de conjugué 1X sont ensuite déposés dans chaque cupule puis la plaque est à nouveau incubée pendant 30 minutes à température ambiante. Trois nouveaux lavages avec la solution de lavage sont effectués comme précédemment avant de déposer 100  $\mu\text{l}$  de solution de révélation dans chaque cupule et d'incuber la plaque pendant 15 minutes à l'obscurité. Au final, 100  $\mu\text{l}$  de solution d'arrêt est déposée dans chaque cupule avant de mesurer et d'enregistrer les densités optiques à 450 nm.

Le test ELISA détecte l'antigène P30 de *T. gondii*. Pour l'interprétation des résultats, le pourcentage S/P (S : Sample ; P : Positive control) a été calculé avec la formule suivante :  $S/P \% = (\text{DO de l'échantillon} / \text{DO du témoin positif}) \times 100$ . Si S/P est inférieur ou égal à 40%, le résultat est considéré comme négatif ; si S/P est compris entre 40% et 50%, le résultat est considéré comme douteux ; si S/P est supérieur ou égal à 50% et inférieur à 200%, le résultat est considéré comme positif ; si S/P est supérieur ou égal à 200%, le résultat est fortement positif. Le test est validé si la valeur moyenne de la DO du témoin positif est supérieure à 0,350 ( $\text{DO} > 0,350$ ) et si le rapport entre la moyenne des DO des contrôles positifs ( $\text{DO}_{cp}$ ) et la moyenne des DO des contrôles négatifs ( $\text{DO}_{cn}$ ) est supérieure à 3,5.

#### 2.3.4. SFDT (Sabin Feldman Dye-test)

Le test de lyse, appelé également Sabin-Feldman Dye-test (Sabin et Feldman, 1948), est considéré comme le test référence pour diagnostiquer la toxoplasmose humaine (Dubey et Beattie, 1988a; Shaapan et al., 2008). Dans ce test, des tachyzoïtes vivants de la souche RH sont utilisés en présence d'un facteur accessoire. Le sérum utilisé est décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 minutes puis ajouté aux toxoplasmes vivants de la souche RH. Le facteur accessoire contenu dans un sérum négatif pour la détection d'anticorps anti-*T. gondii* est ensuite rajouté. Le complexe anticorps-antigène formé peut alors fixer le complément ce qui provoque la lyse des parasites.

Dans la technique initiale, la lyse des parasites était visualisée à l'aide d'un microscope classique où le toxoplasme lysé apparaissait non colorable. En 1955, Desmonts (Desmonts, 1955) proposa d'utiliser un microscope à contraste de phase : une sérologie négative se traduit alors par la visualisation des toxoplasmes réfringents donc vivants alors que la présence d'anticorps spécifiques à *T. gondii* se traduit par l'observation de parasites lysés et non réfringents. Le test est positif lorsque 50% des toxoplasmes sont lysés. Ce titre est toujours exprimé en UI/ml et est déterminé en parallèle avec un sérum de référence titré lui aussi en UI/ml. Le seuil de positivité est à 2 UI/ml.

Dans notre étude, nous n'avons pas réussi à mettre au point cette technique pour mettre en évidence les anticorps anti-*T. gondii* dans les sérums de cheval malgré l'obtention d'un facteur accessoire provenant d'un sérum de cheval. Les différents essais n'ont pas donné de résultats exploitables et nous avons décidé d'abandonner la technique.

#### 2.4. Bioessais chez la souris

Pour tenter d'isoler des souches de *T. gondii*, nous avons décidé de pratiquer les bioessais chez la souris en inoculant le produit de digestion des viandes positives en CM-PCR et également de quelques viandes négatives avec cette technique. La digestion enzymatique par la pepsine permet de digérer le muscle susceptible de contenir des kystes avec bradyzoïtes avant de l'inoculer aux souris (Dubey, 1998).

Cinquante grammes de viande de cheval est broyée à sec pendant 15 secondes à vitesse minimale puis un volume de 125 mL d'eau physiologique (Chlorure de Sodium - NaCl- 0,9%) est ajouté pour un second broyage à vitesse maximale pendant 30 secondes. Le broyat est transvasé dans un flacon en verre de 500 mL stérile et préchauffé à 37°C. Le blinder est rincé avec 125 mL d'eau physiologique qui est transvasé à nouveau dans le flacon en verre (volume final 250 mL). 250 mL de la solution de digestion fraîchement préparée et préchauffée à 37°C contenant 2,6g de pepsine (Pepsin from porcine gastric mucosa, P7000, 902 units/mg protein, Sigma Aldrich), 7 mL d'acide chlorhydrique (HCl) à 38% et 5g de NaCl est rajoutée pour avoir un volume final de 500 mL avec un pH compris entre 1,10 et 1,20. Le tout est incubé dans un bain-marie à 37°C pendant 1 heure avec agitation.

Après l'incubation, le broyat est filtré à l'aide de gaze pliée sur deux couches et centrifugé à 1200 x g pendant 10 minutes. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot est transvasé dans un tube Falcon de 50 mL où l'on rajoute la quantité nécessaire d'une solution alcaline fraîchement préparée (20 mL de PBS avec 15 mL de bicarbonate de sodium à 1,2%) pour neutraliser le pH. Une nouvelle centrifugation à 1200 x g pendant 10 minutes est réalisée afin de récupérer le culot final.

Environ 100 µL d'antibiotiques (1000 unités de pénicilline et 100 µL de streptomycine) sont ajoutés au culot final de la digestion pour éliminer les bactéries et éviter que la souris ne meure d'infection bactérienne (Dubey, 1998). Jusqu'à 0,7 mL de culot est inoculé par voie intra péritonéale à chaque souris (swiss-webster de 20-25 g).

Après quatre semaines post-inoculation (p.i.), le sang est prélevé au niveau du sinus mandibulaire des souris inoculées avec le culot de viande digérée grâce à des lancets (Goldenrod animal lancet, MEDIpoint, Inc.). Pour vérifier si la souris est infectée par *T. gondii*, nous avons effectué un MAT sur le sérum des souris inoculées aux dilutions 1:10, 1:20, 1:40, 1:100 et 1:400 avec un seuil de positivité au 1:10 .

## 2.5. L'analyse statistique

Les seuils de positivité ou cutoff ayant la meilleure balance entre sensibilité et spécificité pour les tests sérologiques ont été déterminés par les analyses de courbes ROC (receiver operating characteristic). Dans les jus de viande de cheval, les seuils de positivité du MAT et de l'ELISA ont été estimés en considérant la technique CM-PCR comme test de

référence. Pour le test commercial ELISA (IDvet), le seuil de positivité a également été déterminé en testant plusieurs dilutions de sérum de cheval positif THI1813. Dans les sérums de chevaux, les seuils de positivité ont été estimés en considérant chaque fois chacun des tests sérologiques comme test de référence.

La comparaison des résultats de paires appariées entre les différents tests en utilisant les différents seuils déterminés par analyse ROC a été réalisée par le test de McNemar. Introduit pour la première fois en 1947 par Quinn McNemar (McNemar, 1947), ce test statistique est aujourd'hui utilisé dans les applications de la recherche médicale (Altman, 1991). Le coefficient Kappa a été utilisé pour estimer le niveau d'agrément entre les tests pour la détection de *T. gondii* chez les chevaux à partir des sérums et des jus de viande.

### 3. Résultats

#### 3.1. Les données d'échantillonnage

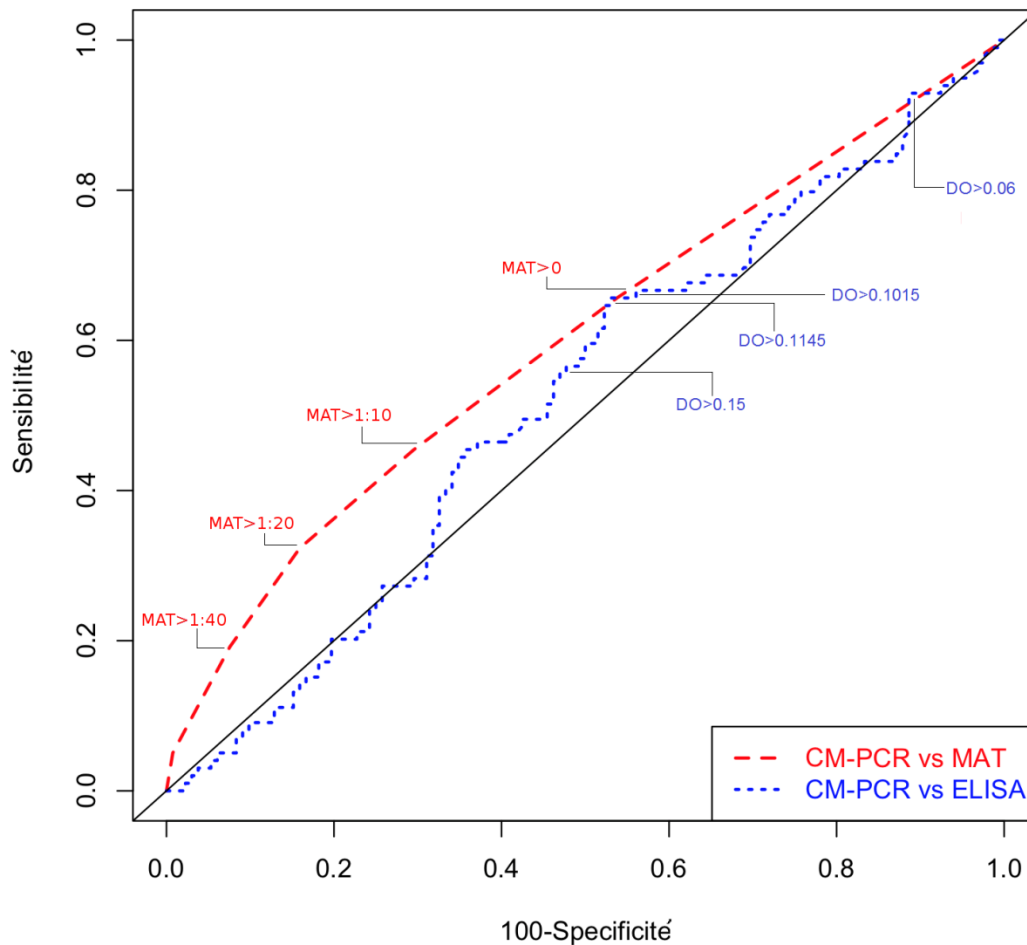
La plupart des viandes de chevaux analysées dans cette étude provenaient du continent Américain : 40% des viandes étaient originaires de l'Argentine, 20% du Canada et 14% du Mexique (tableau 4). Toutes les données d'échantillonnage y compris la liste des échantillons de viande de cheval avec l'origine géographique, le numéro de lot, l'emballage, la date d'expiration et les résultats des tests sont disponibles en annexe. Quelques données sont manquantes pour certaines viandes comme le numéro de lot ou les dates d'emballage et de péremption car elles n'étaient pas disponibles sur les emballages vendus dans les supermarchés.

**Tableau 4** : Origine des 231 viandes chevalines et estimation de la prévalence de *T. gondii* dans la viande par rapport aux résultats de CM-PCR et des tests sérologiques MAT et ELISA (DO) en fonction du seuil utilisé.

	<b>CM-PCR +</b>	<b>MAT &gt;0</b>	<b>MAT &gt;1:20</b>	<b>MAT &gt;1:40</b>	<b>DO&gt;0,06</b>	<b>DO&gt;0,1015</b>	<b>DO&gt;0,1145</b>	<b>DO&gt;0,15</b>
<b>Pays</b>	No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)
<b>No. (%)</b>	[95% CI]	[95% CI]	[95% CI]	[95% CI]	[95% CI]	[95% CI]	[95% CI]	[95% CI]
<b>Allemagne</b>	1 (50,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	2 (100,00%)	2 (100,00%)	2 (100,00%)	2 (100,00%)
<b>2 (0,86%)</b>	[0,01-0,98]	[0-0,842]	[0-0,84]	[0-0,84]	[0,15-1]	[0,15-1]	[0,15-1]	[0,15-1]
<b>Argentine</b>	50 (53,76%)	56 (60,22%)	18 (19,35%)	12 (12,90%)	81 (87,10%)	52 (55,91%)	52 (55,91%)	40 (43,01%)
<b>93 (40,26%)</b>	[0,43-0,64]	[0,49-0,70]	[0,11-0,28]	[0,06-0,21]	[0,78-0,93]	[0,45-0,66]	[0,45-0,66]	[0,32-0,53]
<b>Canada</b>	12 (26,09%)	31 (67,39%)	17 (36,96%)	8 (17,39%)	44 (95,65%)	30 (65,22%)	29 (63,04%)	25 (54,35%)
<b>46 (19,92%)</b>	[0,14-0,41]	[0,52-0,80]	[0,23-0,52]	[0,07-0,31]	[0,85-0,99]	[0,49-0,78]	[0,47-0,76]	[0,39-0,69]
<b>France</b>	10 (71,43%)	10 (71,43%)	1 (7,14%)	0 (0,00%)	12 (85,71%)	7 (50,00%)	6 (42,86%)	4 (28,57%)
<b>14 (6,06%)</b>	[0,41-0,91]	[0,41-0,91]	[0,00-0,33]	[0-0,23]	[0,57-0,98]	[0,23-0,77]	[0,17-0,71]	[0,08-0,58]
<b>Inconnu</b>	21 (52,50%)	22 (55,00%)	13 (32,50%)	7 (17,50%)	38 (95,00%)	26 (65,00%)	23 (57,50%)	20 (50,00%)
<b>40 (17,32%)</b>	[0,36-0,68]	[0,38-0,70]	[0,18-0,49]	[0,07-0,32]	[0,83-0,99]	[0,48-0,79]	[0,40-0,73]	[0,33-0,66]
<b>Mexique</b>	2 (6,25%)	17 (53,13%)	4 (12,50%)	2 (6,25%)	27 (84,38%)	15 (46,88%)	14 (43,75%)	12 (37,50%)
<b>32 (13,85%)</b>	[0,00-0,20]	[0,34-0,70]	[0,03-0,29]	[0,00-0,20]	[0,67-0,94]	[0,29-0,65]	[0,26-0,62]	[0,21-0,56]
<b>Uruguay</b>	3 (75,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	3 (75,00%)	3 (75,00%)	3 (75,00%)	2 (50,00%)
<b>4 (1,73%)</b>	[0,19-0,99]	[0-0,60]	[0-0,60]	[0-0,60]	[0,19-0,99]	[0,19-0,99]	[0,19-0,99]	[0,06-0,93]
<b>Total</b>	99 (42,86%)	136 (58,87%)	53 (22,94%)	29 (12,55%)	207 (89,61%)	135 (58,44%)	129 (55,84%)	105 (45,45%)
<b>231 (100 %)</b>	[0,36-0,49]	[0,52-0,65]	[0,17-0,28]	[0,08-0,17]	[0,84-0,93]	[0,51-0,64]	[0,49-0,62]	[0,38-0,52]

### 3.2. Les résultats d'analyses des échantillons de viandes de cheval

Les analyses des courbes ROC, ainsi que les calculs de sensibilité (Se) et de spécificité (Sp), nous ont permis d'identifier les seuils avec le meilleur équilibre entre sensibilité et spécificité pour les deux tests sérologiques MAT et ELISA réalisés sur les jus des viandes de cheval par rapport aux résultats de CM-PCR (Figure 12).



**Figure 12 :** Analyses des courbe ROC des tests ELISA et MAT par rapport aux résultats de CM-PCR dans les échantillons de jus de viande.

L'utilisation du symbole « > » pour les seuils du MAT n'est pas habituelle dans la littérature. Cette transcription est d'ordre statistique car elle est plus simple à utiliser afin de ne pas négliger certaines dilutions intermédiaires qui pourraient être également testées ultérieurement. Par exemple dans notre étude, les échantillons n'ont été testés qu'aux dilutions 1:10, 1:20, 1:40, 1:100 et 1:400. Si un échantillon est positif au 1:20 mais négatif au 1:40, cela ne veut pas dire que le seuil de positivité est obligatoirement au 1:20 car de

nombreuses dilutions intermédiaires n'ont pas été testées comme 1:25, 1:30 ou 1:35 qui pourraient également être le seuil de positivité.

Au seuil  $MAT > 0$ , les échantillons positifs sont ceux qui sont positifs aux dilutions 1:10, 1:20, 1:40, 1:100, et 1:400.

Au seuil  $MAT > 10$ , les échantillons positifs sont ceux qui sont positifs aux dilutions 1:20, 1:40, 1:100, et 1:400.

Au seuil  $MAT > 20$ , les échantillons positifs sont ceux qui sont positifs aux dilutions 1:40, 1:100, et 1:400.

Au seuil  $MAT > 40$ , les échantillons positifs sont ceux qui sont positifs aux dilutions 1:100 et 1:400.

Le meilleur seuil de positivité pour le MAT a été estimé à  $MAT > 0$  avec une sensibilité de 65,66% et une spécificité de 46,21% (tableau 5). Le meilleur seuil de positivité en valeur de densité optique (DO) pour le test ELISA a été estimé à  $DO > 0,1015$  avec une sensibilité de 65,66% et une spécificité de 46,97% (tableau 5). L'aire sous la courbe ROC variait de 0,52 pour le test ELISA à 0,60 pour MAT représentant un niveau de précision acceptable.

D'autres seuils de positivité pour le test ELISA ont ensuite été identifiés en croisant les résultats de la courbe ROC avec différents seuils de MAT ( $MAT > 1:10$ ,  $MAT > 1:20$  et  $MAT > 1:40$ ). Ces autres seuils ELISA ( $DO > 0,06$ ,  $DO > 0,1145$ , et  $DO > 0,15$ ) ont été également inclus dans nos calculs ultérieurs.

Les valeurs kappa (K) calculées pour estimer l'accord entre les tests ELISA et MAT par rapport au test de référence CM-PCR étaient faibles pour les deux tests sérologiques quels que soient les seuils utilisés : entre 0,02 et 0,12 pour le test ELISA et entre 0,11 et 0,17 pour le MAT (tableau 5). Ces résultats indiquent un faible agrément entre le test CM-PCR et les deux tests sérologiques MAT et ELISA.

Le test McNemar était significatif pour les seuils  $DO > 0,06$ ,  $DO > 0,1015$ ,  $DO > 0,1145$ , et  $MAT > 0$  (tableau 5). Pour ces seuils, les paires discordantes étaient plus fréquentes dans les échantillons avec des résultats négatifs en CM-PCR et des résultats positifs en ELISA ou MAT que dans les échantillons avec des résultats positifs en CM-PCR et des résultats négatifs en ELISA ou MAT. Pour le seuil ELISA  $DO > 0,15$  et  $MAT > 1:10$ , le test McNemar



n'était pas significatif (tableau 5), ce qui signifie que les paires discordantes (échantillons négatifs avec CM-PCR et positifs avec ELISA ou MAT et échantillons positifs avec CM-PCR et négatifs avec ELISA ou MAT) se sont produites au hasard.

Pour les seuils  $\text{MAT} > 1:20$  et  $> 1:40$ , le test McNemar était significatif (tableau 5), et les paires discordantes étaient plus fréquentes dans les échantillons positifs avec CM-PCR et négatifs avec MAT que dans les échantillons négatifs avec CM-PCR et positifs avec MAT. Ce résultat suggère que le seuil  $\text{MAT} > 1:20$  a une faible sensibilité pour détecter les échantillons de viande de cheval infectés par *T. gondii*.

Parmi les différents calculs réalisés, il apparaît que les meilleurs seuils pour le test ELISA sont  $\text{DO} > 0,1015$  ou  $\text{DO} > 0,1145$  et  $\text{MAT} > 0$  pour le test MAT.

Selon les résultats de la CM-PCR, l'ADN de *T. gondii* a été détecté dans 99 sur 231 échantillons de viande de cheval soit une prévalence de 42,86% [IC95% : 0,36-0,49] (tableau 4). En utilisant le seuil  $\text{MAT} > 0$  pour MAT, la prévalence était plus élevée (58,87%). En utilisant les deux seuils ELISA  $\text{DO} > 0,1015$  et  $\text{DO} > 0,1145$ , les prévalences étaient également plus élevées mais similaires à celle du test MAT : 58,44% et 55,84%, respectivement (tableau 4).

**Tableau 5 :** Mesures statistiques de la performance des tests ELISA (DO) et MAT avec différents seuils par rapport à CM-PCR pour la détection de *T. gondii* dans les échantillons de viandes chevalines.

	CM-PCR* vs, DO>0,06	CM-PCR* vs, DO>0,1015	CM-PCR* vs, DO>0,1145	CM-PCR* vs, DO>0,15	CM-PCR* vs MAT>0	CM-PCR* vs MAT>1:10	CM-PCR* vs MAT>1:20	CM-PCR* vs MAT>1:40
<b>Se %</b>	90,91%	65,66%	61,62%	49,49%	65,66%	45,45%	32,32%	19,19%
	[0,85-0,97]	[0,56-0,75]	[0,52-0,71]	[0,40-0,59]	[0,56-0,75]	[0,36-0,55]	[0,23-0,42]	[0,11-0,27]
<b>Sp %</b>	11,36%	46,97%	48,48%	57,58%	46,21%	70,45%	84,09%	92,42%
	[0,06-0,17]	[0,38-0,55]	[0,40-0,57]	[0,49-0,66]	[0,38-0,55]	[0,63-0,78]	[0,78-0,90]	[0,88-0,97]
<b>VPP %</b>	43,48%	48,15%	47,29%	46,67%	47,79%	53,57%	60,38%	65,52%
	[0,37-0,50]	[0,40-0,57]	[0,39-0,56]	[0,37-0,56]	[0,39-0,56]	[0,43-0,64]	[0,47-0,74]	[0,48-0,83]
<b>VPN %</b>	62,50%	64,58%	62,75%	60,32%	64,21%	63,27%	62,36%	60,40%
	[0,43-0,82]	[0,55-0,74]	[0,53-0,72]	[0,52-0,69]	[0,55-0,74]	[0,55-0,71]	[0,55-0,69]	[0,54-0,67]
<b>Kappa</b>	0,02	0,12	0,09	0,07	0,11	0,16	0,17	0,12
<b>McNemar</b>	P < 0,1 %	P < 0,1 %	P < 1 %	NS	P < 0,1 %	NS	P < 0,1 %	P < 0,1 %

Les gammes entre crochets [ ] indiquent les valeurs de l'intervalle de confiance à 95%.

