

SANTÉ PUBLIQUE/PUBLIC HEALTH

Séroprévalence de *Toxoplasma gondii* chez le poulet de la région de Marrakech-Safi, MarocSeroprevalence of *Toxoplasma gondii* in chicken of the Marrakech-Safi region, Morocco

Laila HOUMMADI, Salma BERROUCH, Oussama DEHHANI, Denis LIMONNE, Pierre FLORI, Redouane MOUTAJ, Jamal Eddine HAFID*

RÉSUMÉ **Introduction.** *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) est un parasite intracellulaire obligatoire qui infecte un large spectre d'espèces animales dont l'homme et les animaux d'élevage. La contamination peut avoir des conséquences sanitaires, économiques et épidémiologiques considérables. Les oiseaux en général et la volaille en particulier semblent jouer un rôle important dans l'épidémiologie et la circulation du parasite. L'objectif de ce travail est de mesurer, pour la première fois, la séroprévalence de *T. gondii* chez le poulet dans la région de Marrakech-Safi.

Matériel et méthodes. Les sérums ont été prélevés, entre janvier 2019 et mars 2020, sur 486 poulets provenant de trois types d'élevage: 122 poulets d'élevage traditionnel (domestique), 109 poulets fermiers et 255 poulets d'élevage commercial (en batterie) destinés à la consommation dans la région de Marrakech-Safi. La recherche des immunoglobulines Y (IgY) a été réalisée par ELISA en utilisant un antigène total de *T. gondii*.

Résultats. La séroprévalence moyenne de *T. gondii* chez les poulets de la région d'étude est de 30,65%. Cette étude a aussi montré une association significative ($p < 0,0001$) entre la séroprévalence et le type d'élevage: le poulet domestique a une séroprévalence plus élevée que le poulet fermier et le poulet commercial.

La séropositivité élevée chez le poulet s'expliquerait par une large présence des oocystes et/ou de kystes de *T. gondii* dans son environnement et dans son alimentation.

Conclusion. La consommation des produits avicoles, peu ou pas cuits, peut être une source de contamination potentielle pour l'homme, ainsi que pour les prédateurs dont le chat.

Mots clés: *Toxoplasma gondii*, Poulet, ELISA, Séroprévalence, Marrakech-Safi, Maroc, Afrique du Nord

ABSTRACT **Introduction.** *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) is an obligate intracellular parasite that infects a wide range of animal species, including humans and livestock. Contamination can have significant health, economic and epidemiological consequences. Birds in general, and poultry in particular, appear to play an important role in the epidemiology and circulation of the parasite. The aim of this study was to determine, for the first time, the seroprevalence of *T. gondii* in chicken in the Marrakech-Safi region.

Materials and methods. Sera were collected between January 2019 and March 2020 from 486 chickens from three types of farming: 122 traditional (domestic) chickens, 109 free-range chickens, and 255 commercial (battery) chickens intended for consumption in the Marrakech-Safi region. Immunoglobulin Y (IgY) testing was performed by ELISA using a total *T. gondii* antigen.

Results. The mean seroprevalence of *T. gondii* in chicken in the study region was 30.65%. This study also showed a significant association ($p < 0.0001$) between seroprevalence and type of farming: domestic chickens had a higher seroprevalence than free-range and commercial chickens.

The high seropositivity in chicken could be explained by the widespread presence of *T. gondii* oocysts and/or cysts in their environment and diet.

Conclusion. Consumption of undercooked or uncooked poultry products may be a source of potential contamination for humans and carnivores, including cats.

Key Words: *Toxoplasma gondii*, Chicken, ELISA, Seroprevalence, Marrakech-Safi, Morocco, Northern Africa

Introduction

Toxoplasma gondii est un parasite intracellulaire obligatoire qui infecte un large spectre d'espèces animales dont l'humain et les animaux d'élevage [4,18] ainsi que certains mammifères marins, poissons et reptiles [4,5,27]. Les hôtes définitifs sont les félinés domestiques et sauvages. Il cause la toxoplasmose, parasitose souvent asymptomatique et bénigne, mais qui peut être sévère chez l'individu immunodéprimé, le fœtus et le nouveau-né après transmission congénitale. En dehors de toute immunodépression, des formes graves peuvent être exceptionnellement observées avec des souches de virulence et de génotype particuliers [4,18,42,52].

Les êtres humains et les animaux s'infectent le plus souvent par voie orale (à la suite de l'ingestion de viande contenant des kystes), ou par le sol, l'eau et les végétaux souillés par les fèces de chats ou d'autres félinés contenant des oocystes [4,17,38,51]. En élevage, la toxoplasmose entraîne des pertes économiques, comme c'est le cas chez les ovins (perte reproductive). Elle facilite également la transmission zoonotique par la consommation de viande infectée [22,51,54]. Sa prévalence est variable selon les espèces. Elle est plus élevée chez les ovins et les caprins que chez les autres animaux (bovins, volailles, chiens et chevaux) [1,20,52]. Chez le mouton, contrairement au bovin, elle se traduit par une grande fréquence d'avortements [44,54]. Chez ces 2 espèces, la séroprévalence varie entre 1,4 et 71 % en fonction du contexte épidémiologique et des techniques de dépistage utilisées [3,11-13,31,32,34,37,45,47,49,53,56].

La séroprévalence de *T. gondii* chez le poulet a fait l'objet de peu d'études dans le monde, bien qu'il soit un hôte important dans l'épidémiologie de l'infection en se contaminant généralement avec les oocystes excrétés par les chats et très résistants dans l'environnement [1]. En se nourrissant au sol, la volaille est fortement exposée à la contamination par les oocystes. C'est pour cette raison qu'elle peut être considérée comme un bon indicateur de la contamination tellurique par les oocystes [18,23]. D'après Dubey *et al.*, la présence de kystes de *T. gondii* dans la cervelle, le cœur et les muscles du poulet peut constituer une source de contamination pour les chats [21]. Les volailles domestiques sont rarement sujettes à des formes sévères de toxoplasmose à la suite de leur infection [16,62]. Elles développent généralement une infection chronique aux différentes souches de *T. gondii*. De ce fait, les souches de *T. gondii* qui les infectent reflètent vraisemblablement les souches qui circulent à l'échelle locale [16,19,36].

Introduction

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that infects a wide range of animal species, including humans and livestock [4,18], as well as certain marine mammals, fish and reptiles [4,5,27]. The definitive hosts are domestic and wild felids. It causes toxoplasmosis, a parasitosis that is often asymptomatic and benign, but can be severe in immunocompromised individuals, fetuses and neonates after congenital transmission. In the absence of immunosuppression, severe forms may be seen in exceptional cases with strains of particular virulence and genotype [4,18,42,52]. Humans and animals are most commonly infected orally (after ingestion of meat containing cysts) or through soil, water, and plants contaminated with oocyst-containing feces of cats or other felids [4,17,38,51]. In livestock, toxoplasmosis causes economic losses, as in the case of sheep (loss in reproduction). It also facilitates zoonotic transmission through the consumption of infected meat [22,51,54]. Its prevalence varies between species. It is higher in sheep and goats than in other animals (cattle, poultry, dogs and horses) [1,20,52]. In sheep, in contrast to cattle, it causes a high incidence of abortion [44,54]. In these two species, the seroprevalence varies from 1.4% to 71%, depending on the epidemiologic context and the screening techniques used [3,11-13,31,32,34,37,45,47,49,53,56].

Seroprevalence of *T. gondii* in chicken has been poorly studied worldwide, despite the fact that they are an important host in the epidemiology of the infection, commonly contaminated with oocysts shed by cats and highly resistant in the environment [1]. Poultry are highly exposed to oocyst contamination through ground feeding. For this reason, it can be considered as a good indicator of telluric oocyst contamination [18,23]. According to Dubey *et al.*, the presence of *T. gondii* cysts in chicken brain, heart, and muscle may be a source of contamination for cats [21].