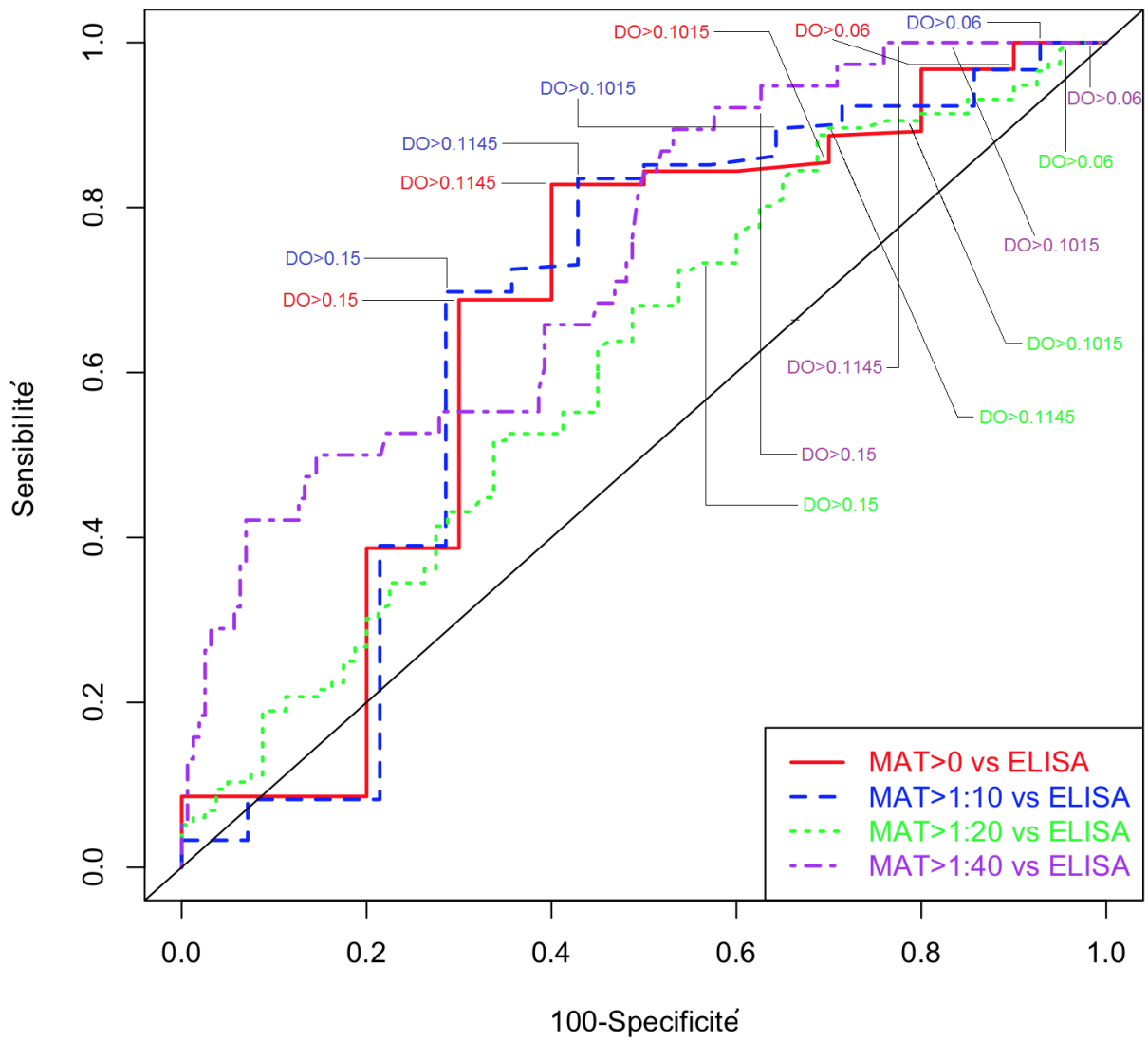
\*:référence; Se: sensibilité; Se: spécificité; VPP: valeur prédictive positive; VPN: valeur prédictive négative; Kappa: niveau de l'accord; NS: non significatif.

### 3.3. Les résultats d'analyse des sérums de chevaux

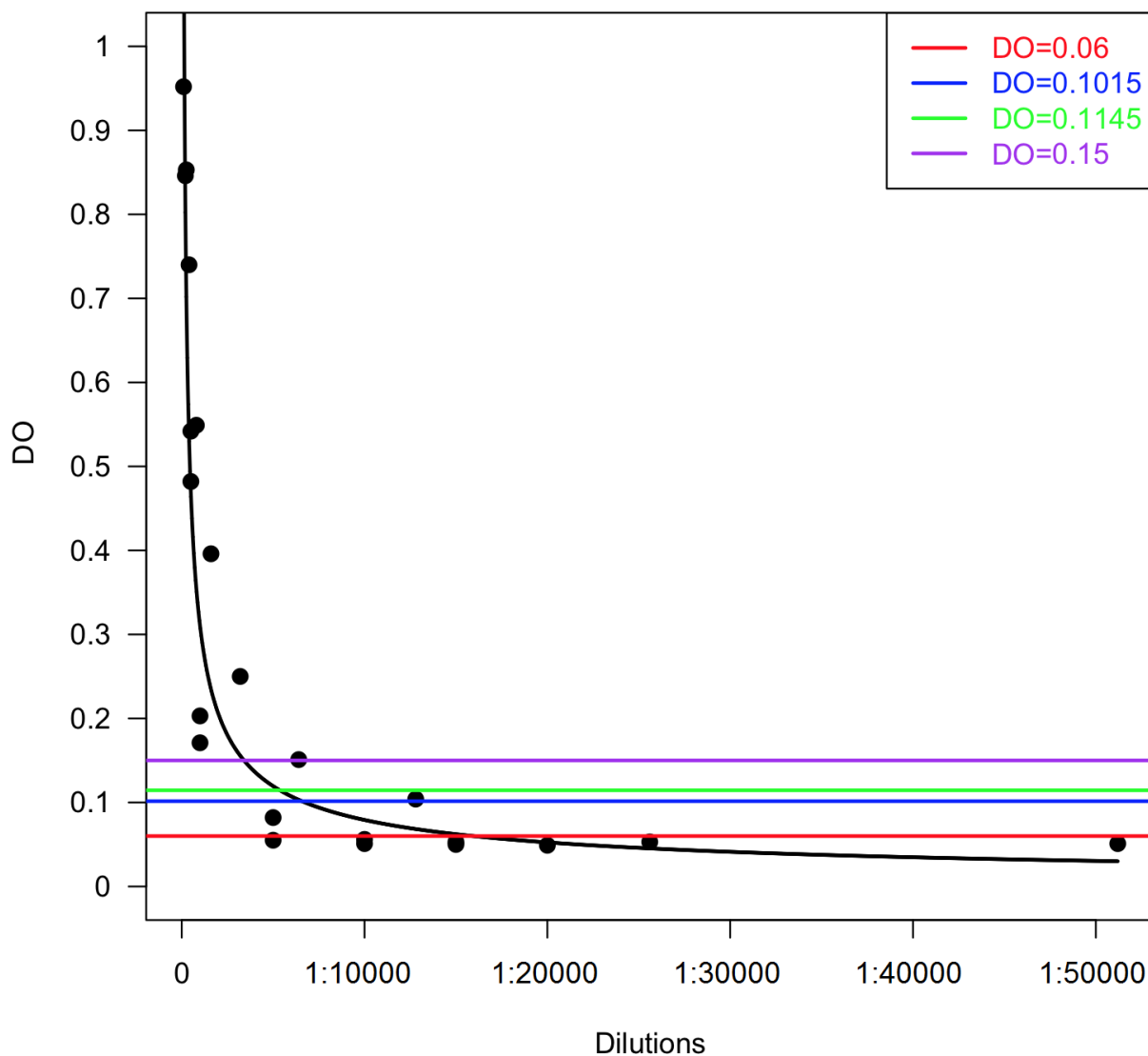
Les résultats des tests sérologiques MAT, ELISA et IFAT pour la détection des anticorps anti-*T. gondii* dans les 196 sérums de chevaux sont rapportés dans l'Annexe 2.

#### MAT, ELISA et IFAT

Les analyses sur les sérums de chevaux ont montré que les seuils avec la meilleure balance sensibilité / spécificité étaient  $DO > 0,1145$  et  $DO > 0,15$  pour ELISA et  $MAT > 0$  et  $MAT > 1 : 10$  pour le MAT (Figure 13 et tableaux 6-9). De plus, les dilutions en série du sérum de cheval positif THI1813 ont montré que les seuils ELISA identifiés ( $DO > 0,06$ ,  $DO > 0,1015$ ,  $DO > 0,1145$  et  $DO > 0,15$ ) étaient compatibles avec les limites de la négativité de ce contrôle positif et l'extinction des signaux de DO (Figure 14).



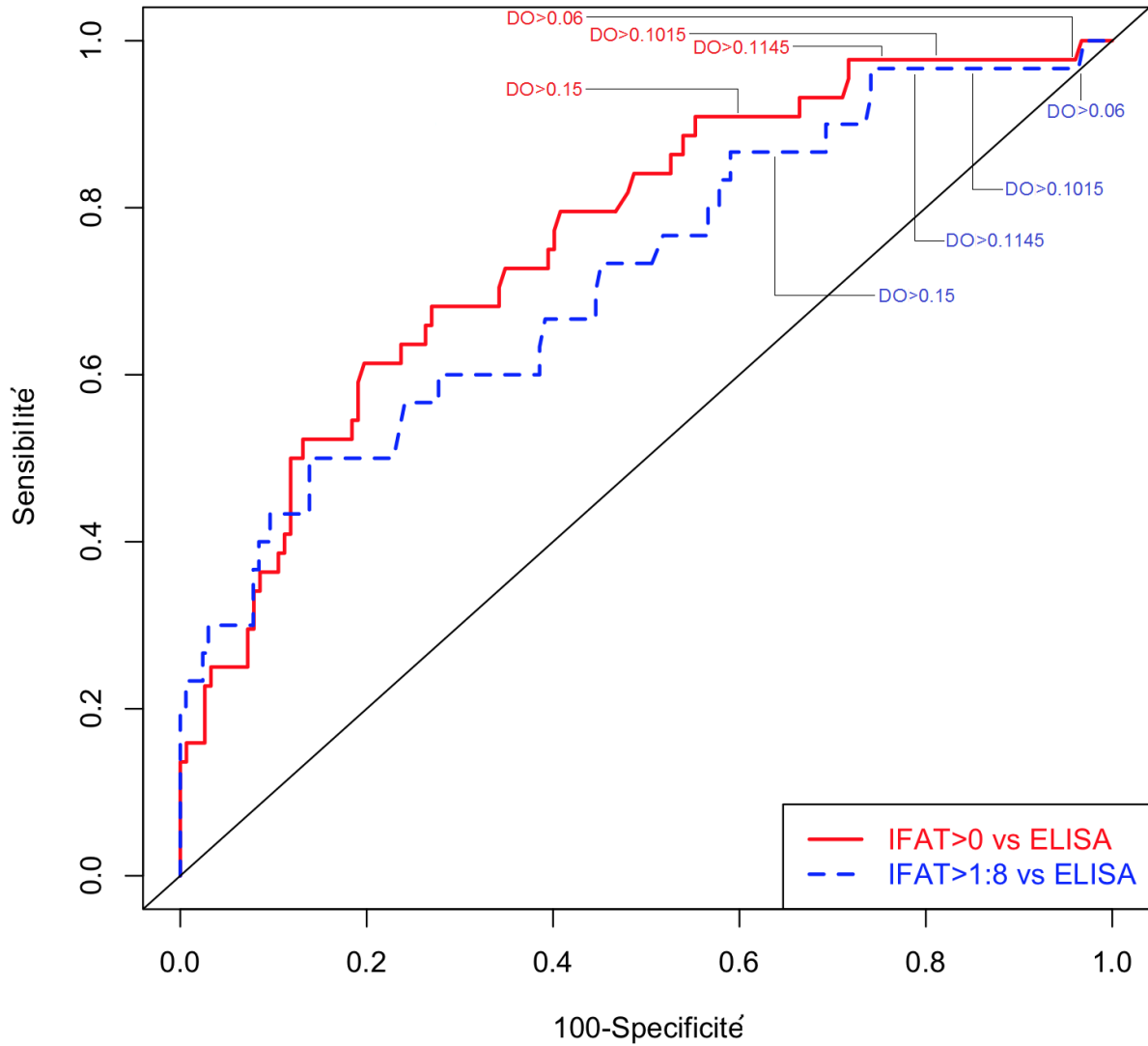
**Figure 13 :** Analyses des courbes ROC des tests ELISA par rapport aux résultats de MAT dans les sérums de chevaux.



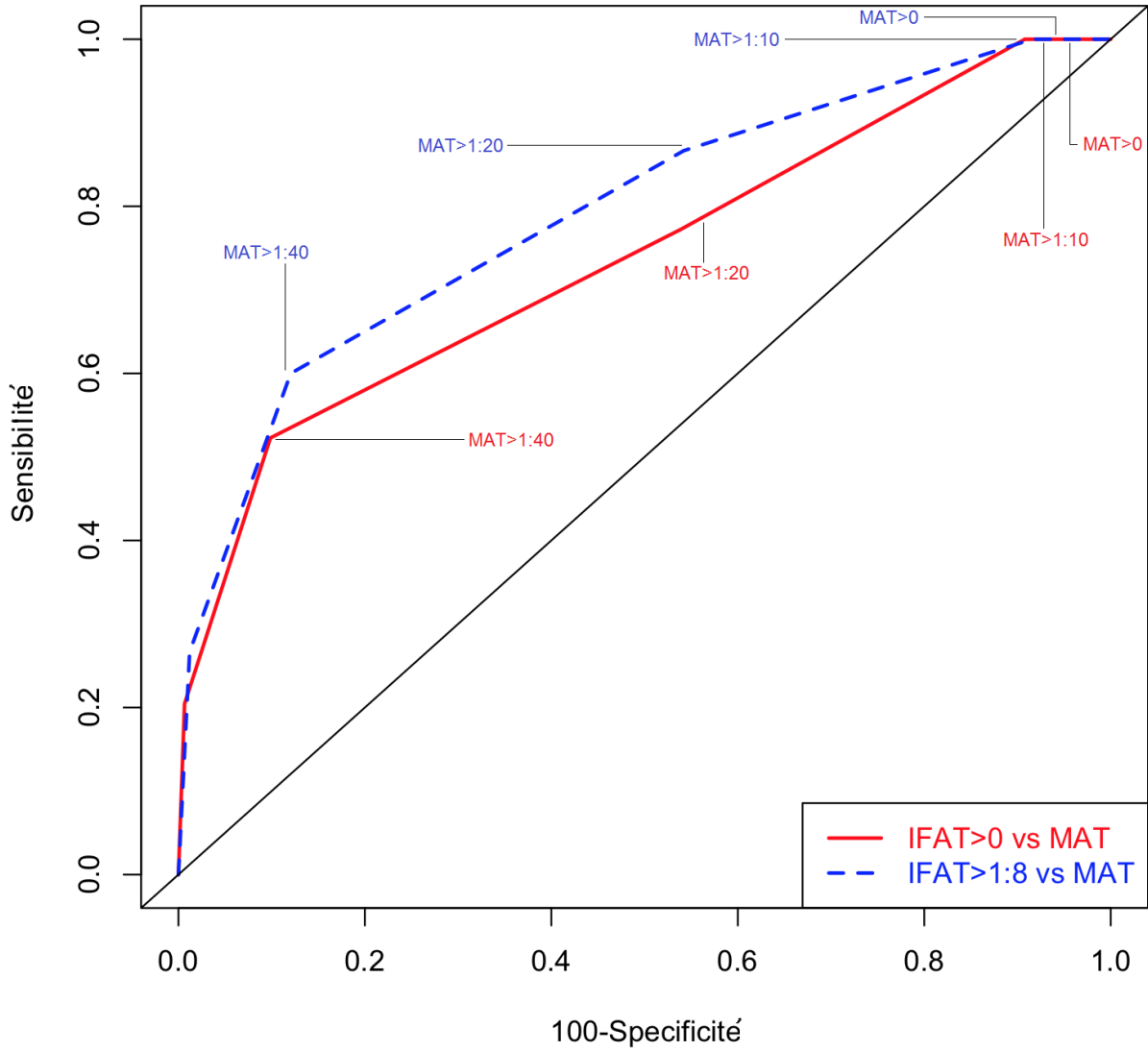
**Figure 14 :** Représentation des seuils ELISA ( $DO > 0,06$ ,  $DO > 0,1015$ ,  $DO > 0,1145$  et  $DO > 0,15$ ) sur des dilutions en série du sérum de cheval positif THI1813.

Les valeurs kappa (K) calculées pour estimer le niveau d'agrément entre le test ELISA et le test MAT dans les sérums de chevaux sont disponibles dans les tableaux 6, 7, 8 et 9.

Les déterminations des seuils avec la meilleure balance sensibilité / spécificité et les calculs des valeurs kappa (K) ont également été réalisés entre le test IFAT et les deux autres tests ELISA et MAT dans les sérums de chevaux (Figure 15-16 et tableaux 10-13).



**Figure 15 :** Analyses des courbes ROC des tests ELISA par rapport aux résultats du test IFAT dans les sérums de chevaux.



**Figure 16 :** Analyses des courbes ROC du test MAT par rapport aux résultats du test IFAT dans les sérums de chevaux.

**Tableau 6 :** Estimation du meilleur seuil ELISA par rapport au MAT (MAT>0) dans les sérums de chevaux.

	<b>MAT&gt;0* vs DO&gt;0,06</b>		<b>MAT&gt;0* vs DO&gt;0,1015</b>		<b>MAT&gt;0* vs DO&gt;0,1145</b>		<b>MAT&gt;0* vs DO&gt;0,15</b>	
<b>Se</b>	96,77%	[0,93 ; 0,98]	86,02%	[0,80 ; 0,90]	82,80%	[0,76 ; 0,87]	68,28%	[0,61 ; 0,74]
<b>Sp</b>	10,00%	[0,00 ; 0,44]	30,00%	[0,06 ; 0,65]	60,00%	[0,26 ; 0,87]	70,00%	[0,34 ; 0,93]
<b>VPP</b>	95,24%	[0,91 ; 0,97]	95,81%	[0,91 ; 0,98]	97,47%	[0,93 ; 0,99]	97,69%	[0,93 ; 0,99]
<b>VPN</b>	14,29%	[0,00 ; 0,57]	10,34%	[0,02 ; 0,27]	15,79%	[0,06 ; 0,31]	10,61%	[0,04 ; 0,20]
<b>Kappa</b>	0,08		0,08		0,18		0,10	
<b>McNemar</b>	NS		P < 1 %		P < 0,1 %		P < 0,1 %	

Les gammes entre crochets [ ] indiquent les valeurs de l'intervalle de confiance à 95%.

\*:référence; Se: sensibilité; Se: spécificité; VPP: valeur prédictive positive; VPN: valeur prédictive négative; Kappa: niveau de l'accord; NS: non significatif.

**Tableau 7 :** Estimation du meilleur seuil ELISA par rapport au MAT (MAT>1:10) dans les sérums de chevaux.

	<b>MAT&gt;1:10* vs DO&gt;0,06</b>		<b>MAT&gt;1:10* vs DO&gt;0,1015</b>		<b>MAT&gt;1:10* vs DO&gt;0,1145</b>		<b>MAT&gt;1:10* vs DO&gt;0,15</b>	
<b>Se</b>	96,70%	[0,93 ; 0,98]	86,81%	[0,81 ; 0,91]	83,52%	[0,77 ; 0,88]	69,23%	[0,62 ; 0,75]
<b>Sp</b>	7,14%	[0,00 ; 0,33]	35,71%	[0,12 ; 0,64]	57,14%	[0,28 ; 0,82]	71,43%	[0,41 ; 0,91]
<b>VPP</b>	93,12%	[0,88 ; 0,96]	94,61%	[0,9 ; 0,97]	96,20%	[0,91 ; 0,98]	96,92%	[0,92 ; 0,99]
<b>VPN</b>	14,29%	[0,00 ; 0,57]	17,24%	[0,05 ; 0,35]	21,05%	[0,09 ; 0,37]	15,15%	[0,07 ; 0,26]
<b>Kappa</b>	0,05		0,15		0,22		0,14	
<b>McNemar</b>	NS		NS		P < 0,1 %		P < 0,1 %	

Les gammes entre crochets [ ] indiquent les valeurs de l'intervalle de confiance à 95%.

\*:référence; Se: sensibilité; Se: spécificité; VPP: valeur prédictive positive; VPN: valeur prédictive négative; Kappa: niveau de l'accord; NS: non significatif.



**Tableau 8 :** Estimation du meilleur seuil ELISA par rapport au MAT (MAT>1:20) dans les sérums de chevaux.

	<b>MAT&gt;1:20* vs DO&gt;0,06</b>		<b>MAT&gt;1:20* vs DO&gt;0,1015</b>		<b>MAT&gt;1:20* vs DO&gt;0,1145</b>		<b>MAT&gt;1:20* vs DO&gt;0,15</b>	
<b>Se</b>	97,41%	[0,92 ; 0,99]	90,52%	[0,83 ; 0,95]	88,79%	[0,81 ; 0,93]	73,28%	[0,64 ; 0,81]
<b>Sp</b>	5,00%	[0,01 ; 0,12]	22,50%	[0,13 ; 0,33]	31,25%	[0,21 ; 0,42]	43,75%	[0,32 ; 0,55]
<b>VPP</b>	59,79%	[0,52 ; 0,66]	62,87%	[0,55 ; 0,70]	65,19%	[0,57 ; 0,72]	65,38%	[0,56 ; 0,73]
<b>VPN</b>	57,14%	[0,18 ; 0,90]	62,07%	[0,42 ; 0,79]	65,79%	[0,48 ; 0,80]	53,03%	[0,40 ; 0,65]
<b>Kappa</b>	0,02		0,14		0,21		0,17	
<b>McNemar</b>	P < 0,1 %		P < 0,1 %		P < 0,1 %		NS	

Les gammes entre crochets [ ] indiquent les valeurs de l'intervalle de confiance à 95%.