Poultry rarely develop severe forms of toxoplasmosis after infection [16,62]. They typically develop chronic infection with multiple strains of *T. gondii*. As a result, the strains of *T. gondii* that infect them are likely to reflect those circulating locally [16,19,36].

Seroprevalence in chicken varies from country to country. Several recent surveys in domestic flocks have reported variable, sometimes very high, seroprevalences ranging from 6 to 98% [10,29,39,48], showing heterogeneity in overall seropositivity depending on the country and screening method.

La séroprévalence chez le poulet varie d'un pays à un autre. Plusieurs enquêtes récentes dans des élevages domestiques ont rapporté des séroprévalences variables, parfois très élevées comprises entre 6 et 98 % [10,29,39,48], ce qui montre une hétérogénéité de la séropositivité globale en fonction des pays et des méthodes de dépistage.

Au Maroc, aucune étude séro-épidémiologique n'a été réalisée à ce jour sur la prévalence de *T. gondii* chez le poulet. C'est la raison pour laquelle nous avons cherché à la déterminer dans trois types d'élevages de poulets destinés à la consommation dans la région de Marrakech-Safi (le poulet d'élevage domestique, le poulet fermier et le poulet d'élevage intensif en batterie) pour estimer le risque de contamination par l'ingestion des kystes présents dans leur chair mal cuite.

In Morocco, no sero-epidemiological study on the prevalence of *T. gondii* in chicken has been performed. For this reason, we set out to determine the prevalence of *T. gondii* in three types of chickens reared for consumption in the Marrakech-Safi region (domestic chickens, free-range chickens, and intensive battery chickens) in order to estimate the risk of contamination by ingestion of cysts in their undercooked meat.

Matériels et méthodes

L'antigène a été préparé selon le protocole de Hafid *et al.* [30], et fourni gracieusement par le laboratoire de Parasitologie-Mycologie de Saint-Etienne (France) et le laboratoire pharmaceutique LDBIO Diagnostics. Brièvement, les trophozoïtes de la souche RH de *T. gondii* ont été obtenus à partir d'ascites de souris infectées quelques jours auparavant et lavés trois fois par centrifugation à 200 g pendant 10 min dans une solution saline isotonique. Le dernier culot a été mis en suspension dans de l'eau distillée et la concentration en protéines a été dosée et fixée par dilution à 1 mg/ml. La solution finale a été considérée comme un antigène total.

Dans cette étude, nous avons prélevé 486 sérums provenant de trois types de poulets :

- Cent vingt-deux poulets d'environ un an provenant d'élevages domestiques de plein air, sans clôture, se nourrissant en picorant le sol et consommant divers aliments, y compris des céréales et des déchets ménagers. Des échantillons de sang ont été prélevés sur ces poulets, qui ont ensuite été relâchés sans être abattus. Sept campagnes de prélèvements ont été réalisées entre janvier 2019 et mars 2020, sur quatre sites respectivement à Ben Guerir (n=17), Bouchane (n=36), Sidi Rahal (n=35), et Safi (n=34) (Fig. 1). L'échantillonnage de ce type de poulets a été réalisé avec l'accord de leurs propriétaires.
- Cent neuf poulets fermiers provenant des élevages contrôlés et vendus dans les abattoirs de la ville de Marrakech. Ces poulets ont été élevés en plein air dans des fermes pendant une durée maximum de 71 jours durant

Materials and methods

The antigen was prepared according to the protocol by Hafid *et al.* [30] and kindly provided by the Parasitologie-Mycologie Laboratory of Saint-Etienne (France) and the LDBIO Diagnostics pharmaceutical laboratory. Briefly, trophozoites of the RH strain of *T. gondii* were obtained from the ascites of mice infected a few days earlier and washed three times by centrifugation at 200 g for 10 min in isotonic saline. The final pellet was suspended in distilled water and the protein concentration was determined by dilution to 1 mg/ml. The final solution was considered as total antigen.

In this study, we collected 486 sera from three types of chickens:

- One hundred and twenty-two approximately one-year-old chickens from free-range, unfenced domestic flocks that feed by pecking at the ground and consume a variety of diets, including cereals and household waste. Blood samples were collected from these chickens, which were then released without being slaughtered. Seven sampling campaigns were conducted between January 2019 and March 2020 at four sites each in Ben Guerir (n=17), Bouchane (n=36), Sidi Rahal (n=35), and Safi (n=34) (Fig. 1). These chickens were sampled with the consent of their owners.
- One hundred and nine free-range chickens from controlled farms sold in slaughterhouses in the city of Marrakech. These chickens were raised in the open air on farms for a maximum of 71 days, during which time they were fed a diet based on cereals and vegetables. The chickens were kept in a fenced area large

laquelle ils ont bénéficié d'une alimentation à base de céréales et de végétaux. Ces poulets disposaient d'un espace clôturé suffisamment grand pour qu'il y ait une densité de 11 poulets/m² (Arrêté du ministère de l'agriculture marocain n°1271-17), et protégé de l'accès des chats. Le sang de ces poulets a été collecté entre janvier 2019 et mars 2020, au niveau de deux abattoirs choisis arbitrairement dans la ville de Marrakech.

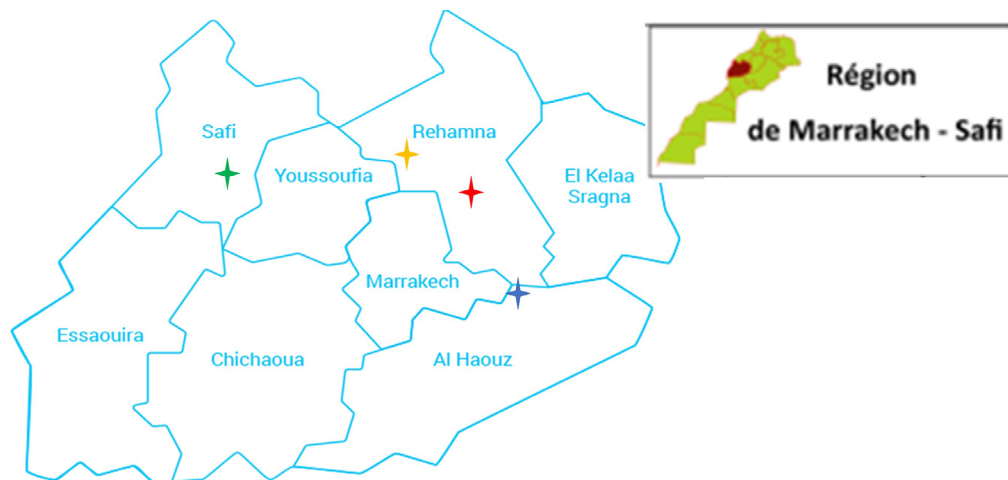
- Deux cent cinquante-cinq poulets d'élevage commercial, confinés et âgés de 35 à 40 jours. Ces animaux provenaient des élevages en batterie et se nourrissaient d'une alimentation à base de céréales, de tourteaux, d'oléagineux et de farine de poisson. Ces volailles ont été élevées dans des bâtiments clôturés, mises sur litière en paille, et ont disposé d'un espace suffisant pour circuler en liberté, sans accès à l'extérieur.

Le sang de ces poulets a été prélevé, entre janvier 2019 et mars 2020, dans quatre abattoirs choisis arbitrairement dans la ville de Marrakech. Le sang a été collecté dans des tubes sans anticoagulant à partir de la veine alaire pour le poulet d'élevage

enough to ensure a density of 11 chickens per square meter (Moroccan Ministry of Agriculture Order No. 1271-17) and protected from access by cats. The blood of these chickens was collected between January 2019 and March 2020 at two randomly selected slaughterhouses in the city of Marrakech.

- Two hundred and fifty-five commercial chickens, caged and aged between 35 and 40 days. These animals came from battery farms and were fed a diet based on cereals, oil cakes, oil-seeds and fish meal. The chickens were housed in fenced buildings, on straw bedding, and given sufficient space to roam freely without access to the outdoors.