\*:référence; Se: sensibilité; Se: spécificité; VPP: valeur prédictive positive; VPN: valeur prédictive négative; Kappa: niveau de l'accord; NS: non significatif.

**Tableau 9 :** Estimation du meilleur seuil ELISA par rapport au MAT (MAT>1:40) dans les sérums de chevaux.

	<b>MAT&gt;1:40* vs DO&gt;0,06</b>		<b>MAT&gt;1:40* vs DO&gt;0,1015</b>		<b>MAT&gt;1:40* vs DO&gt;0,1145</b>		<b>MAT&gt;1:40* vs DO&gt;0,15</b>	
<b>Se</b>	100,00%	[0,90 ; 1]	100,00%	[0,90 ; 1]	100,00%	[0,90 ; 1]	92,11%	[0,78 ; 0,98]
<b>Sp</b>	4,43%	[0,01 ; 0,08]	18,35%	[0,12 ; 0,25]	24,05%	[0,17 ; 0,31]	39,87%	[0,32 ; 0,48]
<b>VPP</b>	20,11%	[0,14 ; 0,26]	22,75%	[0,16 ; 0,29]	24,05%	[0,17 ; 0,31]	26,92%	[0,19 ; 0,35]
<b>VPN</b>	100,00%	[0,59 ; 1]	100,00%	[0,88 ; 1]	100,00%	[0,90 ; 1]	95,45%	[0,87 ; 0,99]
<b>Kappa</b>	0,01		0,08		0,10		0,16	
<b>McNemar</b>	P < 0,1 %		P < 0,1 %		P < 0,1 %		P < 0,1 %	

Les gammes entre crochets [ ] indiquent les valeurs de l'intervalle de confiance à 95%.

\*:référence; Se: sensibilité; Se: spécificité; VPP: valeur prédictive positive; VPN: valeur prédictive négative; Kappa: niveau de l'accord.

**Tableau 10** : Estimation du meilleur seuil IFAT par rapport au MAT (MAT>0 et MAT>1:10) dans les sérums de chevaux.

	<b>MAT&gt;0* vs IFAT&gt;0</b>		<b>MAT&gt;0* vs IFAT&gt;1:8</b>		<b>MAT&gt;1:10* vs IFAT&gt;0</b>		<b>MAT&gt;1:10* vs IFAT&gt;1:8</b>	
<b>Se</b>	23,66%	[0,17 ; 0,30]	16,13%	[0,11 ; 0,22]	24,18%	[0,18 ; 0,31]	16,48%	[0,11 ; 0,22]
<b>Sp</b>	100%	[0,69 ; 1]	100%	[0,69 ; 1]	100%	[0,76 ; 1]	100%	[0,76 ; 1]
<b>VPP</b>	100%	[0,92 ; 1]	100%	[0,88 ; 1]	100%	[0,92 ; 1]	100%	[0,88 ; 1]
<b>VPN</b>	6,58%	[0,03 ; 0,11]	6,02%	[0,02 ; 0,10]	9,21%	[0,05 ; 0,15]	8,43%	[0,04 ; 0,13]
<b>Kappa</b>	0,03		0,01		0,04		0,02	
<b>McNemar</b>	P < 0,1 %		P < 0,1 %		P < 0,1 %		P < 0,1 %	

Les gammes entre crochets [ ] indiquent les valeurs de l'intervalle de confiance à 95%.

\*:référence; Se: sensibilité; Se: spécificité; VPP: valeur prédictive positive; VPN: valeur prédictive négative; Kappa: niveau de l'accord.

**Tableau 11** : Estimation du meilleur seuil IFAT par rapport au MAT (MAT>1:20 et MAT>1:40) dans les sérums de chevaux.

	<b>MAT&gt;1:20* vs IFAT&gt;0</b>		<b>MAT&gt;1:20* vs IFAT&gt;1:8</b>		<b>MAT&gt;1:40* vs IFAT&gt;0</b>		<b>MAT&gt;1:40* vs IFAT&gt;1:8</b>	
<b>Se</b>	29,31%	[0,21 ; 0,38]	22,41%	[0,15 ; 0,31]	60,53%	[0,43 ; 0,76]	47,37%	[0,31 ; 0,64]
<b>Sp</b>	87,50%	[0,78 ; 0,93]	95,00%	[0,87 ; 0,98]	86,71%	[0,80 ; 0,91]	92,41%	[0,87 ; 0,96]
<b>VPP</b>	77,27%	[0,62 ; 0,88]	86,67%	[0,69 ; 0,96]	52,27%	[0,36 ; 0,67]	60,00%	[0,40 ; 0,77]
<b>VPN</b>	46,05%	[0,37 ; 0,54]	45,78%	[0,38 ; 0,53]	90,13%	[0,84 ; 0,94]	87,95%	[0,82 ; 0,92]
<b>Kappa</b>	0,14		0,14		0,44		0,43	
<b>McNemar</b>	P < 0,1 %		P < 0,1 %		NS		NS	

Les gammes entre crochets [ ] indiquent les valeurs de l'intervalle de confiance à 95%.

\*:référence; Se: sensibilité; Se: spécificité; VPP: valeur prédictive positive; VPN: valeur prédictive négative; Kappa: niveau de l'accord; NS: non significatif.

**Tableau 12 :** Estimation du meilleur seuil ELISA par rapport à IFAT (IFAT>0) dans les sérums de chevaux.

	<b>IFAT&gt;0* vs DO&gt;0,06</b>		<b>IFAT&gt;0* vs DO&gt;0,1015</b>		<b>IFAT&gt;0* vs DO&gt;0,1145</b>		<b>IFAT&gt;0* vs DO&gt;0,15</b>	
<b>Se</b>	97,73%	[0,88 ; 0,99]	97,73%	[0,88 ; 0,99]	97,73%	[0,88 ; 0,99]	90,91%	[0,78 ; 0,97]
<b>Sp</b>	3,95%	[0,02 ; 0,08]	18,42%	[0,12 ; 0,25]	24,34%	[0,17 ; 0,32]	40,79%	[0,32 ; 0,49]
<b>VPP</b>	22,75%	[0,17 ; 0,29]	25,75%	[0,19 ; 0,33]	27,22%	[0,20 ; 0,34]	30,77%	[0,23 ; 0,39]
<b>VPN</b>	85,71%	[0,42 ; 0,99]	96,55%	[0,82 ; 0,99]	97,37%	[0,86 ; 0,99]	93,94%	[0,85 ; 0,98]
<b>Kappa</b>	0,08		0,08		0,11		0,18	
<b>McNemar</b>	P < 0,1 %		P < 0,1 %		P < 0,1 %		P < 0,1 %	

Les gammes entre crochets [ ] indiquent les valeurs de l'intervalle de confiance à 95%.

\*:référence; Se: sensibilité; Se: spécificité; VPP: valeur prédictive positive; VPN: valeur prédictive négative; Kappa: niveau de l'accord.

**Tableau 13 :** Estimation du meilleur seuil ELISA par rapport à IFAT (IFAT>1:8) dans les sérums de chevaux.

	<b>IFAT&gt;1:8* vs DO&gt;0,06</b>		<b>IFAT&gt;1:8* vs DO&gt;0,1015</b>		<b>IFAT&gt;1:8* vs DO&gt;0,1145</b>		<b>IFAT&gt;1:8* vs DO&gt;0,15</b>	
<b>Se</b>	96,67%	[0,83 ; 0,99]	96,67%	[0,83 ; 0,99]	96,67%	[0,83 ; 0,99]	86,67%	[0,69 ; 0,96]
<b>Sp</b>	3,61%	[0,01 ; 0,07]	16,87%	[0,11 ; 0,23]	22,29%	[0,16 ; 0,29]	37,35%	[0,3 ; 0,45]
<b>VPP</b>	15,34%	[0,10 ; 0,21]	17,37%	[0,11 ; 0,24]	18,35%	[0,12 ; 0,25]	20,00%	[0,13 ; 0,27]
<b>VPN</b>	85,71%	[0,42 ; 0,99]	96,55%	[0,82 ; 0,99]	97,37%	[0,86 ; 0,99]	93,94%	[0,85 ; 0,98]
<b>Kappa</b>	0,00		0,04		0,06		0,10	
<b>McNemar</b>	P < 0,1 %		P < 0,1 %		P < 0,1 %		P < 0,1 %	

Les gammes entre crochets [ ] indiquent les valeurs de l'intervalle de confiance à 95%.

\*:référence; Se: sensibilité; Se: spécificité; VPP: valeur prédictive positive; VPN: valeur prédictive négative; Kappa: niveau de l'accord

Globalement, et comme dans les échantillons de viande de cheval, les valeurs kappa montrent qu'il y a un faible niveau d'agrément entre les tests ELISA et MAT dans les sérums de chevaux avec des valeurs kappa comprises entre 0,01 et 0,22 (Tableaux 6-9). Avec les seuils MAT > 0 et MAT > 1:10 et les seuils ELISA DO > 0,1145 et DO > 0,15, les paires discordantes étaient significativement ( $p < 0,1\%$ ) plus fréquentes dans les échantillons négatifs avec le test ELISA et positifs avec le test MAT que dans les échantillons positifs avec le test ELISA et négatifs avec le test MAT. Inversement, aux seuils MAT > 1:20 et MAT > 1:40 et pour tous les seuils ELISA (sauf pour DO > 0,15 avec MAT > 1:20), les paires discordantes étaient significativement ( $p < 0,1\%$ ) plus fréquentes dans les échantillons positifs avec le test ELISA et négatifs avec le test MAT que dans les échantillons négatifs avec le test ELISA et positifs avec le test MAT.

A partir de ces résultats, il apparaît que les meilleurs seuils sont DO > 0,1145 pour le test ELISA et MAT > 0 ou MAT > 1:10 pour le test MAT dans les sérums de cheval ce qui est en accord avec nos résultats dans les jus de viande pour ces deux tests.

Les valeurs kappa entre IFAT et ELISA puis entre IFAT et MAT dans les sérums de cheval se situaient entre 0 et 0,44 (Tableaux 10-13). Les valeurs kappa étaient en général faibles (de 0 à 0,18) indiquant un faible agrément entre ces techniques sauf quand le seuil MAT > 1:40 était utilisé en comparaison avec IFAT aux deux seuils IFAT > 0 et IFAT > 1:8 (kappa = 0,44 et 0,43 respectivement, Tableau 11). Cependant, cet agrément n'était bon que pour les échantillons négatifs avec les deux techniques, ce qui suggère que le test IFAT et le test MAT avec un seuil MAT > 1:40 ont une faible sensibilité. La faible sensibilité du test IFAT a également été confirmée par le test McNemar qui montre des paires discordantes significativement plus fréquentes dans les échantillons positifs avec ELISA (aux quatre seuils de DO) ou MAT (tous les seuils MAT sauf MAT > 1:40) et négatifs avec IFAT (seuils IFAT > 0 et > 1:8).

### 3.4. Résultats des bioessais chez la souris

Aucune souche de *T. gondii* n'a été isolée chez la souris après inoculation de 118 viandes de chevaux dont 97 avec un résultat positif en CM-PCR et 21 avec un résultat négatif en CM-PCR (Annexe 1).

## 4. Discussion

En France depuis 2006, on observe une nette régression des importations de viande chevaline qui se traduit par une diminution de plus de 30% par rapport aux années 1995-2005 (FranceAgriMer 2013). Le recul des importations est justifié par la forte diminution de la consommation de cette viande par les français passant de 1,64 kg /hab./an entre 1970 et 1984 à environ 0,29kg/hab./an en 2011 (FranceAgriMer 2013).

En 2012, les chiffres nous montrent que plus de 60% des viandes nous parviennent directement du continent américain et 34% nous parviennent de pays européens dont 12% de Belgique. En fait la viande de cheval importée de Belgique provient elle aussi du continent américain car la Belgique joue un rôle de plaque tournante dans le commerce de la viande chevaline en exportant de grandes quantités de viandes qui sont importées du continent américain. Les deux principaux pays exportateurs de viande de cheval sont l'Argentine et le Canada qui représentent 37% et 23% de la viande de cheval importée en France en 2010, respectivement. Dans notre étude, 231 échantillons de viande de cheval ont été achetés dans les supermarchés en France : 40% provenaient d'Argentine et 20% du Canada. Notre échantillonnage n'est cependant probablement pas représentatif car il existe une incertitude sur l'origine réelle des chevaux. Par exemple, un cheval exporté à partir du Canada peut en fait avoir passé l'essentiel de sa vie en Argentine. Il y a également beaucoup d'échantillons pour lesquels nous n'avons pas pu récupérer l'information concernant le pays d'origine car elle était absente sur les barquettes vendues dans les supermarchés. Les morceaux de viande achetés dans les supermarchés ont tous une traçabilité via des codes à barre et l'origine peut donc être connue. Pour les récupérer il faut l'accord des distributeurs et remonter la filière, ce qui est possible lorsque les études sont initiées à la demande d'organismes officiels de contrôle. Ce n'était pas le cas dans cette étude, ce qui limite la portée de nos résultats notamment vis à vis des autorités sanitaires.

Notre objectif principal était de détecter l'ADN de *T. gondii* avec la technique de capture magnétique CM-PCR dans la viande de cheval destinée à la consommation humaine et évaluer la performance des tests sérologiques MAT et ELISA dans les jus de viande de ces échantillons.

Les données de séroprévalence peuvent donner une indication du risque de la toxoplasmose humaine par la consommation de viande d'une espèce animale uniquement si la

détection d'anticorps spécifiques et la présence de kystes tissulaires ont une forte corrélation dans cette espèce animale (Opsteegh et al., 2011). Cette corrélation est excellente dans certaines espèces animales comme les porcs et les moutons (Gamble et al., 2005 ; Dubey et al., 2008), faible chez d'autres espèces animales comme les bovins (Opsteegh et al., 2011) et totalement inconnue dans la grande majorité des espèces animales.

Nous avons vu dans la première partie qu'il n'y a pas de test de référence validé chez le cheval pour estimer la séroprévalence de *T. gondii* chez cette espèce animale et les performances des tests sérologiques classiques utilisés pour détecter les anticorps anti-*T. gondii*, comme ELISA, DAT, IFAT, IHAT, LAT, MAT et SFDT n'ont jamais été évalués chez le cheval. Cependant, il est de pratique courante d'utiliser un test avec un cutoff choisi arbitrairement pour évaluer la séroprévalence de *T. gondii*, sans évaluer la sensibilité, la spécificité, et le niveau d'agrément avec d'autres tests. Ce problème avait déjà été soulevé par J.P. Dubey il y a de nombreuses années quand il rapportait qu'il n'y avait pas de corrélation entre le MAT et le SFDT pour détecter *T. gondii* chez les chevaux destinés à la consommation humaine aux USA (Dubey et al., 1999).

Nous avons évalué les performances des tests MAT et ELISA dans le jus des viandes provenant de 231 échantillons de viandes chevalines en les comparant avec la détection de l'ADN toxoplasmique par CM-PCR dans ces mêmes échantillons. Une grande sensibilité et spécificité sont nécessaires pour identifier un test de référence afin de savoir quels sont les échantillons vraiment infectés de ceux qui ne le sont pas. Pour l'évaluation des tests sérologiques dans les échantillons de viande de cheval, le test CM-PCR a été considéré comme le test de référence dans cette étude parce que la détection de l'ADN de *T. gondii* dans les échantillons de viande de cheval révèle toujours, en l'absence de contamination croisée, la présence de *T. gondii*. Toutefois, l'absence de détection de l'ADN de *T. gondii* ne signifie pas obligatoirement que le cheval n'a pas été infecté par le parasite car la distribution des kystes est non homogène et faible dans les tissus musculaires (Opsteegh et al., 2011). Ainsi, la sensibilité du test CM-PCR peut être remise en question comme test référence dans cette étude. Bien que nous n'ayons utilisé que 150 grammes de viande pour l'analyse, la sensibilité de la CM-PCR peut cependant être considérée comme acceptable car la limite de détection de cette technique a été estimée à 230 tachyzoïtes par 100 grammes de viande, rendant possible la détection d'un kyste de *T. gondii* dans 100 grammes de viande (Opsteegh et al., 2010). Une perte de sensibilité avec le test CM-PCR peut aussi être suggérée sur le plan technique car la

capture de l'ADN toxoplasmique n'a été réalisée qu'à partir de 50 mL de produit de digestion sur un total de 250 mL, en accord avec le protocole initialement décrit (Opsteegh et al., 2010).

Les bioessais chez la souris ou le chat sont les gold-standards classiques pour évaluer la présence de *T. gondii* dans les tissus animaux. Avant le début de l'étude sur les 231 échantillons de viande de cheval, nous avons validé la technique de bioessai chez la souris en infectant expérimentalement 4 lots de viandes de cheval avec 1, 5, 10 et 100 kystes de *T. gondii* de la souche PRU, respectivement. Nous avons ensuite procédé à leurs digestions et inoculations aux souris comme cela a été décrit précédemment (Dubey, 1998). Toutes les souris étaient infectées 10 jours p.i. y compris celles inoculées avec 1 kyste de *T. gondii*. Nous avons réalisé les bioessais chez la souris dans notre étude dans le but d'isoler des souches de *T. gondii* à partir de la viande de cheval et de pouvoir les géotyper par la suite. Les bioessais, du fait de leur longueur et de l'encombrement qu'ils entraînent dans une animalerie, sont peu adaptés aux grandes séries d'échantillons et n'ont été réalisés en priorité que pour les viandes qui se sont révélées positives en CM-PCR dans notre étude. Nous n'avons isolé aucune souche à partir de 117 échantillons de viande de cheval digérés et inoculés aux souris. Cela signifie que les bioessais chez la souris sont beaucoup moins sensibles que le test CM-PCR pour la détection de *T. gondii* dans des échantillons de viande de cheval et valide donc *a posteriori* notre choix de CM-PCR comme test de référence. Les valeurs de Ct (cycle threshold) de CM-PCR étaient très élevés dans les échantillons de viande de cheval (médiane = 38,59) ce qui indique une très faible concentration d'ADN toxoplasmique qui est connue pour être associée à une faible sensibilité dans les bioessais chez la souris (Filisetti et al., 2010).

Comme chez les bovins, il semble donc être très difficile d'isoler des souches de *T. gondii* à partir de la viande de cheval sans doute parce que la distribution des kystes est très faible dans les muscles squelettiques (Al-Khalidi et Dubey, 1979 ; Dubey et Jones, 2008). D'autres tissus de chevaux tels que le cerveau, le cœur, ou le diaphragme recueillis dans les abattoirs pourraient avoir un nombre de kystes de *T. gondii* plus élevé que dans les muscles squelettiques et pourraient donc accroître la sensibilité des bioessais, comme cela a été rapporté dans une étude en Egypte (Shaapan et Ghazy, 2007). Une étude récente réalisée au Brésil reporte que seulement une souche a été isolée à partir de 69 viandes d'équidés testées par bioessais utilisant 10 souris par échantillon (Gennari et al., 2015).

Nos résultats indiquent un niveau d'agrément faible entre CM-PCR et ELISA ou MAT à différents seuils identifiés par l'analyse des courbes ROC dans les échantillons de viande de cheval. Le test McNemar a montré que, pour les seuils ELISA  $DO > 0,06$ ,  $DO > 0,1015$ ,  $DO > 0,1145$ , et le seuil MAT  $> 0$ , les paires discordantes étaient significativement plus fréquentes dans les échantillons négatifs avec CM-PCR et positifs avec ELISA ou MAT que dans les échantillons positifs avec CM-PCR et négatifs avec ELISA ou MAT. Ce résultat peut s'expliquer par la sensibilité limitée de la CM-PCR dans les échantillons de viande de cheval à cause de la distribution faible et inhomogène des kystes de *T. gondii* dans les tissus musculaires. La prévalence de *T. gondii* dans les échantillons de viande de cheval a été estimée à 42,86 % avec le test CM-PCR. Nos résultats suggèrent que les seuils avec la meilleure balance sensibilité / spécificité sont  $DO > 0,1015$  ou  $DO > 0,1145$  pour le test ELISA et MAT  $> 0$  pour le test MAT dans les échantillons de viande de cheval. Pour ces seuils, la sensibilité peut atteindre une valeur maximale de 65,66% et la spécificité une valeur maximale de 48,48%, ce qui est très faible en comparaison avec d'autres espèces animales comme le porc ou le mouton chez lesquelles les valeurs de sensibilité et spécificité sont au-dessus de 85% pour MAT et ELISA (Gamble et al., 2005, Shaapan et al., 2008, Mainar-Jaime et al., 2007).

Parce que la quantité d'anticorps dans les jus de viande est plus faible que dans les sérums et parce que cette quantité dépend du type de viandes à partir desquelles ils ont été extraits (Wallander et al., 2015), nous avons aussi évalué les performances du MAT, de l'ELISA et de l'IFAT dans 196 sérums de chevaux prélevés à l'Institut Français du Cheval et de l'Équitation. L'IFAT s'est révélé le test le moins sensible. Les meilleurs seuils pour le test ELISA étaient  $DO > 0,1145$  et pour le MAT était MAT  $> 0$  ou MAT  $> 1:10$ . Ces seuils sont en accord avec les seuils retenus pour les jus de viande ( $DO > 0,1015$  ou  $DO > 0,1145$  pour ELISA et MAT  $> 0$ ). L'évaluation de la sensibilité et la spécificité des tests ELISA et MAT dans les sérums de chevaux était médiocre, mais plus élevé que dans les jus de viande, environ 80% et 60% respectivement. Dans le sérum de cheval, le seuil MAT  $> 1:10$  peut être préférable au seuil MAT  $> 0$  car le jus de viande est connu pour être dix fois moins riche en anticorps que le sérum. Différentes études ont rapportées des séroprévalences chez le cheval en utilisant le même kit commercial que nous avons utilisé (IDvet) avec le seuil de positivité conseillé par le fabricant (Dărăbuș et al., 2011 ; Roqueplo et al., 2011 ; Lee et al., 2014). Les résultats de notre étude suggèrent que le seuil pour le test ELISA (DO) recommandé par le



fabricant (IDvet) est trop élevé ( $0,35 < DO < 0,4$ ) dans le sérum de cheval et peut conduire à une sous-estimation de la séroprévalence.