The blood of these chickens was collected between January 2019 and March 2020 at four randomly selected slaughterhouses in the city of Marrakech. Blood was collected in anticoagulant-free tubes from the wing vein for traditionally raised chickens and directly from the jugular vein at the time of slaughter for the other two types of chickens in slaughterhouses in the city of Marrakech. Samples were centrifuged at 200 g for 30 min and sera were tested by ELISA for anti-*T. gondii* IgY.



✦ **Ben Guerir**

✦ **Bouchane
(Sebt Labrikiyin)**

✦ **Safi**

✦ **Sidi Rahal
(Douar Oulad Ali Zemran)**



Source de la carte : <https://www.regionmarrakech-safi.ma/fr/le-territoire/>

Figure 1 : Localisation géographique des zones d'échantillonnage des poulets domestiques. ©Hoummadi Laila.

Figure 1: Geographic location of the sampling zones of domestic chickens. ©Hoummadi Laila

traditionnel et directement de la veine jugulaire au moment de l'abattage pour les deux autres types de poulet dans les abattoirs de la ville de Marrakech. Les échantillons ont été centrifugés à 200 g pendant 30 min et les sérums testés par ELISA pour la recherche des IgY anti-*T. gondii*. Quatre poulets d'élevage commercial âgés de 40 jours et pesant entre 1,5 et 2 kg ont été achetés dans le commerce et utilisés pour produire des sérums hyper-immuns anti-*T. gondii*. Avant leur immunisation, et pour vérifier leur statut immunitaire vis-à-vis de *T. gondii*, des prélèvements sanguins ont été réalisés au niveau de leurs veines alaires. Les résultats des tests en ELISA et en immunoblot ont montré que les quatre poulets étaient négatifs.

L'immunisation a été réalisée selon le protocole préconisé par Vaitukaitis *et al.* [57]. Un mélange contenant 1 ml d'antigène total (AT) de *T. gondii* et 1 ml d'adjuvant complet de Freund (Thermo scientific) a été injecté par voie intradermique, au niveau du flanc de chaque poulet. Dix jours après, une injection de rappel a été faite dans les mêmes conditions. Les animaux ont été gardés dans un poulailler et la production des IgY anti-*T. gondii* a été recherchée à J0, J10, J31, J41, J60 par ELISA et immunoblot.

Les sérums de 10 poulets d'élevage commercial, sélectionnés parmi les 486 poulets étudiés, ayant montré une très faible densité optique (DO) lors des essais de l'ELISA et donné des résultats négatifs en immunoblot, ont été considérés comme témoins négatifs.

Pour déterminer le seuil de positivité, nous avons ajouté trois déviations standard à la moyenne arithmétique des DO de ces sérums. Le seuil retenu est 0,260.

Les puits en polystyrène de la plaque ELISA (Nunc, Merck) ont été sensibilisés en ajoutant 100 µl d'AT à une concentration de 20 µg de protéine par millilitre. La plaque a été incubée pendant 1 heure à 37 °C, puis toute la nuit à 4 °C. Ensuite, les puits ont été lavés trois fois pendant 5 minutes avec une solution de tampon phosphate salin (PBS) contenant du Tween 20 à 0,05 %. Après une saturation d'une heure avec du PBS-Tween 20 et 5 % d'albumine sérique bovine (BSA), les sérums dilués dans la même solution ont été déposés à raison de 100 µl par puits et incubés pendant 2 heures à 37 °C. Après avoir lavé les puits comme décrit ci-dessus, 100 µl d'anticorps IgY de poulet couplé à la peroxydase (Sigma), préalablement dilués à 1/500 dans du PBS-Tween 20 et 0,5 % de BSA, ont été ajoutés dans les puits et incubés pendant 1 heure à 37 °C. Après le lavage des

Four 40-day-old commercial chickens weighing between 1.5 and 2 kg were purchased commercially and used to prepare hyperimmune anti-*T. gondii* sera. Blood samples were taken from the wing veins prior to immunization to determine their immune status against *T. gondii*. The results of ELISA and immunoblot tests showed that all four chickens were negative.

Immunization was performed according to the protocol recommended by Vaitukaitis *et al.* [57]. A mixture containing 1 ml of *T. gondii* total antigen (TA) and 1 ml of Freund's complete adjuvant (Thermo Scientific) was injected intradermally into the flank of each chicken. Ten days later, a booster injection was given under the same conditions. Animals were housed in a poultry house and anti-*T. gondii* IgY production was assessed by ELISA and immunoblot at D0, D10, D31, D41 and D60.

Sera from 10 commercially bred chickens, selected from the 486 chickens tested, that had very low optical density (OD) in ELISA tests and negative immunoblot results were used as negative controls.

To determine the positivity threshold, three standard deviations were added to the arithmetic mean OD of these sera. The threshold used was 0.260.

The polystyrene wells of the ELISA plate (Nunc, Merck) were sensitized by adding 100 µl of AT at a concentration of 20 µg protein per milliliter. The plate was incubated at 37 °C for 1 hour and then at 4 °C overnight. The wells were then washed three times for 5 minutes with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.05% Tween 20. After saturation with PBS-Tween 20 and 5% bovine serum albumin (BSA) for 1 hour, sera diluted in the same solution were plated at 100 µl per well and incubated at 37 °C for 2 hours. After washing the wells as described above, 100 µl of peroxidase-labeled chicken IgY antibody (Sigma), previously diluted 1:500 in PBS-Tween 20 and 0.5% BSA, was added and incubated for 1 hour at 37 °C. After washing the wells, the reaction was visualized by adding 100 µl of substrate. The substrate was prepared by dissolving one tablet of O-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma) in 20 ml of citrate buffer supplemented with 26 µl of 30% H₂O₂. Plates were kept in the dark for 15 minutes and the optical density was read using a spectrophotometer at 492 nm (BioTeK ELx800). Reproducibility was checked by testing 8 positive and 8 negative sera from the previous series in each new series.

puits, la réaction a été révélée en ajoutant 100 µl de substrat. Ce dernier a été obtenu en dissolvant un comprimé de dihydrochlorure d'O-phénylènediamine (Sigma) dans 20 ml de tampon citrate complété avec 26 µl de H₂O₂ à 30 %. Les plaques ont été maintenues dans l'obscurité pendant 15 minutes, puis la densité optique a été lue avec un spectrophotomètre à 492 nm (BioTeK ELx800). La reproductibilité a été vérifiée en testant dans chaque nouvelle série huit sérums positifs et huit sérums négatifs de la série précédente.

La détection des IgY anti-*T. gondii* par immunoblot chez les poulets immunisés avec l'AT a été réalisée par le laboratoire LDBIO-Diagnostics. Brièvement, chaque échantillon à tester a été incubé séparément avec une bandelette contenant l'AT. Après lavages, les anti-IgY marqués à la phosphatase alcaline (LDBIO) ont été déposés sur chaque bandelette. L'incubation et les lavages ont été suivis par l'ajout du substrat qui entraîne, lorsque l'échantillon est positif, l'apparition de bandes de poids moléculaire 30, 31, 33, 40 et 45 kDa. La présence d'au moins 3 bandes parmi les 5, incluant la bande à 30 kDa, permet d'affirmer la présence d'anticorps IgY anti-*T. gondii* dans le sérum analysé.

Tous les animaux ont été traités selon les règles d'éthique en vigueur et tous les prélèvements ont été réalisés avec l'aval des autorités sanitaires locales et des propriétaires de poulets auxquels nous avons expliqué amplement les raisons et les objectifs de nos travaux.

L'analyse descriptive a consisté au calcul des fréquences absolues des variables qualitatives, aux paramètres de positionnement et à la dispersion des variables quantitatives (moyenne, écart-type). La distribution normale des variables a été étudiée par le test de Kolmogorov-Smirnov. En analyse bivariée, la comparaison des variables qualitatives a fait appel au test statistique de Chi² de Pearson et à celui de Fisher si nécessaire. Le seuil de significativité était retenu pour p<0,05. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel SPSS version 19.0.