## 5. Conclusion

En conclusion, il est difficile d'évaluer le risque d'infection toxoplasmique après consommation de viande chevaline car des données fiables de séroprévalence ne sont pas disponibles. Les tests sérologiques manquent de sensibilité, spécificité et d'agrément entre eux et il n'y a pas de corrélation avec la présence d'ADN de *T. gondii* dans les muscles squelettiques des chevaux. Nous avons détecté l'ADN toxoplasmique dans 43% des échantillons de viande de cheval dans cette étude, ce qui n'est pas négligeable, et peut être sous-estimé à cause du manque de sensibilité de la CM-PCR. Cependant, l'ADN de *T. gondii* était toujours présent à des concentrations très faibles et aucune souche viable de *T. gondii* n'a été isolée avec les bioessais chez la souris. Ces résultats préliminaires suggèrent que le risque d'infection toxoplasmique est faible avec la consommation de la viande de cheval, mais ne devrait pas être négligée en France parce que la viande de cheval est importée, essentiellement fraîche, de pays d'Amérique latine où des souches atypiques et pathogènes sont plus fréquentes qu'en Europe. Pour éviter tout risque de toxoplasmose sévère, le consommateur doit faire cuire la viande de cheval à une température interne supérieure à 70 ° C dans toutes les parties de la viande, pour détruire les kystes de *T. gondii* s'ils sont présents.

## Références bibliographiques

1. Ajzenberg D, Banuls AL, Su C, Dumètre A, Demar M, Carme B, Dardé ML. 2004. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*, 34(10), 1185-96.
2. Ajzenberg D, Collinet F, Mercier A, Vignoles P, Dardé ML. 2010. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol*, 48(12), 4641-5.
3. Ajzenberg D, Dumètre A, Dardé ML. 2005. Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol*, 43(4), 1940-3.
4. Al-Khalidi NW, Dubey JP. 1979. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in horses. *J Parasitol*, 65(2), 331-4.
5. Al-Khalidi NW, Weisbrode SE, Dubey JP. 1980. Pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts to ponies. *Am J Vet Res*, 41(9), 1549-51.
6. Anti-Vivisezione L-L. 2008. Trattare con cura: campagna contro il trasporto di animali vivi su lunghe distanze.
7. Aubert D, Ajzenberg D, Richomme C, Gilot-Fromont E, Terrier ME, de Gevigney C, Game Y, Maillard D, Gibert P, Dardé ML, Villena I. 2010. Molecular and biological characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in France. *Vet Parasitol*, 171(3-4), 346-9.
8. Biocca E. 1956. [Some notes on classification of Protozoa and the usefulness of creating a new class of Protozoa]. *Rev Bras Malariol Doencas Trop*, 8(1), 91-102.
9. Birgisdóttir A, Asbjörnsdóttir H, Cook E, Gislason D, Jansson C, Olafsson I, Gislason T, Jogi R, Thjodleifsson B. 2006. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Sweden, Estonia and Iceland. *Scand J Infect Dis*, 38(8), 625-31.
10. Brown M, Lappin MR, Brown JL, Munkhtsog B, Swanson WF. 2005. Exploring the ecologic basis for extreme susceptibility of Pallas' cats (*Otocolobus manul*) to fatal toxoplasmosis. *J Wildl Dis*, 41(4), 691-700.
11. Buxton D, Innes EA. 1995. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitology*, 110 Suppl, S11-6.
12. Cabral AD, D'Auria SR, Camargo MC, Rosa AR, Sodré MM, Galvão-Dias MA, Jordão LR, Dubey JP, Gennari SM, Pena HF. 2014. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in bats from Sao Paulo city, Brazil. *Vet Parasitol*, 206(3-4), 293-6.
13. Dabritz HA, Conrad PA. 2010. Cats and *Toxoplasma*: implications for public health.

- Zoonoses Public Health, 57(1), 34-52.
14. Dărăbuș G, Hotea I, Oprescu I, Morariu S, Brudiu I, Olariu RT. 2011. Toxoplasmosis seroprevalence in cats and sheep from Western Romania. Rev Med Vet, 162, 316-320.
  15. Dardé ML. 1996. Biodiversity in *Toxoplasma gondii*. Curr Top Microbiol Immunol, 219, 27-41.
  16. de Oliveira E, de Albuquerque PP, de Souza Neto OL, Faria EB, Junior JW, Mota RA. 2013. Occurrence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in mules and donkeys in the northeast of Brazil. J Parasitol, 99(2), 343-5.
  17. De Salvador-Guillouet F, Ajzenberg D, Chaillou-Opitz S, Saint-Paul MC, Dunais B, Dellamonica P, Marty P. 2006. Severe pneumonia during primary infection with an atypical strain of *Toxoplasma gondii* in an immunocompetent young man. J Infect, 53(2), e47-50.
  18. Derouin F, Pelloux H, Parasitology ESGoC. 2008. Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. Clin Microbiol Infect, 14(12), 1089-101.
  19. Desmonts G, Remington JS. 1980. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. J Clin Microbiol, 11(6), 562-8.
  20. DG A. 1991. Practical statistics for medical research. London pp.
  21. Disko R, Braveny I, Vogel P. 1971. [Studies on the occurrence of *Toxoplasma gondii* in the human ejaculate]. Z Tropenmed Parasitol, 22(4), 391-6.
  22. Dubey JP. 1985. Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in tissues of equids fed oocysts. Am J Vet Res, 46(8), 1753-4.
  23. Dubey JP. 1988. Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. Am J Vet Res, 49(6), 910-3.
  24. Dubey JP. 1997. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. J Eukaryot Microbiol, 44(6), 592-602.
  25. Dubey JP. 1997. Survival of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in 0.85-6% NaCl solutions at 4-20 C. J Parasitol, 83(5), 946-9.
  26. Dubey JP. 1997. Validation of the specificity of the modified agglutination test for toxoplasmosis in pigs. Vet Parasitol, 71(4), 307-10.
  27. Dubey JP. 1998. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. Vet Parasitol, 74(1), 75-7.

28. Dubey JP. 2001. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. *J Parasitol*, 87(1), 215-9.
29. Dubey JP. 2008. The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol*, 55(6), 467-75.
30. Dubey JP. 2010. *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. *Zoonoses Public Health*, 57(1), 60-73.
31. Dubey JP, Beattie CP. 1988. *Toxoplasmosis of Animals and Man*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, P. 220.
32. Dubey JP, Camargo ME, Ruff MD, Wilkins GC, Shen SK, Kwok OC, Thulliez P. 1993. Experimental toxoplasmosis in turkeys. *J Parasitol*, 79(6), 949-52.
33. Dubey JP, Carpenter JL. 1993. Unidentified *Toxoplasma*-like tissue cysts in the brains of three cats. *Vet Parasitol*, 45(3-4), 319-21.
34. Dubey JP, Jones JL. 2008. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int J Parasitol*, 38(11), 1257-78.
35. Dubey JP, Kotula AW, Sharar A, Andrews CD, Lindsay DS. 1990. Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. *J Parasitol*, 76(2), 201-4.
36. Dubey JP, Lindsay DS. 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol*, 67(1-2), 1-59.
37. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev*, 11(2), 267-99.
38. Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. 1970. *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. *J Am Vet Med Assoc*, 157(11), 1767-70.
39. Dubey JP, Ruff MD, Camargo ME, Shen SK, Wilkins GL, Kwok OC, Thulliez P. 1993. Serologic and parasitologic responses of domestic chickens after oral inoculation with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Am J Vet Res*, 54(10), 1668-72.
40. Dubey JP, Sundar N, Hill D, Velmurugan GV, Bandini LA, Kwok OC, Majumdar D, Su C. 2008. High prevalence and abundant atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from lambs destined for human consumption in the USA. *Int J Parasitol*, 38(8-9), 999-1006.
41. Dubey JP, Thulliez P, Weigel RM, Andrews CD, Lind P, Powell EC. 1995. Sensitivity

- and specificity of various serologic tests for detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sows. Am J Vet Res, 56(8), 1030-6.
42. Dubey JP, Velmurugan GV, Alvarado-Esquivel C, Alvarado-Esquivel D, Rodriguez-Pena S, Martinez-Garcia S, Gonzalez-Herrera A, Ferreira LR, Kwok OC, Su C. 2009. Isolation of *Toxoplasma gondii* from animals in Durango, Mexico. J Parasitol, 95(2), 319-22.
  43. Dubey JP, Venturini MC, Venturini L, McKinney J, Pecoraro M. 1999c. Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses from Argentina. Vet Parasitol, 86(1), 59-62.
  44. Dupont CD, Christian DA, Hunter CA. 2012. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. Semin Immunopathol, 34(6), 793-813.
  45. Elbez-Rubinstein A, Ajzenberg D, Dardé ML, Cohen R, Dumètre A, Yera H, Gondon E, Janaud JC, Thulliez P. 2009. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. J Infect Dis, 199(2), 280-5.
  46. Fabiani S, Pinto B, Bonuccelli U, Bruschi F. 2015. Neurobiological studies on the relationship between toxoplasmosis and neuropsychiatric diseases. J Neurol Sci.
  47. FAO-OMS. 2014. Prévention et maîtrise des salmonelles dans les élevages de porcs - Commission du codex alimentarius.
  48. Fauci AS, Dennis L, Kasper, Hauser SL. 2008. Harrison's Principles of Internal Medicine. 17th ed pp.
  49. Ferguson DJ. 2002. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? Trends Parasitol, 18(8), 355-9.
  50. Filisetti D, Cocquerelle V, Pfaff A, Villard O, Candolfi E. 2010. Placental testing for *Toxoplasma gondii* is not useful to diagnose congenital toxoplasmosis. Pediatr Infect Dis J, 29(7), 665-7.
  51. Flegr J. 2013. How and why *Toxoplasma* makes us crazy. Trends Parasitol, 29(4), 156-63.
  52. FranceAgriMer. 2009. Les cahiers de FranceAgriMer 2009 / Données statistiques / Elevage : Filière chevaline.
  53. FranceAgriMer. 2011. Le commerce international de la viande chevaline : deux décennies d'échanges.
  54. FranceAgriMer. 2013. Les cahiers de FranceAgriMer : Les filières de l'élevage français.
  55. FranceAgriMer. 2014. Les filières animales terrestres et aquatiques : Bilan 2013 et

Perspectives 2014.

56. FranceAgriMer. 2015. La production de viande chevaline en France des années 50 à aujourd'hui.
57. Frank RK. 2001. An outbreak of toxoplasmosis in farmed mink (*Mustela vison* S.). *J Vet Diagn Invest*, 13(3), 245-9.
58. Frenkel JK, Dubey JP. 1973. Effects of freezing on the viability of *Toxoplasma* oocysts. *J Parasitol*, 59(3), 587-8.
59. Fusco G, Rinaldi L, Guarino A, Proroga YT, Pesce A, Giuseppina de M, Cringoli G. 2007. *Toxoplasma gondii* in sheep from the Campania region (Italy). *Vet Parasitol*, 149(3-4), 271-4.
60. Gajria B, Bahl A, Brestelli J, Dommer J, Fischer S, Gao X, Heiges M, Iodice J, Kissinger JC, Mackey AJ, Pinney DF, Roos DS, Stoeckert CJ, Jr., Wang H, Brunk BP. 2008. ToxoDB: an integrated *Toxoplasma gondii* database resource. *Nucleic Acids Res*, 36(Database issue), D553-6.
61. Gamble HR, Andrews CD, Dubey JP, Webert DW, Parmley SF. 2000. Use of recombinant antigens for detection of *Toxoplasma gondii* infection in swine. *J Parasitol*, 86(3), 459-62.
62. Gamble HR, Dubey JP, Lambillotte DN. 2005. Comparison of a commercial ELISA with the modified agglutination test for detection of *Toxoplasma* infection in the domestic pig. *Vet Parasitol*, 128(3-4), 177-81.
63. Gangneux FR, Dardé ML. 2012. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev*, 25(2), 264-296.
64. Garcia JL, Navarro IT, Vidotto O, Gennari SM, Machado RZ, da Luz Pereira AB, Sinhorini IL. 2006. *Toxoplasma gondii*: comparison of a rhoptry-ELISA with IFAT and MAT for antibody detection in sera of experimentally infected pigs. *Exp Parasitol*, 113(2), 100-5.
65. Gennari SM, Esmerini PO, Lopes MG, Soares HS, Vitaliano SN, Cabral AD, Pena HF, Horta MC, Cavalcante PH, Fortes KP, Villalobos EM. 2015. Occurrence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and its isolation and genotyping in donkeys, mules, and horses in Brazil. *Vet Parasitol*.
66. Goldman M. 1957. Staining *toxoplasma gondii* with fluorescein-labelled antibody. II. A new serologic test for antibodies to *Toxoplasma* based upon inhibition of specific staining. *J Exp Med*, 105(6), 557-73.
67. Hagemoser WA, Dubey JP, Thompson JR. 1990. Acute toxoplasmosis in a camel. *J Am*

- Vet Med Assoc, 196(2), 347.
68. Herwaldt BL. 2001. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. Clin Microbiol Rev, 14(4), 659-88, table of contents.
  69. Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP, Lunney JK, Gamble HR. 2006. Comparison of detection methods for *Toxoplasma gondii* in naturally and experimentally infected swine. Vet Parasitol, 141(1-2), 9-17.
  70. Homan WL, Vercammen M, De Braekeleer J, Verschueren H. 2000. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. Int J Parasitol, 30(1), 69-75.
  71. Hutchison WM. 1965. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. Nature, 206(987), 961-2.
  72. Joiner KA, Roos DS. 2002. Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. J Cell Biol, 157(4), 557-63.
  73. Jones JL, Dubey JP. 2012. Foodborne toxoplasmosis. Clin Infect Dis, 55(6), 845-51.
  74. Jones TC, Yeh S, Hirsch JG. 1972. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. I. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. J Exp Med, 136(5), 1157-72.
  75. K. WLMek. 2014. *Toxoplasma gondii* The model of Apicomplexan : Perspectives and methods. 2nd edition ed. 1085 pp.
  76. Khairat R, Ball M, Chang CC, Bianucci R, Nerlich AG, Trautmann M, Ismail S, Shanab GM, Karim AM, Gad YZ, Pusch CM. 2013. First insights into the metagenome of Egyptian mummies using next-generation sequencing. J Appl Genet, 54(3), 309-25.
  77. Khan A, Dubey JP, Su C, Ajioka JW, Rosenthal BM, Sibley LD. 2011. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. Int J Parasitol, 41(6), 645-55.
  78. Khan A, Fux B, Su C, Dubey JP, Dardé ML, Ajioka JW, Rosenthal BM, Sibley LD. 2007. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. Proc Natl Acad Sci U S A, 104(37), 14872-7.
  79. Khan A, Fux B, Su C, Dubey JP, Dardé ML, Ajioka JW, Rosenthal BM, Sibley LD. 2007. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. Proc Natl Acad Sci U S A, 104(37), 14872-7.
  80. Lee SH, Lee SE, Seo MG, Goo YK, Cho KH, Cho GJ, Kwon OD, Kwak D, Lee WJ. 2014. Evidence of *Toxoplasma gondii* Exposure among Horses in Korea. J Vet Med Sci.

81. Lelu M, Villena I, Dardé ML, Aubert D, Geers R, Dupuis E, Marnef F, Poulle ML, Gotteland C, Dumètre A, Gilot-Fromont E. 2012. Quantitative estimation of the viability of *Toxoplasma gondii* oocysts in soil. *Appl Environ Microbiol*, 78(15), 5127-32.
82. Lind P, Haugegaard J, Wingstrand A, Henriksen SA. 1997. The time course of the specific antibody response by various ELISAs in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Vet Parasitol*, 71(1), 1-15.
83. Lunden A, Ugglå A. 1992. Infectivity of *Toxoplasma gondii* in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking. *Int J Food Microbiol*, 15(3-4), 357-63.
84. Macháčová T, Bártová E, Di Loria A, Sedlak K, Mariani U, Fusco G, Fulgione D, Veneziano V, Dubey JP. 2014. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in donkeys (*Equus asinus*) in Italy. *J Vet Med Sci*, 76(2), 265-7.
85. Magras C, Federighi M, Soule C. 1997. [The dangers for public health connected to the consumption of horse meat]. *Rev Sci Tech*, 16(2), 554-63.
86. Mainar-Jaime RC, Barberan M. 2007. Evaluation of the diagnostic accuracy of the modified agglutination test (MAT) and an indirect ELISA for the detection of serum antibodies against *Toxoplasma gondii* in sheep through Bayesian approaches. *Vet Parasitol*, 148(2), 122-9.
87. Maloney ED, Kaufman HE. 1964. Multiplication and Therapy of *Toxoplasma gondii* in Tissue Culture. *J Bacteriol*, 88, 319-21.
88. Mancianti F, Nardoni S, Papini R, Mugnaini L, Martini M, Altomonte I, Salari F, D'Ascenzi C, Dubey JP. 2014. Detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* DNA in the blood and milk of naturally infected donkeys (*Equus asinus*). *Parasit Vectors*, 7, 165.
89. Maubon D, Ajzenberg D, Brenier-Pinchart MP, Dardé ML, Pelloux H. 2008. What are the respective host and parasite contributions to toxoplasmosis? *Trends Parasitol*, 24(7), 299-303.
90. Maubon D, Ajzenberg D, Brenier-Pinchart MP, Dardé ML, Pelloux H. 2008. What are the respective host and parasite contributions to toxoplasmosis? *Trends Parasitol*, 24(7), 299-303.
91. McNemar Q. 1947. Note on the sampling error of the difference between correlated proportions or percentages. *Psychometrika*, 12(2), 153-7.
92. Mercier A, Ajzenberg D, Devillard S, Demar MP, de Thoisy B, Bonhabau H, Collinet F, Boukhari R, Blanchet D, Simon S, Carme B, Dardé ML. 2011. Human impact on



- genetic diversity of *Toxoplasma gondii*: example of the anthropized environment from French Guiana. *Infect Genet Evol*, 11(6), 1378-87.
93. Miman O, Kusbeci OY, Aktepe OC, Cetinkaya Z. 2010. The probable relation between *Toxoplasma gondii* and Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 475(3), 129-31.
  94. Moncada PA, Montoya JG. 2012. Toxoplasmosis in the fetus and newborn: an update on prevalence, diagnosis and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 10(7), 815-28.
  95. Montoya JG, Liesenfeld O. 2004. Toxoplasmosis. *Lancet*, 363(9425), 1965-76.
  96. Ngoungou EB, Bhalla D, Nzoghe A, Dardé ML, Preux PM. 2015. Toxoplasmosis and epilepsy-systematic review and meta analysis. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(2), e0003525.
  97. Nicolle CM, L. 1908. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *CR Acad Sci*, 147, No. 763.
  98. Niebuhr DW, Millikan AM, Cowan DN, Yolken R, Li Y, Weber NS. 2008. Selected infectious agents and risk of schizophrenia among U.S. military personnel. *Am J Psychiatry*, 165(1), 99-106.
  99. Opsteegh M, Langelaar M, Sprong H, den Hartog L, De Craeye S, Bokken G, Ajzenberg D, Kijlstra A, van der Giessen J. 2010. Direct detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in meat samples using magnetic capture and PCR. *Int J Food Microbiol*, 139(3), 193-201.
  100. Opsteegh M, Teunis P, Zuchner L, Koets A, Langelaar M, van der Giessen J. 2011. Low predictive value of seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle for detection of parasite DNA. *Int J Parasitol*, 41(3-4), 343-54.
  101. Pedersen MG, Stevens H, Pedersen CB, Nørgaard-Pedersen B, Mortensen PB. 2011. *Toxoplasma* infection and later development of schizophrenia in mothers. *Am J Psychiatry*, 168(8), 814-21.
  102. Pomares C, Ajzenberg D, Bornard L, Bernardin G, Haseine L, Dardé ML, Marty P. 2011. Toxoplasmosis and horse meat, France. *Emerg Infect Dis*, 17(7), 1327-8.
  103. Reid AJ, Vermont SJ, Cotton JA, Harris D, Hill-Cawthorne GA, Konen-Waisman S, Latham SM, Mourier T, Norton R, Quail MA, Sanders M, Shanmugam D, Sohal A, Wasmuth JD, Brunk B, Grigg ME, Howard JC, Parkinson J, Roos DS, Trees AJ, Berriman M, Pain A, Wastling JM. 2012. Comparative genomics of the apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: Coccidia differing in host range and transmission strategy. *PLoS Pathog*, 8(3), e1002567.
  104. Roqueplo C, Halos L, Cabre O, Davoust B. 2011. *Toxoplasma gondii* in wild and domestic animals from New Caledonia. *Parasite*, 18(4), 345-8.

105. Sabin AB, Feldman HA. 1948. Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (*Toxoplasma*). *Science*, 108(2815), 660-3.
106. Sabin AB, Olitsky PK. 1937. *Toxoplasma* and Obligate Intracellular Parasitism. *Science*, 85(2205), 336-8.
107. Seefeldt SL, Kirkbride CA, Dubey JP. 1989. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody test, and direct agglutination test for detecting *Toxoplasma gondii* antibodies in naturally aborted ovine fetuses. *J Vet Diagn Invest*, 1(2), 124-7.
108. Shaapan RM, El-Nawawi FA, Tawfik MA. 2008. Sensitivity and specificity of various serological tests for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sheep. *Vet Parasitol*, 153(3-4), 359-62.
109. Shaapan RM, El-Nawawi FA, Tawfik MA. 2008. Sensitivity and specificity of various serological tests for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sheep. *Vet Parasitol*, 153(3-4), 359-62.
110. Shobab L, Pleyer U, Johnsen J, Metzner S, James ER, Torun N, Fay MP, Liesenfeld O, Grigg ME. 2013. *Toxoplasma* serotype is associated with development of ocular toxoplasmosis. *J Infect Dis*, 208(9), 1520-8.
111. Sobanski V, Ajzenberg D, Delhaes L, Bautin N, Just N. 2013. Severe toxoplasmosis in immunocompetent hosts: be aware of atypical strains. *Am J Respir Crit Care Med*, 187(10), 1143-5.
112. Sobanski V, Ajzenberg D, Delhaes L, Bautin N, Just N. 2013. Severe toxoplasmosis in immunocompetent hosts: be aware of atypical strains. *Am J Respir Crit Care Med*, 187(10), 1143-5.
113. Splendore A. 1908. Un nuovo protozoa parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Nota preliminare pel. *Rev Soc Sci Sao Paulo*, 3, 109-112.
114. Su C, Khan A, Zhou P, Majumdar D, Ajzenberg D, Dardé ML, Zhu XQ, Ajioka JW, Rosenthal BM, Dubey JP, Sibley LD. 2012. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(15), 5844-9.
115. Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu XQ, Dubey JP. 2010. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*, 137(1), 1-11.
116. Tassi P. 2007. *Toxoplasma gondii* infection in horses. A review. *Parassitologia*, 49(1-2),

7-15.