Detection of anti-*T. gondii* IgY by immunoblot in chickens immunized with AT was carried out by LDBIO-Diagnostics. Briefly, each test sample was incubated separately with a strip containing AT. After washing, alkaline phosphatase-labeled anti-IgY (LDBIO) was applied to each strip. Incubation and washes were followed by addition of the substrate which, when the sample was positive, resulted in the appearance of bands of molecular weight 30, 31, 33, 40 and 45 kDa. The presence of at least 3 of the 5 bands, including the 30 kDa band, confirms the presence of IgY anti-*T. gondii* antibodies in the serum analyzed. All animals were treated ethically, and all samples were taken with the approval of the local health authorities and the chicken owners, to whom we gave a full explanation of the reasons for and aims of our work.

The descriptive analysis consisted in calculating the absolute frequencies of the qualitative variables, the positioning parameters and the dispersion of the quantitative variables (mean, standard deviation).

The normal distribution of the variables was studied using the Kolmogorov-Smirnov test. In bivariate analysis, qualitative variables were compared using Pearson's Chi² statistical test, and Fisher's if necessary. The significance threshold was p<0.05. Statistical analysis was performed using SPSS software version 19.0.

Résultats

Les IgY anti-*T. gondii* ont été détectées à partir du dixième jour (J10) de l'immunisation aussi bien en ELISA qu'en immunoblot. Ces anticorps persistent et leur titre augmente jusqu'à J70, jour de la récupération de tout le sang corporel des animaux. Ces sérums sont considérés comme témoins positifs pour l'étude de la prévalence des IgY anti-*T. gondii*, par ELISA, chez les différents types de poulets de notre étude.

En adoptant l'ELISA, nous avons obtenu une prévalence globale de *T. gondii* de 30,65 % chez le poulet de la région de Marrakech-Safi. Elle est de 40,2 % chez le poulet d'élevage traditionnel, de 10,1 % chez le poulet fermier et de 34,9 % chez le poulet d'élevage commercial en batterie (Tableau I). Cette différence de séroprévalence par rapport aux types d'élevage est significative ($p < 0,0001$).

Pour le poulet domestique, la séroprévalence est variable selon la ville de provenance: 76,5 % à Ben Guerir, 52,9 % à Safi, 31,4 % à Sidi Rahal et 19,4 % à Bouchane (Tableau II).

Results

Anti-*T. gondii* IgY antibodies were detected from day ten (D10) of immunization by both ELISA and immunoblot. These antibodies persisted and their titer increased until D70, the day on which all the animals' body blood was recovered. These sera are considered as positive controls for the study of the prevalence of anti-*T. gondii* IgY, by ELISA, in the different types of chickens in our study.

Using ELISA, we obtained an overall *T. gondii* prevalence of 30.65% in chicken from the Marrakech-Safi region. This compares with 40.2% in traditionally-reared (domestic) chicken, 10.1% in free-range chicken and 34.9% in commercially-reared battery chickens (Table I). The difference in seroprevalence between types of farming is significant ($p < 0.0001$).

For domestic chicken, seroprevalence varied according to town of origin: 76.5% in Ben Guerir, 52.9% in Safi, 31.4% in Sidi Rahal and 19.4% in Bouchane (Table II).

Tableau I: Séroprévalence de *T. gondii* chez les poulets de la région de Marrakech-Safi

Table I: Seroprevalence of *T. gondii* in chicken in the region of Marrakesh-Safi

Animal / Animal	Nombre d'échantillons testés / Number of samples tested	Nombre de positifs / Number of positive samples	Prévalence / Prevalence	p
Poulet d'élevage traditionnel (domestique) / Traditionally-reared (domestic) chicken	122	49	40,2 %	0,0001
Poulet fermier / Free-range chicken	109	11	10,1 %	
Poulet d'élevage commercial / Commercially-reared battery chickens	255	89	34,9 %	
Prévalence moyenne / Average prevalence			30,7 %	

Tableau II: Séroprévalence de *T. gondii* chez les poulets domestiques selon les villes de la région Marrakech-Safi

Table II: Seroprevalence of *T. gondii* in domestic farmed chicken according to the cities of the region of Marrakesh-Safi

Ville / City	Nombre d'échantillons testés / Number of samples tested	Nombre de positifs / Number of positive samples	Prévalence / Prevalence	p
Ben Guerir	17	12	76,5 %	0,0001
Safi	34	18	52,9 %	
Bouchane	36	7	19,4 %	
Sidi Rahal	35	11	31,4 %	

Discussion

Au Maroc, à l'instar de plusieurs pays, le poulet joue un rôle considérable dans la vie quotidienne, culturelle et sociale des citoyens. Selon le ministère de l'agriculture, il est la première source de protéine animale, et est utilisé dans la majorité des cérémonies rituelles et religieuses. Ces animaux sont généralement élevés et abattus dans des conditions non surveillées, à domicile ou chez des bouchers traditionnels, pour la consommation locale. Les viscères, les têtes ainsi que les restes de viande sont jetés dans les poubelles publiques et sont facilement récupérés et consommés par les animaux errants (chats, chiens, rats...). Ceci peut représenter une source non négligeable de circulation des souches de *T. gondii* entre les différents hôtes.

Malgré une aire de circulation réduite par rapport à d'autres animaux, le poulet domestique partage souvent son environnement avec les chats. Son comportement alimentaire, caractérisé par un picorage au sol pour la recherche de nourriture, augmente son exposition aux déjections des chats potentiellement contaminées par des oocystes et enfouies dans le sol [21]. Ainsi, Dubey *et al.* [19] et Lehmann *et al.* [36] ont considéré le poulet comme un bon indicateur de la contamination tellurique par les oocystes.

Certaines études ont montré que les kystes de *T. gondii* se localisent principalement dans le cœur et à un degré moindre dans le cerveau et les autres viscères, mais plus rarement dans les muscles striés [2,22,24,31,35]. La consommation d'un poulet insuffisamment cuit représente une importante source d'infection pour les différents hôtes dont l'humain et le chat [1,14].

Ce travail, le premier au Maroc, et dans la région de Marrakech-Safi en particulier, montre que la séroprévalence moyenne anti-*T. gondii* est de 30,7%, ce qui indique que l'infection chez les poulets est largement répandue dans la région et qu'elle varie grandement selon le type d'élevage. Elle est plus élevée dans l'élevage traditionnel (40,2%) que dans l'élevage commercial (34,9%) et l'élevage fermier (10,1%), ce qui confirme le constat rapporté par plusieurs études [10,26,40,41,46,56,59]. Ceci suggère que les poulets domestiques élevés en liberté, en contact étroit avec les chats, ont un risque beaucoup plus élevé de contracter une infection à *T. gondii* que les poulets de chair confinés. Par ailleurs, la durée de vie des poulets – 1 an pour les poulets domestiques, 71 jours pour les poulets fermiers et 35-40 jours pour les poulets d'élevage intensif – pourrait contribuer à l'accumulation du parasite et expliquer une

Discussion

In Morocco, as in many other countries, chicken plays an important role in the daily, cultural and social life of the citizens. According to the Ministry of Agriculture, it is the main source of animal protein and is used in most ritual and religious ceremonies. These animals are generally raised and slaughtered in unsupervised conditions, at home or by traditional butchers, for local consumption. The entrails, heads and meat scraps are disposed of in public garbage cans and are easily collected and consumed by stray animals (cats, dogs, rats...). This can be a significant source of circulation of *T. gondii* strains between different hosts.

Despite their limited range compared to other animals, domestic chickens often share their environment with cats. Their feeding behavior, characterized by pecking at the ground in search of food, increases their exposure to cat feces, which may be contaminated with oocysts and buried in the soil [21]. Thus, Dubey *et al.* [19] and Lehmann *et al.* [36] considered chickens to be a good indicator of telluric contamination by oocysts.