117. Tenter AM. 2009. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. Mem Inst Oswaldo Cruz, 104(2), 364-9.
118. Thornton RN, Cook TG. 1986. A congenital *Toxoplasma*-like disease in ferrets (*Mustela putorius furo*). N Z Vet J, 34(3), 31-3.
119. Torrey EF, Bartko JJ, Lun ZR, Yolken RH. 2007. Antibodies to *Toxoplasma gondii* in patients with schizophrenia: a meta-analysis. Schizophr Bull, 33(3), 729-36.
120. Torrey EF, Bartko JJ, Yolken RH. 2012. *Toxoplasma gondii* and other risk factors for schizophrenia: an update. Schizophr Bull, 38(3), 642-7.
121. Wallander C, Frossling J, Vagsholm I, Burrells A, Lunden A. 2015. "Meat Juice" Is Not a Homogeneous Serological Matrix. Foodborne Pathog Dis.
122. Weinman D, Chandler AH. 1954. Toxoplasmosis in swine and rodents; reciprocal oral infection and potential human hazard. Proc Soc Exp Biol Med, 87(1), 211-6.
123. Yilmaz SM, Hopkins SH. 1972. Effects of different conditions on duration of infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. J Parasitol, 58(5), 938-9.
124. Yuan ZG, Luo SJ, Dubey JP, Zhou DH, Zhu YP, He Y, He XH, Zhang XX, Zhu XQ. 2013. Serological evidence of *Toxoplasma gondii* infection in five species of bats in China. Vector Borne Zoonotic Dis, 13(6), 422-4.

**Annexe 1** : Résultats de l'analyse moléculaire (CM-PCR) et sérologique (MAT et ELISA) sur les échantillons de viande de cheval.

<b>Echantillon</b>	<b>Origine</b>	<b>Type de viande</b>	<b>ELISA (DO)</b>	<b>MAT (dilution)</b>	<b>Bioessai (date)</b>	<b>CM-PCR (valeur Ct)</b>	<b>MAT-souris</b>
1	Argentine	Inconnu	0,1698	1:10	Réalisé (1/31/2013)	20/02/2013 (41,17)	Négatif
2	Mexique	Inconnu	0,17875	1:40	Réalisé (1/30/2013)	20/02/2013 (Négative)	Négatif
3	Canada	Inconnu	0,1265	1:10	Réalisé (1/31/2013)	20/02/2013 (Négative)	Négatif
4	Argentine	Inconnu	0,6608	1:20	Réalisé (1/30/2013)	20/02/2013 (36,20)	Négatif
5	Argentine	Inconnu	0,1915	1:10	Réalisé (1/30/2013)	20/02/2013 (39,85)	Négatif
6	Canada	Inconnu	0,0664	1:10	Réalisé (2/07/2013)	10/02/2013 (Négative)	Négatif
7	Canada	Inconnu	0,0931	1:10	Non réalisé	10/02/2013 (Négative)	Non réalisé
8	Canada	Inconnu	0,13495	1:10	Réalisé (1/30/2013)	20/02/2013 (40,14)	Négatif
9	Canada	Inconnu	0,11245	1:10	Non réalisé	20/02/2013 (Négative)	Non réalisé
10	Canada	Inconnu	0,7202	1:40	Réalisé (1/31/2013)	20/02/2013 (Négative)	Négatif
11	Mexique	Inconnu	0,0622	1:10	Non réalisé	22/02/2013 (Négative)	Non réalisé
12	France	Inconnu	0,10085	1:10	Réalisé (3/14/2013)	17/03/2013 (Négative)	Négatif
13	Canada	Inconnu	0,1472	1:10	Réalisé (3/14/2013)	17/03/2013 (Négative)	Négatif
14	France	Inconnu	0,0674	1:10	Réalisé (3/25/2013)	28/03/2013 (Négative)	Négatif
15	Mexique	Inconnu	0,0544	1:100	Réalisé (3/15/2013)	18/03/2013 (Négative)	Négatif
16	Mexique	Inconnu	0,0771	1:20	Réalisé (3/19/2013)	07/05/2013 (Négative)	Négatif
17	Canada	Inconnu	0,36375	1:40	Réalisé (3/19/2013)	07/05/2013 (Négative)	Négatif

<b>18</b>	Argentine	Inconnu	0,18455	1:10	Non réalisé	07/05/2013 (Négative)	Non réalisé
<b>19</b>	Argentine	Inconnu	0,2686	1:20	Non réalisé	07/05/2013 (Négative)	Non réalisé
<b>20</b>	Canada	Inconnu	0,06355	1:20	Réalisé (3/19/2013)	07/05/2013 (Négative)	Négatif
<b>21</b>	Argentine	Inconnu	0,0548	1:10	Non réalisé	07/05/2013 (Négative)	Non réalisé
<b>22</b>	France	Inconnu	0,11875	1:20	Non réalisé	07/05/2013 (40,33)	Non réalisé
<b>23</b>	Mexique	Inconnu	0,25185	1:10	Réalisé (3/25/2013)	28/03/2013 (Négative)	Négatif
<b>24</b>	Mexique	Inconnu	0,29595	1:10	Réalisé (3/25/2013)	28/03/2013 (Négative)	Négatif
<b>25</b>	Inconnu	Inconnu	0,10115	1:20	Non réalisé	07/05/2013 (Négative)	Non réalisé
<b>26</b>	Canada	Inconnu	0,132	1:400	Réalisé (3/12/2013)	15/03/2013 (Négative)	Négatif
<b>27</b>	Canada	Inconnu	0,0886	1:20	Réalisé (3/12/2013)	15/03/2013 (Négative)	Négatif
<b>28</b>	Canada	Inconnu	0,21	1:100	Réalisé (3/15/2013)	18/03/2013 (Négative)	Négatif
<b>29</b>	Canada	Inconnu	0,25785	1:40	Réalisé (3/17/2013)	20/03/2013 (Négative)	Négatif
<b>30</b>	Inconnu	Inconnu	0,3198	1:10	Réalisé (3/25/2013)	28/03/2013 (Négative)	Négatif
<b>31</b>	Argentine	Inconnu	0,26715	1:10	Non réalisé	07/05/2013 (Négative)	Non réalisé
<b>32</b>	Argentine	Inconnu	0,24395	1:10	Non réalisé	07/05/2013 (38,40)	Non réalisé
<b>33</b>	Canada	Faux filet	0,2282	1:10	Réalisé (3/12/2013)	15/03/2013 (Négative)	Négatif
<b>34</b>	Canada	Faux filet	0,18925	1:40	Réalisé (3/17/2013)	20/03/2013 (Négative)	Négatif
<b>35</b>	Canada	Faux filet	0,28675	1:100	Réalisé (3/17/2013)	20/03/2013 (Négative)	Négatif
<b>36</b>	France	Tranche	0,1839	1:10	Réalisé (4/30/2013)	30/04/2013 (43,09)	Négatif
<b>37</b>	Argentine	Faux filet	0,22415	Négatif	Non réalisé	30/04/2013 (Négative)	Non réalisé
<b>38</b>	Mexique	Hampe	0,15545	Négatif	Non réalisé	30/04/2013 (Négative)	Non réalisé

<b>39</b>	Mexique	Hampe	0,28705	Négatif	Non réalisé	30/04/2013 (Négative)	Non réalisé
<b>40</b>	Canada	Bavette	0,53955	Négatif	Non réalisé	07/05/2013 (Négative)	Non réalisé
<b>41</b>	Canada	Bavette	0,0893	Négatif	Non réalisé	07/05/2013 (Négative)	Non réalisé
<b>42</b>	Canada	Rumsteak	0,97195	Négatif	Non réalisé	07/05/2013 (Négative)	Non réalisé
<b>43</b>	Canada	Rumsteak	0,25675	Négatif	Réalisé (5/07/2013)	07/05/2013 (39,66)	Négatif
<b>44</b>	Canada	Rumsteak	0,0729	1:10	Non réalisé	07/05/2013 (Négative)	Non réalisé
<b>45</b>	Canada	Bavette	0,0677	Négatif	Non réalisé	07/05/2013 (Négative)	Non réalisé
<b>46</b>	Inconnu	Inconnu	0,10195	Négatif	Réalisé (6/05/2013)	05/06/2013 (39,22)	Négatif
<b>47</b>	Inconnu	Inconnu	0,0729	1:10	Réalisé (6/05/2013)	05/06/2013 (39,10)	Négatif
<b>48</b>	Inconnu	Inconnu	0,0821	1:10	Réalisé (6/05/2013)	05/06/2013 (42,18)	Négatif
<b>49</b>	Inconnu	Inconnu	0,1612	Négatif	Non réalisé	05/06/2013 (Négative)	Non réalisé
<b>50</b>	Inconnu	Inconnu	0,08135	Négatif	Non réalisé	05/06/2013 (Négative)	Non réalisé
<b>51</b>	Inconnu	Inconnu	0,3044	Négatif	Réalisé (6/05/2013)	05/06/2013 (38,15)	Négatif
<b>52</b>	Inconnu	Inconnu	0,05275	Négatif	Non réalisé	05/06/2013 (Négative)	Non réalisé
<b>53</b>	Inconnu	Inconnu	0,25915	Négatif	Réalisé (6/05/2013)	05/06/2013 (40,03)	Négatif
<b>54</b>	Canada	Biftecks	0,0726	1:10	Réalisé (7/29/2013)	29/07/2013 (36,47)	Négatif
<b>55</b>	Argentine	Faux filet	0,3148	Négatif	Réalisé (7/29/2013)	29/07/2013 (40,91)	Négatif
<b>56</b>	Argentine	Faux filet	0,0612	Négatif	Réalisé (7/29/2013)	29/07/2013 (41,01)	Négatif
<b>57</b>	Argentine	Faux filet	0,0872	Négatif	Réalisé (7/29/2013)	29/07/2013 (38,27)	Négatif
<b>58</b>	Argentine	Bavette	0,2098	1:100	Réalisé (12/12/2013)	11/12/2013 (38,43)	Négatif
<b>59</b>	Argentine	Bavette	0,0782	1:100	Réalisé (12/12/2013)	11/12/2013 (36,44)	Négatif

<b>60</b>	Argentine	Bavette	0,1657	1:100	Réalisé (12/12/2013)	11/12/2013 (40,18)	Négatif
<b>61</b>	Argentine	Faux filet	0,0901	Négatif	Réalisé (12/12/2013)	11/12/2013 (37,09)	Négatif
<b>62</b>	Argentine	Bavette	0,1575	1:400	Réalisé (12/12/2013)	11/12/2013 (38,20)	Négatif
<b>63</b>	Argentine	Faux filet	0,1893	Négatif	Réalisé (12/12/2013)	11/12/2013 (38,14)	Négatif
<b>64</b>	Argentine	Bavette	0,1400	1:100	Réalisé (12/12/2013)	11/12/2013 (37,91)	Négatif
<b>65</b>	Argentine	Faux filet	0,2628	1:400	Réalisé (12/12/2013)	11/12/2013 (37,85)	Négatif
<b>66</b>	Argentine	Faux filet	0,4352	1:100	Réalisé (12/12/2013)	11/12/2013 (37,54)	Négatif
<b>67</b>	Argentine	Bavette	0,1888	1:100	Réalisé (12/12/2013)	11/12/2013 (37,69)	Négatif
<b>68</b>	Argentine	Bavette	0,0722	Négatif	Non réalisé	19/12/2013 (Négative)	Non réalisé
<b>69</b>	Argentine	Bavette	0,0514	1:100	Non réalisé	19/12/2013 (Négative)	Non réalisé
<b>70</b>	Argentine	Bavette	0,5190	1:10	Non réalisé	19/12/2013 (Négative)	Non réalisé
<b>71</b>	Argentine	Faux filet	0,1772	1:20	Réalisé (12/20/2013)	19/12/2013 (38,46)	Négatif
<b>72</b>	Canada	Faux filet	0,0766	1:10	Réalisé (12/20/2013)	19/12/2013 (39,04)	Négatif
<b>73</b>	Canada	Biftecks	0,0542	1:20	Non réalisé	19/12/2013 (Négative)	Non réalisé
<b>74</b>	Argentine	Faux filet	0,1578	1:20	Non réalisé	19/12/2013 (Négative)	Non réalisé
<b>75</b>	Argentine	Faux filet	0,1910	1:10	Réalisé (12/20/2013)	19/12/2013 (38,98)	Négatif
<b>76</b>	Canada	Faux filet	0,0613	1:40	Réalisé (12/20/2013)	19/12/2013 (38,23)	Négatif
<b>77</b>	Canada	Faux filet	0,0499	1:400	Réalisé (12/20/2013)	19/12/2013 (40,68)	Négatif
<b>78</b>	Mexique	Hampe	0,0747	1:20	Réalisé (1/09/2014)	08/01/2014 (38,91)	Négatif
<b>79</b>	Mexique	Hampe	0,1887	1:40	Réalisé (1/09/2014)	08/01/2014 (38,83)	Négatif
<b>80</b>	Mexique	Hampe	0,0776	1:20	Non réalisé	08/01/2014 (Négative)	Non réalisé

<b>81</b>	Mexique	Hampe	0,0593	1:20	Non réalisé	08/01/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>82</b>	Mexique	Steak	0,1445	Négatif	Non réalisé	19/01/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>83</b>	Mexique	Steak	0,0549	1:10	Non réalisé	19/01/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>84</b>	Mexique	Steak	0,0927	Négatif	Non réalisé	19/01/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>85</b>	Mexique	Steak	0,0588	Négatif	Non réalisé	19/01/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>86</b>	Mexique	Hampe	0,0854	Négatif	Non réalisé	19/01/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>87</b>	Mexique	Bavette aloyau	0,0850	Négatif	Non réalisé	19/01/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>88</b>	Mexique	Bavette aloyau	0,0580	1:10	Non réalisé	19/01/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>89</b>	Mexique	Bavette aloyau	0,1621	Négatif	Non réalisé	19/01/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>90</b>	Mexique	Bavette aloyau	0,1048	Négatif	Non réalisé	19/01/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>91</b>	Mexique	Rumsteak	0,1646	1:20	Non réalisé	19/01/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>92</b>	Mexique	Rumsteak	0,0845	Négatif	Non réalisé	19/01/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>93</b>	Mexique	Rumsteak	0,1370	1:20	Non réalisé	19/01/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>94</b>	Argentine	Rumsteak	0,1324	Négatif	Réalisé (2/18/2014)	17/02/2014 (37,94)	Négatif
<b>95</b>	Argentine	Steak haché	0,0843	1:100	Non réalisé	17/02/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>96</b>	Argentine	Steak haché	0,1276	Négatif	Non réalisé	17/02/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>97</b>	Argentine	Steak haché	0,0844	Négatif	Non réalisé	17/02/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>98</b>	Argentine	Bavette aloyau	0,0961	1:20	Non réalisé	17/02/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>99</b>	Argentine	Bavette aloyau	0,0582	1:20	Non réalisé	17/02/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>100</b>	Argentine	Bavette aloyau	0,0801	1:100	Réalisé (2/18/2014)	17/02/2014 (39,43)	Négatif
<b>101</b>	Canada	Bavette	0,0965	Négatif	Non réalisé	19/02/2014 (Négative)	Non réalisé



<b>102</b>	Canada	Rumsteak	0,1015	Négatif	Non réalisé	19/02/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>103</b>	Canada	Bavette	0,8272	Négatif	Non réalisé	19/02/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>104</b>	Argentine	Bavette aloyau	0,1193	Négatif	Non réalisé	19/02/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>105</b>	Argentine	Rumsteak	0,1660	1:20	Non réalisé	19/02/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>106</b>	Argentine	Rumsteak	0,0515	Négatif	Réalisé (2/20/2014)	19/02/2014 (41,89)	Négatif
<b>107</b>	Argentine	Bavette aloyau	0,0798	1:10	Non réalisé	19/02/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>108</b>	Argentine	Bavette aloyau	0,1458	1:10	Non réalisé	19/02/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>109</b>	Argentine	Faux filet	0,0770	1:20	Réalisé (2/20/2014)	19/02/2014 (40,96)	Négatif
<b>110</b>	Argentine	Faux filet	0,0671	1:10	Non réalisé	19/02/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>111</b>	Argentine	Faux filet	0,3352	Négatif	Non réalisé	19/02/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>112</b>	Argentine	Steak	0,1000	Négatif	Non réalisé	19/02/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>113</b>	Argentine	Steak	0,0542	Négatif	Non réalisé	19/02/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>114</b>	Argentine	Steak	0,0679	Négatif	Non réalisé	19/02/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>115</b>	Argentine	Hampe	0,0503	Négatif	Non réalisé	19/02/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>116</b>	Argentine	Hampe	0,0793	1:400	Non réalisé	19/02/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>117</b>	Argentine	Hampe	0,0578	Négatif	Non réalisé	27/02/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>118</b>	Argentine	Hampe	0,2389	Négatif	Non réalisé	27/02/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>119</b>	Argentine	Rumsteak	0,0624	1:10	Réalisé (2/28/2014)	27/02/2014 (39,65)	Négatif
<b>120</b>	Argentine	Steak	0,0544	1:10	Non réalisé	27/02/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>121</b>	Argentine	Steak	0,1246	Négatif	Non réalisé	27/02/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>122</b>	Argentine	Steak	0,1788	1:10	Réalisé (2/28/2014)	27/02/2014 (39,23)	Négatif

<b>123</b>	Argentine	Rumsteak	0,1202	1:10	Non réalisé	27/02/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>124</b>	Argentine	Rumsteak	0,5663	Négatif	Non réalisé	27/02/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>125</b>	France	Rumsteak	0,1854	1:20	Réalisé (3/09/2014)	08/03/2014 (42,32)	Négatif
<b>126</b>	France	Hampe	0,1723	1:20	Réalisé (3/09/2014)	08/03/2014 (41,89)	Négatif
<b>127</b>	France	Hampe	0,4169	1:20	Réalisé (3/09/2014)	08/03/2014 (38,62)	Négatif
<b>128</b>	Canada	Faux filet	0,7002	1:40	Réalisé (3/09/2014)	08/03/2014 (41,27)	Négatif
<b>129</b>	Canada	Faux filet	0,5911	Négatif	Non réalisé	08/03/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>130</b>	Canada	Faux filet	0,4476	Négatif	Non réalisé	12/03/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>131</b>	Canada	Faux filet	0,7918	Négatif	Non réalisé	12/03/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>132</b>	Canada	Faux filet	0,4693	1:40	Réalisé (3/13/2014)	12/03/2014 (40,96)	Négatif
<b>133</b>	Canada	Faux filet	0,8738	Négatif	Réalisé (3/13/2014)	12/03/2014 (41,33)	Négatif
<b>134</b>	Canada	Steak	0,4072	Négatif	Non réalisé	12/03/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>135</b>	Argentine	Steak	0,8260	1:40	Réalisé (4/15/2014)	14/04/2014 (35,81)	Négatif
<b>136</b>	Argentine	Steak	0,7723	1:100	Réalisé (4/15/2014)	14/04/2014 (37,61)	Négatif
<b>137</b>	Argentine	Hampe	0,5686	1:40	Réalisé (4/15/2014)	14/04/2014 (38,59)	Négatif
<b>138</b>	Canada	Hampe	0,6401	Négatif	Réalisé (4/15/2014)	14/04/2014 (38,49)	Négatif
<b>139</b>	Argentine	Hampe	0,0514	Négatif	Réalisé (4/15/2014)	14/04/2014 (36,89)	Négatif
<b>140</b>	Argentine	Bavette aloyau	0,0474	1:10	Non réalisé	14/04/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>141</b>	Argentine	Bavette aloyau	0,0606	1:10	Réalisé (4/16/2014)	14/04/2014 (37,17)	Négatif
<b>142</b>	Argentine	Bavette aloyau	0,1293	1:20	Réalisé (4/16/2014)	14/04/2014 (36,25)	Négatif
<b>143</b>	Argentine	Bavette aloyau	0,1252	1:10	Réalisé (4/16/2014)	14/04/2014 (37,53)	Négatif

<b>144</b>	Argentine	Rumsteak	0,0811	1:20	Réalisé (4/16/2014)	14/04/2014 (38,51)	Négatif
<b>145</b>	Argentine	Rumsteak	0,0811	1:20	Réalisé (4/16/2014)	14/04/2014 (36,56)	Négatif
<b>146</b>	Argentine	Rumsteak	0,0599	1:40	Réalisé (4/16/2014)	14/04/2014 (42,60)	Négatif
<b>147</b>	Argentine	Rumsteak	0,0619	1:40	Réalisé (4/16/2014)	14/04/2014 (37,85)	Négatif
<b>148</b>	Argentine	Faux filet	0,4729	1:40	Réalisé (4/16/2014)	14/04/2014 (38,22)	Négatif
<b>149</b>	Argentine	Steak	0,1341	1:10	Réalisé (4/24/2014)	23/04/2014 (33,78)	Négatif
<b>150</b>	Argentine	Steak	1,0333	1:10	Réalisé (4/24/2014)	23/04/2014 (35,97)	Négatif
<b>151</b>	Argentine	Rumsteak	0,0563	1:10	Réalisé (4/24/2014)	23/04/2014 (35,53)	Négatif
<b>152</b>	Argentine	Rumsteak	0,0684	Négatif	Réalisé (4/24/2014)	23/04/2014 (35,46)	Négatif
<b>153</b>	Argentine	Steak	0,0795	1:10	Réalisé (4/24/2014)	23/04/2014 (35,63)	Négatif
<b>154</b>	Argentine	Hampe	0,0999	1:20	Réalisé (4/24/2014)	23/04/2014 (35,49)	Négatif
<b>155</b>	Argentine	Pavé	0,0670	1:10	Réalisé (4/24/2014)	23/04/2014 (35,86)	Négatif
<b>156</b>	France	Pavé	0,0615	1:10	Réalisé (4/24/2014)	23/04/2014 (34,90)	Négatif
<b>157</b>	France	Faux filet	0,1071	Négatif	Réalisé (4/24/2014)	23/04/2014 (36,27)	Négatif
<b>158</b>	Argentine	Faux filet	0,2457	Négatif	Réalisé (4/24/2014)	23/04/2014 (33,71)	Négatif
<b>159</b>	Argentine	Hampe	0,1650	Négatif	Réalisé (4/24/2014)	23/04/2014 (35,91)	Négatif
<b>160</b>	Argentine	Bavette aloyau	0,1415	Négatif	Réalisé (4/24/2014)	23/04/2014 (35,41)	Négatif
<b>161</b>	Inconnu	Inconnu	0,7063	Négatif	Non réalisé	02/05/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>162</b>	Inconnu	Inconnu	0,7214	Négatif	Non réalisé	02/05/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>163</b>	Inconnu	Inconnu	1,1785	1:40	Non réalisé	02/05/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>164</b>	Inconnu	Inconnu	1,1358	Négatif	Non réalisé	02/05/2014 (Négative)	Non réalisé

<b>165</b>	Inconnu	Inconnu	0,1683	Négatif	Réalisé (5/03/2014)	02/05/2014 (40,49)	Négatif
<b>166</b>	Inconnu	Inconnu	0,0529	1:40	Réalisé (5/03/2014)	02/05/2014 (40,28)	Négatif
<b>167</b>	Inconnu	Inconnu	0,3587	1:100	Réalisé (5/03/2014)	02/05/2014 (40,55)	Négatif
<b>168</b>	Inconnu	Inconnu	0,1789	Négatif	Réalisé (5/03/2014)	02/05/2014 (39,50)	Négatif
<b>169</b>	Inconnu	Inconnu	0,4527	1:100	Non réalisé	02/05/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>170</b>	Inconnu	Inconnu	0,1209	1:20	Réalisé (5/09/2014)	08/05/2014 (40,23)	Négatif
<b>171</b>	Inconnu	Inconnu	0,4678	1:40	Non réalisé	08/05/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>172</b>	Inconnu	Inconnu	0,9565	Négatif	Réalisé (5/09/2014)	08/05/2014 (45,44)	Négatif
<b>173</b>	Inconnu	Inconnu	0,1087	Négatif	Réalisé (5/09/2014)	08/05/2014 (40,09)	Négatif
<b>174</b>	Inconnu	Inconnu	0,2025	1:40	Non réalisé	08/05/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>175</b>	Inconnu	Inconnu	0,0604	Négatif	Réalisé (5/09/2014)	08/05/2014 (42,39)	Négatif
<b>176</b>	Inconnu	Inconnu	0,0721	Négatif	Non réalisé	08/05/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>177</b>	Inconnu	Inconnu	0,0633	1:100	Non réalisé	08/05/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>178</b>	Inconnu	Inconnu	0,4034	Négatif	Réalisé (4/15/2014)	14/05/2014 (41,05)	Négatif
<b>179</b>	Inconnu	Inconnu	0,2630	Négatif	Réalisé (4/15/2014)	14/05/2014 (38,25)	Négatif
<b>180</b>	Inconnu	Inconnu	0,0650	Négatif	Non réalisé	14/05/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>181</b>	Inconnu	Inconnu	0,1357	1:100	Réalisé (4/15/2014)	14/05/2014 (39,06)	Négatif
<b>182</b>	Inconnu	Inconnu	0,1689	1:20	Non réalisé	14/05/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>183</b>	Inconnu	Inconnu	0,1532	1:400	Réalisé (4/15/2014)	14/05/2014 (41,03)	Négatif
<b>184</b>	Inconnu	Inconnu	0,0785	1:40	Réalisé (4/15/2014)	14/05/2014 (42,37)	Négatif
<b>185</b>	Inconnu	Inconnu	0,1162	1:100	Réalisé (4/15/2014)	14/05/2014 (40,13)	Négatif

<b>186</b>	Inconnu	Inconnu	0,1070	1:100	Réalisé (4/15/2014)	14/05/2014 (40,30)	Négatif
<b>187</b>	Inconnu	Inconnu	0,0879	1:100	Non réalisé	14/05/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>188</b>	Inconnu	Inconnu	0,0738	1:100	Non réalisé	14/05/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>189</b>	Inconnu	Inconnu	0,0821	1:100	Non réalisé	14/05/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>190</b>	Argentine	Bavette aloyau	1,0892	Négatif	Non réalisé	04/06/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>191</b>	Argentine	Bavette aloyau	0,3642	Négatif	Non réalisé	04/06/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>192</b>	Argentine	Rumsteak	0,2218	Négatif	Non réalisé	04/06/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>193</b>	Allemagne	Rumsteak	0,2844	Négatif	Non réalisé	04/06/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>194</b>	Allemagne	Rumsteak	0,3106	Négatif	Réalisé (6/05/2014)	04/06/2014 (43,81)	Négatif
<b>195</b>	Mexique	Bavette aloyau	0,3858	Négatif	Non réalisé	04/06/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>196</b>	Argentine	Bavette	0,1807	1:100	Réalisé (6/05/2014)	04/06/2014 (44,71)	Négatif
<b>197</b>	Mexique	Bavette	0,6581	1:100	Non réalisé	04/06/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>198</b>	Mexique	Filet	0,4767	1:100	Non réalisé	04/06/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>199</b>	Argentine	Faux filet	0,0773	Négatif	Non réalisé	04/06/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>200</b>	Argentine	Faux filet	0,9201	1:400	Non réalisé	04/06/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>201</b>	Argentine	Tranche	0,8578	1:40	Non réalisé	04/06/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>202</b>	Mexique	Bavette	0,0997	1:100	Non réalisé	04/06/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>203</b>	Canada	Hampe	0,1635	1:100	Non réalisé	18/06/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>204</b>	Canada	Hampe	0,1532	1:100	Non réalisé	18/06/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>205</b>	Canada	Hampe	0,1925	1:100	Non réalisé	18/06/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>206</b>	Canada	Faux filet	0,1655	1:40	Non réalisé	18/06/2014 (Négative)	Non réalisé

<b>207</b>	Argentine	Faux filet	0,1652	Négatif	Non réalisé	18/06/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>208</b>	Argentine	Faux filet	0,0975	Négatif	Non réalisé	18/06/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>209</b>	Argentine	Steak	0,1508	Négatif	Réalisé (6/19/2014)	18/06/2014 (38,38)	Négatif
<b>210</b>	Canada	Steak	0,0725	1:40	Non réalisé	18/06/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>211</b>	Canada	Hampe	0,0738	Négatif	Non réalisé	18/06/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>212</b>	Uruguay	Hampe	0,3389	Négatif	Réalisé (6/19/2014)	18/06/2014 (38,57)	Négatif
<b>213</b>	Uruguay	Steak	0,3724	Négatif	Réalisé (6/19/2014)	18/06/2014 (36,67)	Négatif
<b>214</b>	Inconnu	Inconnu	0,2737	1:40	Réalisé (6/19/2014)	18/06/2014 (35,88)	Négatif
<b>215</b>	France	Hampe	0,0802	1:40	Réalisé (6/19/2014)	18/06/2014 (39,86)	Négatif
<b>216</b>	France	Hampe	0,1337	1:100	Non réalisé	18/06/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>217</b>	France	Rumsteak	0,0748	Négatif	Non réalisé	18/06/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>218</b>	Argentine	Rumsteak	0,0998	Négatif	Non réalisé	18/06/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>219</b>	Argentine	Steak haché	0,0767	Négatif	Non réalisé	18/06/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>220</b>	Argentine	Faux filet	0,1229	Négatif	Réalisé (6/19/2014)	18/06/2014 (38,70)	Négatif
<b>221</b>	Mexique	Faux filet	0,0783	Négatif	Non réalisé	18/06/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>222</b>	Mexique	Faux filet	0,0952	Négatif	Non réalisé	18/06/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>223</b>	Mexique	Steak	0,0633	Négatif	Non réalisé	18/06/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>224</b>	Uruguay	Steak	0,0599	Négatif	Réalisé (6/19/2014)	18/06/2014 (37,94)	Négatif
<b>225</b>	Uruguay	Tranche	0,1447	Négatif	Non réalisé	18/06/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>226</b>	France	Tranche	0,0542	Négatif	Réalisé (6/19/2014)	18/06/2014 (37,43)	Négatif
<b>227</b>	France	Bavette	0,0547	Négatif	Réalisé (6/19/2014)	18/06/2014 (41,51)	Négatif

<b>228</b>	Canada	Bavette	0,1877	1:400	Réalisé (6/19/2014)	18/06/2014 (38,04)	Négatif
<b>229</b>	Canada	Faux filet	0,1670	1:100	Réalisé (6/19/2014)	18/06/2014 (34,31)	Négatif
<b>230</b>	Mexique	Hampe	0,1759	Négatif	Non réalisé	18/06/2014 (Négative)	Non réalisé
<b>231</b>	Argentine	Hampe	0,0613	Négatif	Non réalisé	18/06/2014 (Négative)	Non réalisé

**Annexe 2 :** Résultats des tests sérologiques MAT, ELISA et IFAT sur les sérums de chevaux.

<b>N° de Sérum</b>	<b>ELISA DO<sub>1</sub></b>	<b>ELISA DO<sub>2</sub></b>	<b>ELISA DO<sub>m</sub></b>	<b>MAT<sub>1</sub></b>	<b>MAT<sub>2</sub></b>	<b>IFAT<sub>1</sub></b>	<b>IFAT<sub>2</sub></b>
1	0,195	0,17	0,1825	1:40	1:40	Négatif	Négatif
2	0,112	0,095	0,1035	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
3	0,209	0,198	0,2035	1:100	1:100	Négatif	Négatif
4	0,202	0,219	0,2105	1:100	1:100	1:16	1:16
5	0,575	0,567	0,571	1:400	1:400	1:16	1:16
6	0,082	0,076	0,079	1:40	1:40	Négatif	Négatif
7	0,175	0,176	0,1755	1:100	1:100	1:16	1:16
8	0,152	0,172	0,162	1:40	1:40	1:16	1:16
9	0,229	0,256	0,2425	1:20	1:20	1:16	1:16
10	0,207	0,144	0,1755	1:40	1:40	Négatif	Négatif
11	0,121	0,117	0,119	1:100	1:100	Négatif	Négatif
12	0,157	0,183	0,17	1:100	1:100	1:16	1:16
13	0,622	0,609	0,6155	1:400	1:400	1:16	1:16
14	0,158	0,124	0,141	1:20	1:20	Négatif	Négatif
15	0,278	0,247	0,2625	1:20	1:20	1:8	1:8
16	0,242	0,201	0,2215	1:20	1:20	Négatif	Négatif
17	0,192	0,238	0,215	1:40	1:40	Négatif	Négatif
18	0,116	0,147	0,1315	1:40	1:40	1:16	1:16
19	0,175	0,166	0,1705	1:40	1:40	Négatif	Négatif
20	0,184	0,183	0,1835	1:20	1:20	Négatif	Négatif
21	0,123	0,14	0,1315	1:20	1:20	Négatif	Négatif
22	1,055	0,716	0,8855	1:100	1:100	1:16	1:16
23	0,184	0,195	0,1895	1:40	1:40	1:16	1:16
24	0,136	0,142	0,139	1:40	1:40	1:16	1:16
25	0,158	0,184	0,171	1:40	1:40	Négatif	Négatif



<b>26</b>	0,147	0,12	0,1335	1:100	1:100	Négatif	Négatif
<b>27</b>	0,141	0,13	0,1355	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>28</b>	0,114	0,09	0,102	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>29</b>	0,08	0,122	0,101	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>30</b>	0,162	0,166	0,164	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>31</b>	0,129	0,147	0,138	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>32</b>	0,109	0,092	0,1005	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>33</b>	0,08	0,095	0,0875	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>34</b>	0,227	0,194	0,2105	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>35</b>	0,347	0,295	0,321	1:20	1:20	1:16	1:16
<b>36</b>	0,093	0,08	0,0865	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>37</b>	0,111	0,142	0,1265	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>38</b>	0,13	0,139	0,1345	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>39</b>	0,137	0,146	0,1415	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>40</b>	0,135	0,125	0,13	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>41</b>	0,114	0,108	0,111	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>42</b>	0,079	0,088	0,0835	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>43</b>	0,174	0,208	0,191	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>44</b>	0,101	0,101	0,101	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>45</b>	0,11	0,097	0,1035	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>46</b>	0,476	0,608	0,542	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>47</b>	0,347	0,369	0,358	1:400	1:400	1:8	1:8
<b>48</b>	0,358	0,271	0,3145	1:20	1:20	1:8	1:8
<b>49</b>	0,166	0,207	0,1865	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>50</b>	0,131	0,152	0,1415	1:10	1:10	Négatif	Négatif
<b>51</b>	0,174	0,055	0,1145	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<b>52</b>	0,377	0,284	0,3305	1:20	1:20	1:8	1:8
<b>53</b>	0,204	0,263	0,2335	1:40	1:40	1:8	1:8
<b>54</b>	0,262	0,298	0,28	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>55</b>	0,337	0,359	0,348	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>56</b>	0,214	0,161	0,1875	1:100	1:100	1:16	1:16

<b>57</b>	0,338	0,35	0,344	1:40	1:40	1:8	1:8
<b>58</b>	0,54	0,531	0,5355	1:100	1:100	1:8	1:8
<b>59</b>	0,124	0,115	0,1195	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>60</b>	0,08	0,038	0,059	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>61</b>	0,035	0,084	0,0595	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>62</b>	0,097	0,11	0,1035	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>63</b>	0,141	0,143	0,142	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>64</b>	0,093	0,045	0,069	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>65</b>	0,056	0,063	0,0595	1:40	1:40	1:16	1:16
<b>66</b>	0,219	0,217	0,218	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>67</b>	0,234	0,221	0,2275	1:20	1:20	1:8	1:8
<b>68</b>	0,182	0,148	0,165	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>69</b>	0,212	0,265	0,2385	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>70</b>	0,297	0,293	0,295	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>71</b>	0,403	0,426	0,4145	1:100	1:100	1:16	1:16
<b>72</b>	1,216	1,087	1,1515	1:40	1:40	1:16	1:16
<b>73</b>	0,165	0,22	0,1925	1:20	1:20	1:8	1:8
<b>74</b>	0,169	0,181	0,175	1:100	1:100	1:8	1:8
<b>75</b>	0,308	0,287	0,2975	1:40	1:40	1:8	1:8
<b>76</b>	0,223	0,164	0,1935	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>77</b>	0,289	0,342	0,3155	1:100	1:100	1:8	1:8
<b>78</b>	0,339	0,317	0,328	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>79</b>	0,237	0,201	0,219	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>80</b>	0,225	0,201	0,213	1:100	1:100	1:16	1:16
<b>81</b>	0,244	0,281	0,2625	1:100	1:100	1:16	1:16
<b>82</b>	0,699	0,745	0,722	1:400	1:400	1:16	1:16
<b>83</b>	0,162	0,167	0,1645	1:20	1:20	1:16	1:16
<b>84</b>	0,393	0,511	0,452	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>85</b>	0,1	0,161	0,1305	1:20	1:20	1:16	1:16
<b>86</b>	2,164	2,35	2,257	1:400	1:400	1:16	1:16

<b>87</b>	0,263	0,261	0,262	1:40	1:40	1:16	1:16
<b>88</b>	0,28	0,279	0,2795	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>89</b>	0,058	0,118	0,088	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>90</b>	0,698	0,811	0,7545	1:100	1:100	1:16	1:16
<b>91</b>	0,215	0,16	0,1875	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>92</b>	0,293	0,315	0,304	1:100	1:100	Négatif	Négatif
<b>93</b>	0,227	0,229	0,228	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>94</b>	0,465	0,413	0,439	1:100	1:100	Négatif	Négatif
<b>95</b>	0,323	0,388	0,3555	1:40	1:40	1:16	1:16
<b>96</b>	0,18	0,182	0,181	1:100	1:100	Négatif	Négatif
<b>97</b>	0,286	0,288	0,287	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>98</b>	0,266	0,22	0,243	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>99</b>	0,355	0,41	0,3825	1:400	1:400	1:16	1:16
<b>100</b>	0,314	0,296	0,305	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>101</b>	0,352	0,342	0,347	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>102</b>	0,252	0,195	0,2235	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>103</b>	0,256	0,32	0,288	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>104</b>	0,267	0,259	0,263	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>105</b>	0,272	0,272	0,272	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>106</b>	0,263	0,205	0,234	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>107</b>	0,215	0,268	0,2415	1:100	1:100	Négatif	Négatif
<b>108</b>	0,146	0,141	0,1435	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>109</b>	0,379	0,385	0,382	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>110</b>	0,168	0,143	0,1555	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>111</b>	0,119	0,17	0,1445	1:100	1:100	Négatif	Négatif
<b>112</b>	0,139	0,141	0,14	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>113</b>	0,151	0,168	0,1595	1:100	1:100	Négatif	Négatif
<b>114</b>	0,152	0,14	0,146	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>115</b>	0,178	0,222	0,2	1:100	1:100	Négatif	Négatif
<b>116</b>	0,16	0,166	0,163	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>117</b>	0,166	0,198	0,182	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>118</b>	0,168	0,132	0,15	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>119</b>	0,204	0,235	0,2195	1:40	1:40	Négatif	Négatif

<b>120</b>	0,162	0,174	0,168	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>121</b>	0,157	0,166	0,1615	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>122</b>	0,201	0,144	0,1725	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>123</b>	0,383	0,459	0,421	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>124</b>	0,196	0,202	0,199	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>125</b>	0,336	0,31	0,323	1:100	1:100	1:16	1:16
<b>126</b>	0,189	0,185	0,187	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>127</b>	1,46	1,453	1,4565	1:400	1:400	1:16	1:16
<b>128</b>	0,281	0,281	0,281	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>129</b>	0,232	0,209	0,2205	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<b>130</b>	0,786	0,663	0,7245	1:10	1:10	Négatif	Négatif
<b>131</b>	0,504	0,515	0,5095	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<b>132</b>	0,665	0,575	0,62	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>133</b>	0,28	0,244	0,262	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>134</b>	0,711	0,678	0,6945	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>135</b>	0,217	0,291	0,254	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>136</b>	0,249	0,239	0,244	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>137</b>	0,07	0,018	0,044	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>138</b>	0,245	0,267	0,256	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>139</b>	0,136	0,137	0,1365	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>140</b>	0,547	0,46	0,5035	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<b>141</b>	0,252	0,296	0,274	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>142</b>	0,454	0,427	0,4405	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>143</b>	0,234	0,205	0,2195	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>144</b>	0,101	0,049	0,075	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>145</b>	0,041	0,111	0,076	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>146</b>	0,082	0,088	0,085	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>147</b>	0,129	0,125	0,127	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>148</b>	0,077	0,021	0,049	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>149</b>	0,044	0,107	0,0755	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>150</b>	0,093	0,095	0,094	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>151</b>	0,162	0,187	0,1745	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>152</b>	0,191	0,127	0,159	1:40	1:40	Négatif	Négatif

<b>153</b>	0,314	0,398	0,356	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>154</b>	0,574	0,571	0,5725	1:100	1:100	1:8	1:8
<b>155</b>	0,177	0,189	0,183	1:100	1:100	Négatif	Négatif
<b>156</b>	0,378	0,302	0,34	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>157</b>	0,147	0,204	0,1755	1:100	1:100	Négatif	Négatif
<b>158</b>	0,245	0,205	0,225	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>159</b>	0,805	0,481	0,643	1:400	1:400	Négatif	Négatif
<b>160</b>	0,152	0,151	0,1515	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>161</b>	0,852	0,898	0,875	1:400	1:400	1:16	1:16
<b>162</b>	0,372	0,383	0,3775	1:400	1:400	1:16	1:16
<b>163</b>	0,132	0,127	0,1295	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>164</b>	0,241	0,227	0,234	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>165</b>	0,076	0,132	0,104	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<b>166</b>	0,2	0,196	0,198	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>167</b>	0,201	0,233	0,217	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>168</b>	0,21	0,135	0,1725	1:100	1:100	Négatif	Négatif
<b>169</b>	0,323	0,375	0,349	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>170</b>	0,164	0,182	0,173	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>171</b>	0,174	0,184	0,179	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>172</b>	0,212	0,178	0,195	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>173</b>	0,025	0,093	0,059	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>174</b>	0,17	0,133	0,1515	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>175</b>	0,188	0,169	0,1785	1:100	1:100	Négatif	Négatif
<b>176</b>	0,293	0,226	0,2595	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>177</b>	0,082	0,145	0,1135	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>178</b>	0,111	0,108	0,1095	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>179</b>	0,191	0,159	0,175	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>180</b>	0,22	0,166	0,193	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>181</b>	0,117	0,176	0,1465	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>182</b>	0,131	0,139	0,135	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>183</b>	0,264	0,233	0,2485	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>184</b>	0,101	0,098	0,0995	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>185</b>	0,143	0,128	0,1355	1:40	1:40	Négatif	Négatif

<b>186</b>	0,115	0,071	0,093	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>187</b>	0,132	0,307	0,2195	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>188</b>	0,069	0,078	0,0735	1:40	1:40	Négatif	Négatif
<b>189</b>	0,096	0,09	0,093	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<b>190</b>	0,109	0,06	0,0845	1:10	1:10	Négatif	Négatif
<b>191</b>	0	0,07	0,035	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<b>192</b>	0,126	0,171	0,1485	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<b>193</b>	0,084	0,084	0,084	1:10	1:10	Négatif	Négatif
<b>194</b>	0,32	0,211	0,2655	1:20	1:20	1:8	1:8
<b>195</b>	0,048	0,093	0,0705	1:20	1:20	Négatif	Négatif
<b>196</b>	0,061	0,066	0,0635	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif

1 : test 1 ; 2 : test 2 ; m : moyenne des tests 1 et 2.