Some studies have shown that *T. gondii* cysts are mainly found in the heart and to a lesser extent in the brain and other viscera, and less commonly in striated muscles [2,22,24,31,35]. Consumption of undercooked chicken is an important source of infection for various hosts, including humans and cats [1,14].

This study, the first in Morocco and in particular in the Marrakech-Safi region, shows that the average anti-*T. gondii* seroprevalence is 30.7%, indicating that infection in chicken is widespread in the region and varies greatly according to the type of farming. It is higher in traditional farming (40.2%) than in commercial farming (34.9%) and free-range farming (10.1%), confirming the results of several studies [10,26,40,41,46,56,59]. This suggests that free-range domestic chickens in close contact with cats have a much higher risk of *T. gondii* infection than confined broilers. Furthermore, the lifespan of chickens - 1 year for domestic chickens, 71 days for free-range chickens and 35-40 days for intensive broilers - could contribute to parasite accumulation and explain the higher prevalence. However, the prevalence in intensively reared chickens, at 34.9%, remains high compared to those found in the same type of chickens in central Portugal (5.6%, 10/178) by modified agglutination test (MAT) [46] and zero in the Chinese city of Gifu (0/163) by latex agglutination test (LAT) [41]. This is an unusual

prévalence plus élevée. Toutefois, la prévalence chez le poulet d'élevage intensif, qui est de 34,9 %, reste élevée par rapport à celles retrouvées chez le même type de poulet au centre du Portugal 5,6 % (10/178) par test d'agglutination modifié (MAT, *modified agglutination test*) [46] et nulle dans la ville de Gifu en Chine (0/163) par test d'agglutination au latex (LAT, *latex agglutination test*) [41]. C'est un constat inhabituel car, dans ce mode d'élevage, les prévalences de l'infection par *T. gondii* sont souvent très faibles, voire nulles, du fait que le poulet est abrité dans des bâtiments protégés de l'accès des chats, et qu'il se nourrit d'une alimentation à base de farine.

Une visite dans les fermes des poulets d'élevage intensif de la région nous a permis de constater que les normes dans ce type d'exploitation ne sont pas respectées. Plusieurs indices indiquant clairement que les fermes manquent au respect des règles d'hygiène ont été décelés. Il est toutefois clair que les principaux facteurs à considérer en lien avec la séroprévalence élevée chez ce type de poulet sont davantage liés à :

- la maîtrise insuffisante du confinement en raison de l'état de la clôture grillagée qui ne permet pas d'empêcher la pénétration des chats ;
- l'ouverture des locaux de stockage sur l'extérieur. Cette ouverture favorise l'accès aux oiseaux, rongeurs et insectes nuisibles, agents de dispersion mécanique de parasite [28] ;
- l'utilisation de la paille qui peut être potentiellement souillée par des fèces de chats contenant des oocystes et/ou carcasses de rongeurs renfermant des kystes de *T. gondii* et qui maintiendrait une prévalence élevée de l'infection [14] ;
- la non disponibilité d'un programme de lutte contre les nuisibles et la mauvaise gestion des carcasses ;
- une contamination possible du sol avant l'installation de la ferme ou encore la contamination du milieu d'élevage pendant la période du vide sanitaire ;
- l'utilisation de l'eau de puits qui peut être contaminée par les parasites dont *T. gondii*.

En plus de ces facteurs, il ne faut pas écarter l'éventualité de la présence de chats errants qui souillent souvent les entrepôts de nourriture par leurs fèces contenant les oocystes de *T. gondii*. Il suffit probablement d'une seule fèce pour contaminer tout le terrain [7]. La consommation de viande de poulets issus d'élevage intensif est plus élevée que celle des autres types de poulet, augmentant ainsi l'importance de ce type de

finding, as the prevalence of *T. gondii* infection in this type of farming is often very low or even non-existent due to the fact that chickens are housed in buildings protected from access by cats and fed a flour-based diet.

A visit to the intensive chicken farms in the region revealed that the standards for this type of operation are not being met. There were a number of clear indications that the farms were not complying with hygiene regulations. However, it is clear that the main factors associated with the high seroprevalence in this type of chicken are more related to :

- Inadequate containment due to the condition of the wire fencing, which does not prevent cats from entering the premises;
- The openness of the warehouses to the outside. This openness facilitates access by birds, rodents and insect pests, which are agents of mechanical parasite spread [28];
- The use of straw, which may be contaminated by cat feces containing oocysts and/or rodent carcasses containing *T. gondii* cysts, thus maintaining a high prevalence of infection [14];
- Lack of a pest control program and poor carcass management;
- Possible contamination of the soil prior to the establishment of the farm, or contamination of the rearing environment during the fallow period;
- The use of well water that may be contaminated with parasites, including *T. gondii*.

In addition to these factors, the presence of stray cats, which often contaminate feed stores with feces containing *T. gondii* oocysts, cannot be excluded. A single fecal pellet is probably sufficient to contaminate the entire area [7]. The consumption of meat from intensively farmed chickens is higher than that of other kind of chicken raising, increasing the importance of this type of poultry as a potential source of infection. Current understanding of the epidemiology of toxoplasmosis suggests that these chickens become infected after consuming food and water contaminated with *T. gondii* oocysts shed by cats.

The prevalence of *T. gondii* infection in free-range chickens is 10.1%. This is low compared to other types of farming, probably due to the strict protection and hygiene practices required by the Moroccan Ministry of Agriculture's decree (n°1271-17) recognizing the agricultural label (*poulet fermier*) and approving its specifications. These practices include regular inspections of rearing conditions, measures to prevent

volaille comme source potentielle d'infection. La compréhension actuelle de l'épidémiologie de la toxoplasmose nous amène à penser que ce type de poulet contracte l'infection suite à la consommation d'aliments et d'eau contaminés par les oocystes de *T. gondii* excrétés par les chats. Concernant le poulet fermier, la prévalence de l'infection à *T. gondii* dans l'élevage est de 10,1 %. Elle est faible par rapport à celle des autres types d'élevage, ce qui est probablement dû aux strictes pratiques de protection et d'hygiène exigées par l'arrêté du ministère de l'agriculture marocain (n°1271-17) portant reconnaissance du label agricole (poulet fermier) et l'homologation du cahier des charges y afférant. Ces pratiques comprennent des contrôles réguliers des conditions d'élevage, des mesures pour éviter la contamination des aliments et de l'eau, ainsi que des protocoles de nettoyage et de désinfection. Ces mesures contribuent à réduire la contamination par *T. gondii*. Bien que les poulets fermiers aient accès à l'extérieur, ils sont souvent élevés dans des environnements où les sources de contamination sont mieux contrôlées que dans les élevages intensifs.

Le risque de transmission de *T. gondii* par la consommation de viande issue de ce type d'élevage est faible, mais il n'est pas nul. La contamination des poulets par le parasite reste possible, même avec une gestion rigoureuse de l'élevage et des pratiques d'hygiène strictes. Une source potentielle de contamination pourrait être le lessivage des sols, où les oocystes présents dans les déjections des chats pourraient être disséminés par les eaux de pluie, introduisant ainsi une faible possibilité de contamination malgré les mesures de contrôle.

Nous avons relevé également des prévalences variables, avec une différence significative ($p < 0.0001$), selon les villes dans lesquelles nous avons pu faire des prélèvements chez les poulets élevés traditionnellement. C'est une prévalence élevée qui peut signifier que l'environnement de ces villes contient non seulement des oocystes présents dans le sol, dans l'eau et sur les végétaux [8], mais qu'il existe aussi des rongeurs, des vers de terre et des animaux porteurs des kystes et/ou oocystes du parasite [9,25,58]. Puisque les poulets élevés en liberté tirent leur nourriture du sol, ils sont probablement infectés par l'ingestion d'oocystes plutôt que par de la viande contenant des kystes [33,61].