# ARTICLE ORIGINAL: Detection of *Toxoplasma gondii* DNA and performance evaluation of two serological tests in horse meat from supermarkets in France



The screenshot shows the PARASTE Editorial Manager interface. At the top, there is a navigation menu with links: HOME, LOGOUT, HELP, REGISTER, UPDATE MY INFORMATION, JOURNAL OVERVIEW, MAIN MENU, CONTACT US, SUBMIT A MANUSCRIPT, and INSTRUCTIONS FOR AUTHORS. The user's role is 'Author' and the username is 'ajz@unilim.fr'. Below the navigation, there is a header for 'Submissions with an Editorial Office Decision for Author Daniel Ajzenberg, Pharm. D., Ph. D.'. The main content is a table with the following columns: Action, Manuscript Number, Title, Initial Date Submitted, Status Date, Current Status, Date Final Disposition Set, and Final Disposition. The table contains one row with the following data: Action: [Action Links](#), Manuscript Number: parasite150019, Title: Detection of Toxoplasma gondii DNA and performance evaluation of two serological tests in horse meat from retail meat stores in France, Initial Date Submitted: 21/02/2015, Status Date: 14/03/2015, Current Status: Completed Accept, Date Final Disposition Set: 14/03/2015, Final Disposition: Accept. The page number is 1 of 1 (1 total completed submissions) and the display settings are 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status	Date Final Disposition Set	Final Disposition
<a href="#">Action Links</a>	parasite150019	Detection of Toxoplasma gondii DNA and performance evaluation of two serological tests in horse meat from retail meat stores in France.	21/02/2015	14/03/2015	Completed Accept	14/03/2015	Accept

Abdelkrim Aroussi<sup>1</sup>, Philippe Vignoles<sup>1</sup>, François Dalmay<sup>2</sup>, Laurence Wimmel<sup>3</sup>, Marie-Laure Dardé<sup>1,4</sup>, Aurélien Mercier<sup>1</sup>, Daniel Ajzenberg<sup>1,4,\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM, Univ. Limoges, CHU Limoges, UMR\_S 1094, Laboratoire de Parasitologie, F-87000 Limoges, France

<sup>2</sup>INSERM, Univ. Limoges, CHU Limoges, UMR\_S 1094, Institut d'Epidémiologie Neurologique et de Neurologie Tropicale, F-87000 Limoges, France

<sup>3</sup> Institut Français du Cheval et de l'Équitation, Station expérimentale, Domaine de la Valade, F-19370 Chamberet, France

<sup>4</sup> *Toxoplasma* Biological Resource Center, CHU Limoges, F-87042 Limoges, France

\*Corresponding author: [ajz@unilim.fr](mailto:ajz@unilim.fr)



## Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in horse meat from supermarkets in France and performance evaluation of two serological tests

Abdelkrim Aroussi<sup>1</sup>, Philippe Vignoles<sup>1</sup>, François Dalmy<sup>2</sup>, Laurence Wimel<sup>3</sup>, Marie-Laure Dardé<sup>1,4</sup>, Aurélien Mercier<sup>1</sup>, and Daniel Ajzenberg<sup>1,4,\*</sup>

<sup>1</sup> INSERM, Univ. Limoges, CHU Limoges, UMR-S 1094, Laboratoire de Parasitologie, 87000 Limoges, France

<sup>2</sup> INSERM, Univ. Limoges, CHU Limoges, UMR-S 1094, Institut d'Epidémiologie Neurologique et de Neurologie Tropicale, 87000 Limoges, France

<sup>3</sup> Institut Français du Cheval et de l'Équitation, Station Expérimentale, Domaine de la Valade, 19370 Chamberet, France

<sup>4</sup> Toxoplasma Biological Resource Center, CHU Limoges, 87042 Limoges, France

Received 21 February 2015, Accepted 14 March 2015, Published online 25 March 2015

**Abstract** – In France, some cases of severe toxoplasmosis have been linked to the consumption of horse meat that had been imported from the American continent where atypical strains of *Toxoplasma gondii* are more common than in Europe. Many seroprevalence studies are presented in the literature but risk assessment of *T. gondii* infection after horse meat consumption is not possible in the absence of validated serological tests and the unknown correlation between detection of antibodies against *T. gondii* and presence of tissue cysts. We performed magnetic-capture polymerase chain reaction (MC-PCR) to detect *T. gondii* DNA in 231 horse meat samples purchased in supermarkets in France and evaluated the performance and level of agreement of the modified agglutination test (MAT) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the meat juices. The serological tests lacked sensitivity, specificity, and agreement between them, and there was no correlation with the presence of *T. gondii* DNA in horse meat, raising concerns about the reliability of *T. gondii* seroprevalence data in horses from the literature. *T. gondii* DNA was detected in 43% of horse meat samples but the absence of strain isolation in mice following inoculation of more than 100 horse meat samples suggests a low distribution of cysts in skeletal muscles and a low risk of *T. gondii* infection associated with horse meat consumption. However, to avoid any risk of toxoplasmosis, thorough cooking of horse meat is recommended.

**Key words:** *Toxoplasma gondii*, Horse meat, Enzyme-linked immunosorbent assay, Modified agglutination test, Magnetic-capture polymerase chain reaction.

**Résumé** – Détection de l'ADN de *Toxoplasma gondii* dans la viande de cheval vendue dans les supermarchés en France et évaluation des performances de deux tests sérologiques. En France, quelques cas de toxoplasmose sévère ont été liés à la consommation de viande de cheval qui avait été importée du continent américain où les souches atypiques de *Toxoplasma gondii* sont plus fréquentes qu'en Europe. De nombreuses études de séroprévalence existent dans la littérature mais l'estimation du risque d'infection par *T. gondii* après consommation de viande de cheval est impossible à cause de l'absence de validation des tests sérologiques et la corrélation inconnue entre la détection des anticorps anti *T. gondii* et la présence de kystes dans les tissus. Nous avons utilisé la technique de capture magnétique-réaction de polymérisation en chaîne (MC-PCR) pour détecter l'ADN de *T. gondii* dans 231 échantillons de viande de cheval achetés dans des supermarchés en France et évalué la performance et le niveau d'agrément du test d'agglutination modifié (MAT) et de la méthode immuno-enzymatique ELISA dans les jus de viande. Les tests sérologiques manquaient de sensibilité, de spécificité, d'agrément entre eux et il n'y avait pas de corrélation avec la présence d'ADN de *T. gondii* dans la viande de cheval, ce qui suscite des doutes sur la fiabilité des données de séroprévalence de *T. gondii* chez les chevaux dans la littérature. L'ADN de *T. gondii* a été détecté dans 43 % des échantillons de viande de cheval mais l'absence d'isolement de souche chez la souris suggère une faible répartition des kystes dans les muscles squelettiques et un faible risque d'infection par *T. gondii* avec la consommation de viande de cheval. Cependant, pour éviter tout risque de toxoplasmose, il est recommandé de bien cuire la viande.

\*Corresponding author: [ajz@unilim.fr](mailto:ajz@unilim.fr)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 1. Introduction

The intracellular protozoan *T. gondii* is able to infect all warm-blooded animals worldwide, including humans. It is estimated that one third of the world's population is chronically infected by this highly successful parasite. Humans can be infected by tachyzoites vertically during pregnancy but are more often infected later in life by bradyzoites after ingestion of tissue cysts in raw or undercooked meat, or by sporozoites after consumption of vegetables or water contaminated by oocysts in cat feces. Between 30 and 63% of *T. gondii* infections are attributed to consumption of tissue cysts in infected raw or undercooked meat [8]. Tissue cysts are the terminal life-cycle stage in the intermediate host; they are immediately infectious, and are able to remain quiescent for a very long period of time [39].

In France, after episodes of trichinellosis outbreaks and *Salmonella* poisoning due to horse meat consumption, the government implemented measures to protect consumers, such as prohibiting horse meat in schools (Interministerial circular of March 6, 1968). *T. gondii* has been isolated from meat cuts of many naturally infected animal species but tissue cysts are less frequently present in infected horses [2]. In France, some cases of severe toxoplasmosis infection due to consumption of imported horse meat have been described and genetic analyses of *T. gondii* strains revealed atypical genotypes that are highly uncommon in Europe [19, 34, 37]. Accurate evaluation of the risk of *T. gondii* infection after horse meat consumption should rely on reliable serological data for *T. gondii* infection in horses. Since the major review by Tassi in 2007 [38], additional seroprevalence data for *T. gondii* in horses has become available in the literature [3–6, 9, 20, 22, 24–28, 30, 31, 40]. One remarkable finding about *T. gondii* seroprevalence in horses in this abundant literature is its high variability between countries, from 1 to 90%. This prevalence may also vary widely within the same country: 13–67% in Argentina, 14–53% in Belgium, 5–90% in Brazil, 17–80% in Italy, and 4–55% in Switzerland [30]. This variability in seroprevalence may have biological and epidemiological explanations, such as differences in the age of horses, their environmental lifestyle, the abundance of oocysts in the soil, and hygiene standards on farms [39]. However, an alternative explanation for the variability of *T. gondii* seroprevalence in horses may simply come from the absence of a gold standard for detecting *T. gondii* antibodies in horses and the lack of validation of the serological methods used in all these studies. The absence of a gold standard is evidenced by the diversity of serological tests used in the literature, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), direct agglutination test (DAT), indirect immunofluorescence antibody test (IFAT), indirect hemagglutination test (IHAT), latex agglutination test (LAT), modified agglutination test (MAT), and Sabin-Feldman dye test (SFDT). The lack of validation is shown in the literature by the use of different cut-offs for a single test, without any data on sensitivity, specificity, and agreement between tests.

Our main objective was to detect *T. gondii* DNA by magnetic-capture polymerase chain reaction (MC-PCR) in horse meat destined for human consumption and to evaluate the

performance of MAT and ELISA serological tests in meat juices of these samples.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Samples

A total of 231 horse meat steak samples were purchased from supermarkets in several cities in France from November 2012 to April 2014. At least 150 g per meat sample was required to perform all tests (50 g for mouse bioassay and 100 g for MC-PCR). Data including lot number, geographic origin, packaging, and expiration date were collected for all horse meat samples, but the date of horse slaughter and geographic origin were not always available in the retail meat packaged for sale in the supermarkets. Horse meat samples were analyzed as quickly as possible to maximize the viability of *T. gondii* that might be present in muscles. Meat juices were directly recovered or obtained after a freezing/thawing step, allowing the muscles to release juice, then stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until tested by MAT and ELISA.

A positive serum sample (THI1813) from a pony experimentally infected with *T. gondii* oocysts in 1985 was kindly provided by Dr. Dubey [11]. The MAT titer of this sample was positive up to dilution 1:102,400 [15].

### 2.2. Magnetic-capture polymerase chain reaction (MC-PCR) of *T. gondii* DNA

The MC-PCR test involved preparation of crude DNA extract from 100 g samples of horse meat, magnetic capture of *T. gondii* DNA, and quantitative real-time PCR targeting the *T. gondii* 529 bp repeat element as previously described [32].

### 2.3. Mouse bioassay

A mouse bioassay was also attempted for horse meat samples with a positive MC-PCR test result and in some samples negative with this test. Two horse meat samples with a positive MC-PCR result were not inoculated because of an excessive delay between MC-PCR and bioassay. Swiss mice weighing 20–25 g were used in the bioassay. Fifty grams of horse meat samples was digested as previously described [14] and 0.5 mL of each digested homogenate was intraperitoneally inoculated into three mice per sample. Mice blood samples were collected 3–4 weeks later and the sera were tested for specific *T. gondii* antibodies by MAT. All procedures in mice were carried out in compliance with ethical rules and approved by the Regional Ethics Committee Limousin (Registration Number: CREAL 3-07-2012).

### 2.4. Modified agglutination test (MAT)

Both *T. gondii* RH strain antigen preparation and MAT test were performed as previously described [10]. The test was

considered positive when a layer of agglutinated parasites formed in wells. Meat juices were tested at five serial dilutions (1:10, 1:20, 1:40, 1:100, and 1:400). The cut-offs for MAT were designated as MAT > 0, MAT > 1:10, MAT > 1:20, and MAT > 1:40. At the MAT > 0 cut-off, the positive samples were those with a test positive at dilutions 1:10, 1:20, 1:40, 1:100, and 1:400. At the MAT > 1:10 cut-off, the positive samples were those with a test positive at dilutions 1:20, 1:40, 1:100, and 1:400. At the MAT > 1:20 cut-off, the positive samples were those with a test positive at dilutions 1:40, 1:100, and 1:400. And lastly, at the MAT > 1:40 cut-off, the positive samples were those with a test positive at dilutions 1:100 and 1:400.

**2.5. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

Horse IgG antibodies to *T. gondii* were tested by using the commercial kit multi-species ID Screen® Toxoplasmosis Indirect (IDVet, Montpellier, France). The test procedure was performed according to the manual provided by the manufacturer. The optical density (OD) values were read at 450 nm using a microplate spectrophotometer Thermo Scientific™ Multiskan™ GO.

**2.6. Statistical analysis**

Cut-off values for MAT and ELISA were selected by receiver operating characteristic (ROC) analysis. In horse meat juices, the cut-offs were estimated by using MC-PCR as the reference test. For the commercial ELISA test, the cut-off was also determined by testing several dilutions of the positive horse serum TH11813. Comparisons of matched pair results between two tests with the selected cut-offs were performed by the McNemar test. Kappa coefficient was used to estimate agreement between tests for the detection of *T. gondii* infection in meat juice.

**3. Results**

**3.1. Sampling data and test results**

Most of the horse meat sampled in this study was from the Americas, with three major export countries: 40% from Argentina, 20% from Canada, and 14% from Mexico (Table 1). Full data including the list of horse meat samples with geographic origin and test results are available in the Supplementary material.

**3.2. Mouse bioassay**

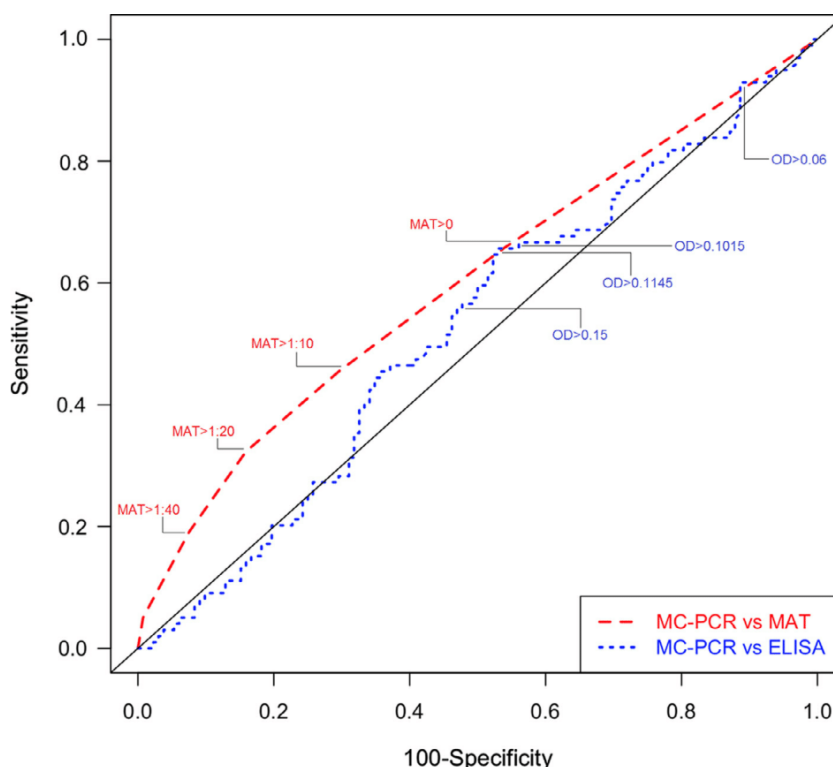
No *T. gondii* strain was isolated following inoculation of 118 horse meat samples in mice, including 97 with positive MC-PCR results and 21 with negative MC-PCR results (Supplementary material).

**3.3. Cut-off determination for MAT and ELISA and level of agreement between tests**

The ROC curves and calculations of sensitivity (Se) and specificity (Sp) allowed us to identify the most suitable cut-offs

**Table 1.** Geographic origin of 231 horse meat samples and prevalence estimation of *T. gondii* in horse meat according to MC-PCR, MAT, and ELISA (OD) results.

Country No. (%)	MC-PCR + No. (%) [95% CI]	MAT > 0 No. (%) [95% CI]	MAT > 1:20 No. (%) [95% CI]	MAT > 1:40 No. (%) [95% CI]	OD > 0.06 No. (%) [95% CI]	OD > 0.1015 No. (%) [95% CI]	OD > 0.1145 No. (%) [95% CI]	OD > 0.15 No. (%) [95% CI]
Germany 2 (0.86%)	1 (50.00%) [0.01-0.98]	0 (0.00%) [0-0.842]	0 (0.00%) [0-0.84]	0 (0.00%) [0-0.84]	2 (100.00%) [0.15-1]	2 (100.00%) [0.15-1]	2 (100.00%) [0.15-1]	2 (100.00%) [0.15-1]
Argentina 93 (40.26%)	50 (53.76%) [0.43-0.64]	56 (60.22%) [0.49-0.70]	18 (19.35%) [0.11-0.28]	12 (12.90%) [0.06-0.21]	81 (87.10%) [0.78-0.93]	52 (55.91%) [0.45-0.66]	52 (55.91%) [0.45-0.66]	40 (43.01%) [0.32-0.53]
Canada 46 (19.92%)	12 (26.09%) [0.14-0.41]	31 (67.39%) [0.52-0.80]	17 (36.96%) [0.23-0.52]	8 (17.39%) [0.07-0.31]	44 (95.65%) [0.85-0.99]	30 (65.22%) [0.49-0.78]	29 (63.04%) [0.47-0.76]	25 (54.35%) [0.39-0.69]
France 14 (6.06%)	10 (71.43%) [0.41-0.91]	10 (71.43%) [0.41-0.91]	1 (7.14%) [0.00-0.33]	0 (0.00%) [0-0.23]	12 (85.71%) [0.57-0.98]	7 (50.00%) [0.23-0.77]	6 (42.86%) [0.17-0.71]	4 (28.57%) [0.08-0.58]
Unknown 40 (17.32%)	21 (52.50%) [0.36-0.68]	22 (55.00%) [0.38-0.70]	13 (32.50%) [0.18-0.49]	7 (17.50%) [0.07-0.32]	38 (95.00%) [0.83-0.99]	26 (65.00%) [0.48-0.79]	23 (57.50%) [0.40-0.73]	20 (50.00%) [0.33-0.66]
Mexico 32 (13.85%)	2 (6.25%) [0.00-0.20]	17 (53.13%) [0.34-0.70]	4 (12.50%) [0.03-0.29]	2 (6.25%) [0.00-0.20]	27 (84.38%) [0.67-0.94]	15 (46.88%) [0.29-0.65]	14 (43.75%) [0.26-0.62]	12 (37.50%) [0.21-0.56]
Uruguay 4 (1.73%)	3 (75.00%) [0.19-0.99]	0 (0.00%) [0-0.60]	0 (0.00%) [0-0.60]	0 (0.00%) [0-0.60]	3 (75.00%) [0.19-0.99]	3 (75.00%) [0.19-0.99]	3 (75.00%) [0.19-0.99]	2 (50.00%) [0.06-0.93]
Total 231 (100%)	99 (42.86%) [0.36-0.49]	136 (58.87%) [0.52-0.65]	53 (22.94%) [0.17-0.28]	29 (12.55%) [0.08-0.17]	207 (89.61%) [0.84-0.93]	135 (58.44%) [0.51-0.64]	129 (55.84%) [0.49-0.62]	105 (45.45%) [0.38-0.52]



**Figure 1.** Receiver operating characteristics (ROC) analysis of ELISA and MAT vs. MC-PCR in meat juice samples.

that represented the best balance between sensitivity and specificity for the two serological tests MAT and ELISA in horse meat samples (Fig. 1). The best balance between sensitivity and specificity was observed at cut-offs MAT > 0 (sensitivity of 66% and specificity of 46%), OD > 0.1015 (sensitivity of 66% and specificity of 47%), and OD > 0.1145 (sensitivity of 62% and specificity of 48%) for ELISA in horse meat samples (Fig. 1 and Table 2). The area under the ROC curve ranged from 0.52 for ELISA to 0.60 for MAT, representing an acceptable level of precision. Other ELISA cut-offs such as OD > 0.06 and OD > 0.15 were subsequently identified by crossing ROC curve results with different MAT cut-offs at > 1:10, > 1:20, and > 1:40, and were also included in our additional calculations. The serial dilutions of the positive horse serum THI1813 showed that the identified cut-off values of ELISA (OD > 0.06, OD > 0.1015, OD > 0.1145, and OD > 0.15) were consistent with the negativity limits of the positive control (data not shown).

The kappa values used to estimate the agreement between MC-PCR vs. ELISA and MC-PCR vs. MAT for the identified cut-offs were low with a range between 0.02 and 0.12 for the ELISA and between 0.11 and 0.17 for the MAT (Table 2). These results indicate a poor agreement between MC-PCR vs. ELISA and MC-PCR vs. MAT. The McNemar test was significant for the cut-offs OD > 0.06, OD > 0.1015, OD > 0.1145, and MAT > 0 (Table 2). At these cut-off values, the discordances were significantly more frequent in samples with negative results with MC-PCR and positive results with

ELISA or MAT than in samples with positive results with MC-PCR and negative results with ELISA or MAT. At cut-off values OD > 0.15 and MAT > 1:10, the McNemar test was not significant (Table 2), which means that the paired discordances (samples negative with MC-PCR and positive with ELISA or MAT vs. samples positive with MC-PCR and negative with ELISA or MAT) occurred randomly. At the MAT > 1:20 and MAT > 1:40 cut-off values, the McNemar test was significant (Table 2), and the discordances were significantly more frequent in samples with positive results with MC-PCR and negative results with MAT than in samples with negative results with MC-PCR and positive results with MAT. This result showed that the MAT > 1:20 and MAT > 1:40 cut-offs have poor sensitivity for detecting horse meat samples infected with *T. gondii*.

### 3.4. Prevalence data

According to MC-PCR results, *T. gondii* DNA was found in 99 (43%) of 231 horse meat samples (Table 1). By using the serological MAT and ELISA tests, the *T. gondii* prevalence varied from 13 to 90% depending on the cut-off used (Table 1). The three cut-offs for MAT and ELISA that were determined by our statistical analysis as having the best balance between sensitivity and specificity showed a similar prevalence with both techniques: 59% (MAT > 0), 58% (OD > 0.1015), and 56% (OD > 0.1145).