En effet, dans les villes de Ben Guerir et de Safi où la séroprévalence est de respectivement 76,5 % et 52,9 %, nous avons noté, durant nos sept campagnes de prélèvements, que les poulets se

contaminent de leur nourriture, de l'eau et de l'air, et que les protocoles de nettoyage et de désinfection aident à réduire la contamination. Bien que les poulets élevés en liberté aient accès à l'extérieur, ils sont souvent élevés dans des environnements où les sources de contamination sont mieux contrôlées que dans les élevages intensifs.

Le risque de transmission de *T. gondii* par la consommation de viande issue de ce type d'élevage est faible, mais pas nul. La contamination des poulets par le parasite reste possible, même avec une gestion rigoureuse de l'élevage et des pratiques d'hygiène strictes. Une source potentielle de contamination pourrait être le lessivage des sols, où les oocystes présents dans les déjections des chats pourraient être disséminés par les eaux de pluie, créant ainsi une faible possibilité de contamination malgré les mesures de contrôle.

Nous avons également relevé des prévalences variables, avec une différence significative ($p < 0.0001$), selon les villes dans lesquelles nous avons pu faire des prélèvements chez les poulets élevés traditionnellement. Cette haute prévalence peut signifier que l'environnement de ces villes contient non seulement des oocystes dans le sol, l'eau et les plantes [8], mais aussi des rongeurs, des vers de terre et des animaux transportant des kystes et/ou des oocystes du parasite [9,25,58]. Comme les poulets élevés en liberté obtiennent leur nourriture du sol, ils sont susceptibles d'être infectés en ingérant des oocystes plutôt que de la viande contenant des kystes [33,61]. En fait, dans les villes de Ben Guerir et Safi, où la séroprévalence est de 76,5 % et 52,9 %, respectivement, nous avons observé lors de nos sept campagnes de prélèvements que les poulets se déplacent librement pour trouver leur propre nourriture. Ils sont souvent nourris dans des poubelles publiques et dans des endroits où les chats errants sont communs. À l'inverse, dans les villes de Bouchane (19,4 %) et Sidi Rahal (31,4 %), les poulets sont nourris avec du grain, du pain et des déchets de légumes fournis par le fermier. Le contact avec les chats errants était moins fréquent que dans les deux villes précédentes.

La prévalence de la toxoplasmose a varié considérablement entre les espèces. Elle est généralement plus élevée chez les ovins, les caprins et les porcins que chez les autres animaux domestiques : bovins, volailles, chiens et chevaux [1,20,52]. Cependant, la séroprévalence obtenue dans notre étude montre que ce n'est pas toujours le cas au Maroc. Les poulets de la région de Marrakech-Safi ont été trouvés plus contaminés que les ovins de la même région, qui ont une séroprévalence de 27,6 % par ELISA en 2008 (72/261) [50]. De même, en Égypte, la séroprévalence de *T. gondii* chez les poulets dans la ville de Gharbia était de 82,3 % par ELISA [6]. Elle était plus élevée que celle rapportée chez les ovins (51,8 %) (88/170) dans la même ville de Gharbia [34].

Ces résultats confirment que la variation de la prévalence de l'agent de la toxoplasmose n'est pas seulement liée à l'espèce animale, mais aussi, et très

déplaçaient librement pour trouver leur propre nourriture. Ils se nourrissaient souvent dans des poubelles publiques et des endroits où la présence des chats errants était très fréquente. Alors que dans les villes de Bouchane (19,4 %) et de Sidi Rahal (31,4 %) les poulets se nourrissaient de céréales, de pain et de déchets de légumes fournis par l'éleveur. Le contact avec les chats errants était moins fréquent que dans les deux villes précédentes.

La prévalence de la toxoplasmose est très variable selon les espèces. Elle est généralement plus élevée chez le mouton, la chèvre et le porc que chez les autres animaux domestiques : bovins, volailles, chiens et chevaux [1,20,52]. Cependant, la séroprévalence obtenue dans notre étude montre qu'au Maroc, ce n'est pas toujours le cas. Les poulets de la région Marrakech-Safi s'avèrent plus contaminés que les ovins de la même région, qui avaient une séroprévalence de 27,6 % par ELISA en 2008 (72/261) [50]. De même en Égypte, la séroprévalence de *T. gondii* chez le poulet dans la ville de Gharbia était de 82,3 % par ELISA [6]. Elle était plus élevée que celle rapportée chez les ovins (51,8 %) (88/170) dans la même ville de Gharbia [34].

Ces résultats confirment que, pour l'agent de la toxoplasmose, la variation de la prévalence est liée non seulement aux espèces animales mais aussi, et très souvent, aux techniques d'élevage, à la qualité des ressources en eau, aux conditions d'hygiène des fermes, aux conditions climatiques et à la cohabitation avec les chats errants.

Conclusion

La présente étude a montré une séroprévalence moyenne de 30,7%. La positivité trouvée dans tous les élevages permet de conclure que la toxoplasmose est répandue chez la majorité des élevages de poulets, même chez les poulets confinés. Une association significative a pu être mise en évidence entre la séroprévalence de *T. gondii* et le type d'élevage. Les variations dans les taux d'infection semblent liées aux différences dans les méthodes de gestion. Les poulets en élevage intensif sont aussi susceptibles d'être exposés aux oocystes de *T. gondii* présents dans les pâturages et l'eau que les poulets fermiers, qui bénéficient d'une gestion plus contrôlée avec une alimentation et une eau de qualité. Une séroprévalence plus élevée a été observée chez les poulets domestiques d'un an, élevés en plein air, ce qui suggère qu'ils présentent un risque plus élevé pour le consommateur. La contamination de poulet est un reflet indirect

often, to the breeding techniques, the quality of water resources, the hygienic conditions of the farms, the climatic conditions and the cohabitation with stray cats.

Conclusion

The present study showed an average seroprevalence of 30.7%. The positivity found in all farms leads to the conclusion that toxoplasmosis is widespread in the majority of chicken farms, even in caged chickens. A significant association was found between *T. gondii* seroprevalence and farm type. Variations in infection rates appear to be related to differences in management practices. Intensively reared chickens are as likely to be exposed to *T. gondii* oocysts in pasture and water as free-range chickens, which benefit from more controlled management with high-quality feed and water. A higher seroprevalence was observed in yearling free-range chickens, suggesting that they pose a higher risk to the consumer. Chicken contamination is an indirect reflection of environmental contamination. For this reason, we can confirm that the prevalence of *T. gondii* in chicken is an excellent indicator for estimating

de la contamination environnementale. C'est pour cette raison que l'on peut confirmer que la prévalence de *T. gondii* chez le poulet est un excellent indicateur pour estimer la contamination des lieux de son élevage et pouvoir endiguer la circulation des souches de toxoplasme. Les produits avicoles peuvent être une source de contamination alimentaire. En outre, le respect des règles d'hygiène durant toutes les étapes de production de la viande de volailles (élevage, abattage et commercialisation) est primordial pour préserver les qualités sanitaires du produit et protéger la santé des consommateurs de viande peu ou pas cuite.

Source de financement

Ce travail n'a bénéficié d'aucune source de financement.

Contribution des auteurs et autrices

Laila Hoummadi: Prélèvement, méthodologie, rédaction de l'article et validation.
Salma Berrouch et Oussama Dehhani: Prélèvement et validation.
Denis Limonne et Pierre Flori: conceptualisation, validation et ressources.
Redouane Moutaj et Jamal Eddine Hafid: supervision et correction de l'article.

Liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Auteurs / Authors

Laila HOUMMADI (1,2 hoummadi.laila@gmail.com), Salma BERROUCH (1,3, salma.berrouch@gmail.com), Oussama DEHHANI (1, dehhani@gmail.com), Denis LIMONNE (4, dlimonne@ldbiodiag.com), Pierre FLORI (5, pierre.flori@chu-st-etienne.fr), Redouane MOUTAJ (6, redmoutaj@yahoo.fr), Jamal Eddine HAFID* (1)

- Laboratoire bioressources et sécurité sanitaire des aliments, Faculté des sciences et techniques, Université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc
- Institut supérieur des professions infirmières et techniques de santé, Marrakech, Maroc
- École supérieure de technologie d'El Kelaa des Sraghna, Université Cadi Ayyad, El Kelaa des Sraghna, Maroc
- Laboratoire LDBIO Diagnostics, Lyon, France
- Laboratoire de parasitologie-mycologie du Centre hospitalier universitaire (CHU) de Saint-Etienne, France
- Service de parasitologie-mycologie, Hôpital militaire Avicenne, Université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc

Auteur correspondant: hjfamal@yahoo.fr

the contamination of the premises where they are reared and for limiting the circulation of toxoplasma strains. Poultry products can be a source of food contamination. In addition, compliance with hygiene rules at all stages of poultry meat production (rearing, slaughter and marketing) is essential to preserve the sanitary qualities of the product and to protect the health of consumers of undercooked or uncooked meat.

Funding

No funding was provided for this work.

Authors' contributions

Laila Hoummadi: Sampling, methodology, article writing and validation.
Salma Berrouch and Oussama Dehhani: Sampling and validation.
Denis Limonne and Pierre Flori: conceptualization, validation, and resources.
Redouane Moutaj and Jamal Eddine Hafid: supervision and correction of the article.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interests.

Références / References

- Abdallah MC, Kamel M, Karima B, Samir A, Djamel K, Rachid K, Khatima AO. Cross-Sectional Survey on *Toxoplasma gondii* Infection in Cattle, Sheep, and Goats in Algeria: Seroprevalence and Risk Factors. *Vet Sci*. 2019 Jul 10;6(3):63. doi: 10.3390/vetsci6030063.
- Derouin F, Bultel C, Roze S. Toxoplasmosis: état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation. Rapport du groupe de travail « *Toxoplasma gondii* » de l'Afssa. 2005, 318 p.
- Al-mabruk AA, Alkhunfas SR, El-Buni AA, Annajar B. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sheep from Libya. *Int J Adv Res*. 2013;1 (9):148-154.
- Almeria S, Dubey JP. Foodborne transmission of *Toxoplasma gondii* infection in the last decade. An overview. *Res Vet Sci*. 2021 Mar;135:371-385. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.10.019.
- Anah SA, Al-Mayali HMH. Molecular detection of *Toxoplasma gondii* and *Cryptosporidium* spp. of some snakes in AL-Diwaniyah province/Iraq. *Eurasia J Biosci* 12, 19-26 (2018).
- Barakat AM, Salem LM, El-Newishy AM, Shaapan RM, El-Mahllawy EK. Zoonotic chicken toxoplasmosis in some Egyptians governorates. *Pak J Biol Sci*. 2012 Sep 1;15(17):821-6. doi: 10.3923/pjbs.2012.821.826.

7. Bastien M. Contamination des terrains potagers par *Echinococcus multilocularis*, *Toxoplasma gondii* et *Toxocara* spp, parasites responsables de zoonoses transmises par l'alimentation. Thèse de doctorat, Université de Reims Champagne Ardenne, France. 2017 ; 206 p (<https://theses.fr/2017REIMS005>).
8. Berrouch S, Escotte-Binet S, Harrak R, Huguenin A, Flori P, Favennec L, Villena I, Hafid J. Detection methods and prevalence of transmission stages of *Toxoplasma gondii*, *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in fresh vegetables: a review. *Parasitology*. 2020 Apr;147(5):516-532. doi: 10.1017/S0031182020000086.
9. Bettiol SS, Obendorf DL, Nowarkowski M, Goldsmid JM. Pathology of experimental toxoplasmosis in eastern barred bandicoots in Tasmania. *J Wildl Dis*. 2000 Jan;36(1):141-4. doi: 10.7589/0090-3558-36.1.141.
10. Cui P, Fang SF, Gu XL, Guo B, Sun XM. A survey of toxoplasmosis in chickens and rabbits in Bashang district. Shijiazhuang City China Animal Health Inspect. 2010;27(5):46-411.
11. Davoust B, Mediannikov O, Roqueplo C, Perret C, Demoncheaux JP, Sambou M, Guillot J, Blaga R. Enquête de séroprévalence de la toxoplasmose animale au Sénégal. *Bull Soc Pathol Exot*. 2015 Feb;108(1):73-7. doi:10.1007/s13149-014-0403-4.
12. Dechicha AS, Bachi F, Gharbi I, Edmee G, Djamila BA, Ohamed BE, Guetarni D. Sero-epidemiological survey on toxoplasmosis in cattle, sheep and goats in Algeria. *Afr J Agric Res*. 2015 Feb 2;10(20):2113-9. doi: 10.5897/AJAR2015.9575.
13. Derakhshan M, Mousavi M. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cats, goats, and sheep in Kerman, Iran. *Comp Clin Pathol*. 2014;23:267-8. doi: 10.1007/s00580-012-1605-4.
14. Djokic V. Prevalence and risk factors for toxoplasmosis in pigs and characterization of natural evolution of infection in a pig model. *Parasitology*. Univ. Pierre et Marie Curie - Paris VI ; Univerzitet u Beogradu. 2016, 137.
15. Dubey JP. Toxoplasmosis in pigs--the last 20 years. *Vet Parasitol*. 2009 Oct 14;164(2-4):89-103. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.05.018
16. Dubey JP. *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. *Zoonoses Public Health*. 2010 Feb;57(1):60-73. doi: 10.1111/j.1863-2378.2009.01274.x.
17. Dubey JP. Outbreaks of clinical toxoplasmosis in humans: five decades of personal experience, perspectives and lessons learned. *Parasit Vectors*. 2021 May 19;14(1):263. doi: 10.1186/s13071-021-04769-4.
18. Dubey JP. *Toxoplasmosis of animals and humans*, 3rd edition. Boca Raton: CRC Press. 2021, 565 p. doi: 10.1201/9781003199373.
19. Dubey JP, Graham DH, Blackston CR, Lehmann T, Gennari SM, Ragozo AM, Nishi SM, Shen SK, Kwok OC, Hill DE, Thulliez P. Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: unexpected findings. *Int J Parasitol*. 2002 Jan;32(1):99-105. doi: 10.1016/s0020-7519(01)00364-2.
20. Dubey JP, Hill DE, Jones JL, Hightower AW, Kirkland E, Roberts JM, Marcet PL, Lehmann T, Vianna MC, Miska K, Sreekumar C, Kwok OC, Shen SK, Gamble HR. Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. *J Parasitol*. 2005 Oct;91(5):1082-93. doi: 10.1645/GE-683.1.
21. Dubey JP, Lehmann T, Lautner F, Kwok OC, Gamble HR. Toxoplasmosis in sentinel chickens (*Gallus domesticus*) in New England farms: Seroconversion, distribution of tissue cysts in brain, heart, and skeletal muscle by bioassay in mice and cats. *Vet Parasitol*. 2015 Nov 30;214(1-2):55-8. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.09.004.
22. Dubey JP, Murata FHA, Cerqueira-Cézar CK, Kwok OCH, Su C. Economic and public health importance of *Toxoplasma gondii* infections in sheep: 2009-2020. *Vet Parasitol*. 2020 Oct;286:109195. doi: 10.1016/j.vetpar.2020.109195.
23. Dubey JP, Pena HFJ, Cerqueira-Cézar CK, Murata FHA, Kwok OCH, Yang YR, Gennari SM, Su C. Epidemiologic significance of *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): the past decade. *Parasitology*. 2020 Oct;147(12):1263-1289. doi: 10.1017/S0031182020001134.
24. Dubey JP, Ruff MD, Camargo ME, Shen SK, Wilkins GL, Kwok OC, Thulliez P. Serologic and parasitologic responses of domestic chickens after oral inoculation with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Am J Vet Res*. 1993 Oct;54(10):1668-72. doi: 10.2460/ajvr.1993.54.10.1668.
25. Dubey JP, Weigel RM, Siegel AM, Thulliez P, Kitron UD, Mitchell MA, Mannelli A, Mateus-Pinilla NE, Shen SK, Kwok OC, et al. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. *J Parasitol*. 1995 Oct;81(5):723-9.
26. Duong HD, Appiah-Kwarteng C, Takashima Y, Aye KM, Nagayasu E, Yoshida A. A novel luciferase-linked antibody capture assay (LACA) for the diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in chickens. *Parasitol Int*. 2020 Aug;77:102125. doi: 10.1016/j.parint.2020.102125.
27. Feitosa TF, Brasil AWL, Parentoni RN, Vilela VLR, Nety TFL, Pena HFJ. Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em mamíferos, aves e répteis no parque zoológico em João Pessoa, Paraíba, Brasil. *Arq. Inst. Biol*. 2017;84:1-5. doi: 10.1590/1808-1657000022016.
28. Frenkel JK, Ruiz A, Chinchilla M. Soil survival of toxoplasma oocysts in Kansas and Costa Rica. *Am J Trop Med Hyg*. 1975 May;24(3):439-43. doi: 10.4269/ajtmh.1975.24.439.
29. Ghoneim NH, Shalaby SI, Hassanain NA, Zeedan GS, Soliman YA, Abdalhamed AM. Comparative study between serological and molecular methods for diagnosis of toxoplasmosis in women and small ruminants in Egypt. *Foodborne Pathog Dis*. 2010 Jan;7(1):17-22. doi: 10.1089/fpd.2008.0223.
30. Hafid J, Sung RT, Raberin H. Analyse antigénique de *Toxoplasma gondii* par chromatographie, électrophorèse sur gel de polyacrylamide et immunoprécipitation. *Ann Soc Belg Med Trop*. 1989 Mar;69(1):41-8.
31. Halová D, Mulcahy G, Raftar P, Turčeková L, Grant T, de Waal T. *Toxoplasma gondii* in Ireland: seroprevalence and novel molecular detection method in sheep, pigs, deer and chickens. *Zoonoses Public Health*. 2013 Mar;60(2):168-73. doi: 10.1111/j.1863-2378.2012.01514.x.
32. Ibrahim AM, Ismail AA, Angara TEE, Osman OM. Area-wide detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dairy animals from the Khartoum State, Sudan. *J Life Sci*. 2014;8(9):191-9. doi: 10.17265/1934-7391/2014.09.001.
33. Ibrahim HM, Huang P, Salem TA, Talaat RM, Nasr MI, Xuan X, Nishikawa Y. Short report: prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in northern Egypt. *Am J Trop Med Hyg*. 2009 Feb;80(2):263-7. doi: 10.4269/ajtmh.2009.80.263.
34. Ibrahim HM, Mohamed AH, El-Sharaawy AA, El-Shanqery HE. Molecular and serological prevalence of *Toxoplasma gondii* in pregnant women and sheep in Egypt. *Asian Pac J Trop Med*. 2017 Oct;10(10):996-1001. doi: 10.1016/j.apjtm.2017.09.012.
35. Kaneto CN, Costa AJ, Paulillo AC, Moraes FR, Murakami TO, Meireles MV. Experimental toxoplasmosis in broiler chicks. *Vet Parasitol*. 1997 May;69(3-4):203-10. doi: 10.1016/s0304-4017(96)01126-0.
36. Lehmann T, Marcet PL, Graham DH, Dahl ER, Dubey JP. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jul 25;103(30):11423-8. doi: 10.1073/pnas.0601438103.
37. Lopes AP, Dubey JP, Neto F, Rodrigues A, Martins T, Rodrigues M, Cardoso L. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep, goats and pigs from the North of Portugal for human consumption. *Vet Parasitol*. 2013 Mar 31;193(1-3):266-9. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.12.001.
38. López Ureña NM, Chaudhry U, Calero Bernal R, Cano Alsua S, Messina D, Evangelista F, Betson M, Lalle M, Jokelainen P, Ortega Mora LM, Álvarez García G. Contamination of soil, water, fresh produce, and bivalve mollusks with *Toxoplasma gondii* oocysts: a systematic review. *Microorganisms*. 2022 Feb 27;10(3):517. doi: 10.3390/microorganisms10030517.
39. Magalhães FJ, da Silva JG, Ribeiro-Andrade M, Pinheiro JW Júnior, Aparecido Mota R. High prevalence of toxoplasmosis in free-range chicken of the Fernando de Noronha Archipelago, Brazil. *Acta Trop*. 2016 Jul;159:58-61. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.03.034.
40. Mahmood ZU, Zahid M, Sthanadar AA, Shah M, Hussain A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in *Gallus domesticus* of district Mardan, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Pakistan J Zool*. 2014;46(6):1705-10.
41. Matsuo K, Kamai R, Uetsu H, Goto H, Takashima Y, Nagamune K. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, horses, pigs and chickens in Japan. *Parasitol Int*. 2014 Aug;63(4):638-9. doi: 10.1016/j.parint.2014.04.003.