**Table 2.** Statistical measures of the performance of ELISA (OD) and MAT with different cut-offs compared with MC-PCR for detecting *T. gondii* in horse meat samples.

	MC-PCR* vs. OD > 0.06	MC-PCR* vs. OD > 0.1015	MC-PCR* vs. OD > 0.1145	MC-PCR* vs. OD > 0.15	MC-PCR* vs. MAT > 0	MC-PCR* vs. MAT > 1:10	MC-PCR* vs. MAT > 1:20	MC-PCR* vs. MAT > 1:40
Sensitivity, %	90.91%	65.66%	61.62%	49.49%	65.66%	45.45%	32.32%	19.19%
(95% CI)	(0.85-0.97)	(0.56-0.75)	(0.52-0.71)	(0.40-0.59)	(0.56-0.75)	(0.36-0.55)	(0.23-0.42)	(0.11-0.27)
Specificity, %	11.36%	46.97%	48.48%	57.58%	46.21%	70.45%	84.09%	92.42%
(95% CI)	(0.06-0.17)	(0.38-0.55)	(0.40-0.57)	(0.49-0.66)	(0.38-0.55)	(0.63-0.78)	(0.78-0.90)	(0.88-0.97)
PPV, %	43.48%	48.15%	47.29%	46.67%	47.79%	53.57%	60.38%	65.52%
(95% CI)	(0.37-0.50)	(0.40-0.57)	(0.39-0.56)	(0.37-0.56)	(0.39-0.56)	(0.43-0.64)	(0.47-0.74)	(0.48-0.83)
NPV, %	62.50%	64.58%	62.75%	60.32%	64.21%	63.27%	62.36%	60.40%
(95% CI)	(0.43-0.82)	(0.55-0.74)	(0.53-0.72)	(0.52-0.69)	(0.55-0.74)	(0.55-0.71)	(0.55-0.69)	(0.54-0.67)
Kappa coefficient	0.02	0.12	0.09	0.07	0.11	0.16	0.17	0.12
McNemar test	$P < 0.1\%$	$P < 0.1\%$	$P < 1\%$	NS	$P < 0.1\%$	NS	$P < 0.1\%$	$P < 0.1\%$

\* MC-PCR is the reference test; PPV is the positive predictive value; NPV is the negative predictive value; NS means not significant.

### 4. Discussion

Our primary goal was to assess the risk of *T. gondii* infection after consumption of horse meat based on recent reports in France of several cases of severe toxoplasmosis after consumption of horse meat imported from South and North America [34]. Seroprevalence data can give an indication of the risk of human toxoplasmosis by eating meat from one animal species only if the detection of specific antibodies and the presence of tissue cysts have a strong correlation in this animal species [33]. This correlation is excellent in some animal species such as pigs and sheep [17, 23], poor in other animal species such as cattle [33], and totally unknown in the vast majority of animal species. In numerous animal species, especially wild ones, there is no gold standard for estimating *T. gondii* seroprevalence and the performances of the usual serological tests used for detecting *T. gondii* antibodies, such as ELISA, DAT, IFAT, IHAT, LAT, MAT, and SFDI, have never been evaluated. However, it is common practice to assess *T. gondii* seroprevalence by using one test with an arbitrary cut-off and without any data on the sensitivity, specificity, and agreement with other tests. Taking bats as an example, a study in China reported *T. gondii* seroprevalence data in different species of bats by using the MAT with a cut-off at 1:25, without any explanation on why they used this test at this cut-off, probably because they read that it was validated in pigs [13]. However, bats are not pigs and what is true for one animal species is not true for another. A Brazilian study tested the agreement with Cohen's kappa coefficient between MAT and IFAT in bat sera [7]. The authors showed that the agreement was poor and could not evaluate the specificity and sensitivity of both tests for the diagnosis of toxoplasmosis in bat species. With all these limitations, one can wonder how far we are from the real seroprevalence of *T. gondii* in bats in the Chinese study.

*T. gondii* seroprevalence studies are much more abundant in horses than in bats in the literature [38], but they face the same problem: there is no gold standard – nothing is known about test performances and agreement between tests. This issue was raised by Dubey many years ago when he observed no correlation between the DT and the MAT for detecting *T. gondii* in horses slaughtered for food in North America [18]. The conclusion of this study was that an accurate assessment of prevalence was not possible until additional studies are carried out to determine the sensitivity and specificity of the various serological tests for toxoplasmosis in horses. We evaluated the performances of MAT and ELISA serological tests in meat juice from 231 horse meat samples by comparing them with the detection of *T. gondii* DNA by MC-PCR in these samples. For the evaluation of the serological tests in horse meat samples, MC-PCR was considered as the reference test in this study because the detection of *T. gondii* DNA in horse meat samples always reveals, in the absence of cross contamination, the presence of *T. gondii*. MC-PCR is a newly developed technique with a much higher sensitivity than isolation of total DNA from a fraction of the crude extract [32]. However, the absence of detection of *T. gondii* DNA does not necessarily mean that the horse was not infected by *T. gondii*, because the distribution of tissue cysts may be low and inhomogeneous

in muscle samples [33]. Though sensitivity of MC-PCR is a matter of concern as a reference test in this study with the relatively small sample used (150 g), it can be considered acceptable with a detection limit estimated at 230 parasites per 100 g of meat, making it possible to detect one cyst of *T. gondii* in 100 g of meat [32].

The conventional gold standard for detecting *T. gondii* cysts in tissues is bioassay in mice or cats [23]. We used bioassay in mice in our study not as a reference test but in order to isolate *T. gondii* strains from horse meat for further genotyping. Because mouse bioassay is time-consuming, we inoculated the horse meat samples that were positive with the MC-PCR assay as a priority. All the bioassays were negative; it was not possible to isolate a single strain following mouse bioassay of 118 horse meat samples. This demonstrates that bioassays in mice are far less sensitive than MC-PCR for detecting *T. gondii* in horse meat samples and validates our choice of MC-PCR as the reference test. A concern about *T. gondii* viability due to excessive delay between the slaughter of the horses and the bioassay of meat samples may be addressed to explain this absence of strain isolation in mice, even though tissue cysts are relatively resistant to changes in temperature and remain infectious in refrigerated (1 to 4 °C) carcasses or minced meat for up to 3 weeks [12]. Testing muscles from fresh carcasses collected in abattoirs would probably enhance the sensitivity of bioassay. Another explanation can be found in the Ct (threshold cycle) values of MC-PCR that were very high for the horse meat samples (median = 38.59), indicating a very low DNA concentration which is known to be associated with poor sensitivity in mouse bioassays [21]. Direct genotyping in horse meat samples with microsatellite markers was not attempted because of the insufficient amount of *T. gondii* DNA to allow PCR-based amplification of single-copy markers [1, 32]. Like in cattle, it appears to be very difficult to isolate strains from horse meat probably because the distribution of cysts is very low in skeletal muscles [2, 16]. Other horse tissues such as brain, heart, or diaphragm collected in abattoirs may have a higher *T. gondii* cyst load than in skeletal muscles and may enhance the sensitivity of bioassay as shown in one study in Egypt [36].

Based on kappa values, our results indicate poor agreement between MC-PCR and ELISA or MAT at different cut-offs identified by ROC curves analysis in horse meat samples. The prevalence of *T. gondii* in 231 horse meat samples was 43% with MC-PCR in our study. By using the serological tests MAT and ELISA, the *T. gondii* prevalence varied considerably, from 13 to 90%, depending on the cut-off used. Our analysis identified three cut-offs for MAT and ELISA as having the best balance between sensitivity and specificity: OD > 0.1015 and OD > 0.1145 for ELISA and MAT > 0. However, at these cut-offs, the sensitivity reached a maximum of 66% and the specificity a maximum of 48% which is very low in comparison with values for other animal species such as pigs or sheep in which sensitivity and specificity values are above 85% for both MAT and ELISA [23, 29, 35]. With such low performance of MAT and ELISA in horses, we do not recommend use of serological tests or serological data from the literature to assess the risk of toxoplasmosis after consumption of horse meat. Based on the fact that no viable strain was isolated after mouse

bioassay, our study suggests that this risk is low but should not be neglected in France because horse meat is imported from Latin American countries where atypical and pathogenic strains are more common than in Europe, and because eating raw or undercooked meat is common in France. The health authorities should undertake a large-scale survey on a representative sample of imported horses slaughtered for food to assess the risk of toxoplasmosis for consumers. Rather than using retail meat packaged for sale from supermarkets, the detection of *T. gondii* by bioassay should be done on fresh carcasses to maximize the viability of the parasite. To avoid any risk of severe toxoplasmosis, the consumer must cook the horse meat by reaching an internal temperature above 70 °C in all parts of the meat, which will kill the cysts of *T. gondii* if present.

**Acknowledgements.** The authors are greatly indebted to Dr. J.P. Dubey who provided the positive *T. gondii* horse serum, Dr. J.W.B. van der Giessen and Dr. M. Opsteegh (RIVM Instituut, Utrecht, Netherlands) who hosted the first author of this study in their laboratories to learn the MC-PCR technique. We are also grateful for the helpful contributions of M. Gatet, R. Mouzet, and H. Riahi who participated in horse meat sampling and technical support.

## Conflict of interest

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

## References

1. Ajzenberg D, Collinet F, Mercier A, Vignoles P, Dardé ML. 2010. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(12), 4641–4645.
2. Al-Khalidi NW, Dubey JP. 1979. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in horses. *Journal of Parasitology*, 65(2), 331–334.
3. Alanazi AD, Alyousif MS. 2011. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in horses in Riyadh Province, Saudi Arabia. *Journal of Parasitology*, 97(5), 943–945.
4. Alvarado-Esquivel C, Rodriguez-Pena S, Villena I, Dubey JP. 2012. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic horses in Durango State, Mexico. *Journal of Parasitology*, 98(5), 944–945.
5. Bartova E, Sedlak K, Syrova M, Literak I. 2010. *Neospora* spp. and *Toxoplasma gondii* antibodies in horses in the Czech Republic. *Parasitology Research*, 107(4), 783–785.
6. Boughattas S, Bergaoui R, ESSID R, Aoun K, Bouratbine A. 2011. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among horses in Tunisia. *Parasite and Vectors*, 4, 218.
7. Cabral AD, D'Auria SR, Camargo MC, Rosa AR, Sodre MM, Galvao-Dias MA, Jordao LR, Dubey JP, Gennari SM, Pena HF. 2014. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in bats from Sao Paulo city, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 206(3–4), 293–296.

8. Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, Foulon W, Semprini AE, Dunn DT. 2000. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *British Medical Journal*, 321(7254), 142–147.
9. Dangoudoubiyam S, Oliveira JB, Viquez C, Gomez-Garcia A, Gonzalez O, Romero JJ, Kwok OC, Dubey JP, Howe DK. 2011. Detection of antibodies against *Sarcocystis neurona*, *Neospora* spp., and *Toxoplasma gondii* in horses from Costa Rica. *Journal of Parasitology*, 97(3), 522–524.
10. Desmonts G, Remington JS. 1980. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology*, 11(6), 562–568.
11. Dubey JP. 1985. Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in tissues of equids fed oocysts. *American Journal of Veterinary Research*, 46(8), 1753–1754.
12. Dubey JP. 1988. Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *Toxoplasma gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. *American Journal of Veterinary Research*, 49(6), 910–913.
13. Dubey JP. 1997. Validation of the specificity of the modified agglutination test for toxoplasmosis in pigs. *Veterinary Parasitology*, 71(4), 307–310.
14. Dubey JP. 1998. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Veterinary Parasitology*, 74(1), 75–77.
15. Dubey JP, Desmonts G. 1987. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Equine Veterinary Journal*, 19(4), 337–339.
16. Dubey JP, Jones JL. 2008. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International Journal for Parasitology*, 38(11), 1257–1278.
17. Dubey JP, Sundar N, Hill D, Velmurugan GV, Bandini LA, Kwok OC, Majumdar D, Su C. 2008. High prevalence and abundant atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from lambs destined for human consumption in the USA. *International Journal for Parasitology*, 38(8–9), 999–1006.
18. Dubey JP, Thulliez P, Romand S, Kwok OC, Shen SK, Gamble HR. 1999. Serologic prevalence of *Toxoplasma gondii* in horses slaughtered for food in North America. *Veterinary Parasitology*, 86(4), 235–238.
19. Elbez-Rubinstein A, Ajzenberg D, Dardé ML, Cohen R, Dumètre A, Yera H, Gondon E, Janaud JC, Thulliez P. 2009. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. *Journal of Infectious Diseases*, 199(2), 280–285.
20. Evers F, Garcia JL, Navarro IT, Zulpo DL, Nino Bde S, Ewald MP, Pagliari S, Almeida JC, Freire RL. 2013. Diagnosis and isolation of *Toxoplasma gondii* in horses from Brazilian slaughterhouses. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22(1), 58–63.
21. Filisetti D, Cocquerelle V, Pfaff A, Villard O, Candolfi E. 2010. Placental testing for *Toxoplasma gondii* is not useful to diagnose congenital toxoplasmosis. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 29(7), 665–667.
22. Finger MA, Villalobos EM, Lara Mdo C, Cunha EM, Barros Filho IR, Deconto I, Dornbusch PT, Ullmann LS, Biondo AW. 2013. Detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in carthorses in the metropolitan region of Curitiba, Parana. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22(1), 179–181.
23. Gamble HR, Dubey JP, Lambillotte DN. 2005. Comparison of a commercial ELISA with the modified agglutination test for detection of *Toxoplasma* infection in the domestic pig. *Veterinary Parasitology*, 128(3–4), 177–181.
24. Garcia-Bocanegra I, Cabezon O, Arenas-Montes A, Carbonero A, Dubey JP, Perea A, Almeria S. 2012. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in equids from Southern Spain. *Parasitology International*, 61(3), 421–424.
25. Ghazy AA, Shaapan RM, Abdel-Rahman EH. 2007. Comparative serological diagnosis of toxoplasmosis in horses using locally isolated *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology*, 145(1–2), 31–36.
26. Jakubek EB, Lunden A, Uggla A. 2006. Seroprevalences of *Toxoplasma gondii* and *Neospora* sp. infections in Swedish horses. *Veterinary Parasitology*, 138(3–4), 194–199.
27. Kouam MK, Diakou A, Kanzoura V, Papadopoulos E, Gajadhar AA, Theodoropoulos G. 2010. A seroepidemiological study of exposure to *Toxoplasma*, *Leishmania*, *Echinococcus* and *Trichinella* in equids in Greece and analysis of risk factors. *Veterinary Parasitology*, 170(1–2), 170–175.
28. Lopes AP, Sousa S, Dubey JP, Ribeiro AJ, Silvestre R, Cotovio M, Schallig HD, Cardoso L, Cordeiro-da-Silva A. 2013. Prevalence of antibodies to *Leishmania infantum* and *Toxoplasma gondii* in horses from the north of Portugal. *Parasite and Vectors*, 6, 178.
29. Mainar-Jaime RC, Barberan M. 2007. Evaluation of the diagnostic accuracy of the modified agglutination test (MAT) and an indirect ELISA for the detection of serum antibodies against *Toxoplasma gondii* in sheep through Bayesian approaches. *Veterinary Parasitology*, 148(2), 122–129.
30. Matsuo K, Kamai R, Uetsu H, Goto H, Takashima Y, Nagamune K. 2014. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, horses, pigs and chickens in Japan. *Parasitology International*, 63(4), 638–639.
31. Miao Q, Wang X, She LN, Fan YT, Yuan FZ, Yang JF, Zhu XQ, Zou FC. 2013. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in horses and donkeys in Yunnan Province, Southwestern China. *Parasite and Vectors*, 6, 168.
32. Opsteegh M, Langelaar M, Sprong H, den Hartog L, De Craeye S, Bokken G, Ajzenberg D, Kijlstra A, van der Giessen J. 2010. Direct detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in meat samples using magnetic capture and PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 139(3), 193–201.
33. Opsteegh M, Teunis P, Zuchner L, Koets A, Langelaar M, van der Giessen J. 2011. Low predictive value of seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle for detection of parasite DNA. *International Journal for Parasitology*, 41(3–4), 343–354.
34. Pomares C, Ajzenberg D, Bornard L, Bernardin G, Haseine L, Dardé ML, Marty P. 2011. Toxoplasmosis and horse meat, France. *Emerging Infectious Diseases*, 17(7), 1327–1328.
35. Shaapan RM, El-Nawawi FA, Tawfik MA. 2008. Sensitivity and specificity of various serological tests for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sheep. *Veterinary Parasitology*, 153(3–4), 359–362.
36. Shaapan RM, Ghazy AA. 2007. Isolation of *Toxoplasma gondii* from horse meat in Egypt. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(1), 174–177.
37. Sobanski V, Ajzenberg D, Delhaes L, Bautin N, Just N. 2013. Severe toxoplasmosis in immunocompetent hosts: be aware of atypical strains. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 187(10), 1143–1145.

38. Tassi P. 2007. *Toxoplasma gondii* infection in horses. A review. *Parassitologia*, 49(1–2), 7–15.
39. Tenter AM. 2009. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(2), 364–369.
40. Yang N, Mu MY, Yuan GM, Zhang GX, Li HK, He JB. 2013. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in slaughtered horses and donkeys in Liaoning Province, Northeastern China. *Parasite and Vectors*, 6, 140.

**Cite this article as:** Aroussi A, Vignoles P, Dalmay F, Wimel L, Dardé M-L, Mercier A & Ajzenberg D: Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in horse meat from supermarkets in France and performance evaluation of two serological tests. *Parasite*, 2015, 22, 14.



An international open-access, peer-reviewed, online journal publishing high quality papers on all aspects of human and animal parasitology

Reviews, articles and short notes may be submitted. Fields include, but are not limited to: general, medical and veterinary parasitology; morphology, including ultrastructure; parasite systematics, including entomology, acarology, helminthology and protistology, and molecular analyses; molecular biology and biochemistry; immunology of parasitic diseases; host-parasite relationships; ecology and life history of parasites; epidemiology; therapeutics; new diagnostic tools.

All papers in Parasite are published in English. Manuscripts should have a broad interest and must not have been published or submitted elsewhere. No limit is imposed on the length of manuscripts.

**Parasite** (open-access) continues **Parasite** (print and online editions, 1994-2012) and **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée** (1923-1993) and is the official journal of the Société Française de Parasitologie.

Editor-in-Chief:  
Jean-Lou Justine, Paris

Submit your manuscript at  
<http://parasite.edmgr.com/>





## Détection de l'ADN de *Toxoplasma gondii* et évaluation des performances de deux tests sérologiques dans la viande équine vendue dans les supermarchés en France.

**Résumé** – En France, quelques cas de toxoplasmose sévère ont été liés à la consommation de viande de cheval qui avait été importée du continent américain où les souches atypiques de *Toxoplasma gondii* sont plus fréquentes qu'en Europe. De nombreuses études de séroprévalence existent dans la littérature mais l'estimation du risque d'infection par *T. gondii* après consommation de viande de cheval est impossible à cause de l'absence de validation des tests sérologiques et la corrélation inconnue entre la détection des anticorps anti *T. gondii* et la présence de kystes dans les tissus. Nous avons utilisé la technique de capture magnétique-réaction de polymérisation en chaîne (CM-PCR) pour détecter l'ADN de *T. gondii* dans 231 échantillons de viande de cheval achetés dans des supermarchés en France et évalué la performance et le niveau d'agrément du test d'agglutination modifié (MAT) et de la méthode immuno-enzymatique ELISA dans les jus de viande. Nous avons également utilisé 196 sérums de chevaux provenant de l'institut français du cheval et de l'équitation à Chamberet, en France, pour évaluer la précision des tests sérologiques ELISA, MAT et le test d'immunofluorescence (IFAT). Les tests sérologiques manquaient de sensibilité, de spécificité, d'agrément entre eux et il n'y avait pas de corrélation avec la présence d'ADN de *T. gondii* dans la viande de cheval, ce qui suscite des doutes sur la fiabilité des données de séroprévalence de *T. gondii* chez les chevaux dans la littérature. L'ADN de *T. gondii* a été détecté dans 43% des échantillons de viande de cheval mais l'absence d'isolement de souche chez la souris suggère une faible répartition des kystes dans les muscles squelettiques et un faible risque d'infection par *T. gondii* avec la consommation de viande de cheval. Cependant, pour éviter tout risque de toxoplasmose, il est recommandé de bien cuire la viande.

**Mots-clés :** *Toxoplasma gondii*, viande de cheval, test immuno-enzymatique ELISA, test d'agglutination modifié (MAT), test d'immunofluorescence IFAT, capture-magnétique-réaction de polymérisation en chaîne (CM-PCR).

## Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in horse meat from supermarkets in France and performance evaluation of two serological tests.

**Abstract** - In France, some cases of severe toxoplasmosis have been linked to the consumption of horse meat that had been imported from the American continent where atypical strains of *Toxoplasma gondii* are more common than in Europe. Many seroprevalence studies exist in the literature but the risk assessment of *T. gondii* infection after horse meat consumption is impossible because of the absence of validation of serological tests and the unknown correlation between detection of antibodies against *T. gondii* and presence of tissue cysts. We performed magnetic capture-polymerase chain reaction (MC-PCR) to detect *T. gondii* DNA in 231 horse meat samples purchased in supermarkets in France and evaluated the performance and level of agreement of the modified agglutination test (MAT) and Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the meat juices. We also tested 196 horse sera from - institut français du cheval et de l'équitation, Chamberet, France - to assess the accuracy of ELISA, MAT and immunofluorescence antibody test (IFAT). The serological tests lacked sensitivity, specificity, agreement between them, and there was no correlation with the presence of *T. gondii* DNA in horse meat, raising concerns about the reliability of *T. gondii* seroprevalence data in horses from the literature. *T. gondii* DNA was detected in 43% of horse meat samples but the absence of strain isolation in mice from more than 100 horse meat samples suggest a low distribution of cysts in skeletal muscles and a low risk of *T. gondii* infection associated with horse meat consumption. However, to avoid any risk of toxoplasmosis, a thorough cooking of horse meat is recommended.

**Key words:** *Toxoplasma gondii*, horse meat, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), modified agglutination test (MAT), immunofluorescence antibody test (IFAT), magnetic-capture polymerase chain reaction.