42. Mousavi P, Mirhendi H, Mohebbi M, Shojaee S, Keshavarz Valian H, Fallahi S, Mamishi S. Detection of *Toxoplasma gondii* in acute and chronic phases of infection in immunocompromised patients and pregnant women with real-time PCR assay using TaqMan fluorescent probe. *Iran J Parasitol.* 2018 Jul-Sep;13(3):373-381.
43. Nayeri T, Sarvi S, Daryani A. *Toxoplasma gondii* in mollusks and cold-blooded animals: a systematic review. *Parasitology.* 2021 Jul;148(8):895-903. doi: 10.1017/S0031182021000433.
44. Nayeri T, Sarvi S, Moosazadeh M, Daryani A. Global prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in the aborted fetuses and ruminants that had an abortion: A systematic review and meta-analysis. *Vet Parasitol.* 2021 Feb; 290:109370. doi: 10.1016/j.vetpar.2021.109370.
45. Özmutlu Çakmak D, Karatepe B. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in sheep from Nevşehir Province in Turkey. *Türkiye Parazitol Derg.* 2017 Sep;41(3):148-151. doi: 10.5152/tpd.2017.5245.
46. Rodrigues FT, Moreira FA, Coutinho T, Dubey JP, Cardoso L, Lopes AP. Antibodies to *Toxoplasma gondii* in slaughtered free-range and broiler chickens. *Vet Parasitol.* 2019 Jul;271:51-53. doi: 10.1016/j.vetpar.2019.06.007.
47. Santos TR, Costa AJ, Toniollo GH, Luvizotto MC, Benetti AH, Santos RR, Matta DH, Lopes WD, Oliveira JA, Oliveira GP. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dairy cattle, dogs, and humans from the Jauru micro-region, Mato Grosso state, Brazil. *Vet Parasitol.* 2009 May 12;161(3-4):324-6. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.01.017.
48. Sarr A, Galal L, Boumediene F, Hamidović A, Dardé ML, Diallo M, Sow A, Niang Y, Cuny T, Mercier A. Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in free-range chickens in Senegal, West Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2020 Jan;20(1):15-21. doi: 10.1089/vbz.2019.2481.
49. Sawadogo P, Bellele B, Flori P, Villena I, Hassaine A, Ounayn M, Raberin H, Chait A, Sung RTM, Hafid J. Detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in Cattle in Marrakech, Morocco. *Parasitol Unit J.* 2008;1(2):149-51.
50. Sawadogo P, Hafid J, Bellele B, Sung RT, Chakdi M, Flori P, Raberin H, Hamouni IB, Chait A, Dalal A. Seroprevalence of *T. gondii* in sheep from Marrakech, Morocco. *Vet Parasitol.* 2005 Jun 10;130(1-2):89-92. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.03.025.
51. Shapiro K, Bahia-Oliveira L, Dixon B, Dumètre A, de Wit LA, VanWormer E, Villena I. Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: Oocysts in water, soil and food. *Food Waterborne Parasitol.* 2019 Apr 1;15:e00049. doi: 10.1016/j.fawpar.2019.e00049.
52. Shwab EK, Saraf P, Zhu XQ, Zhou DH, McFerrin BM, Ajzenberg D, Schares G, Hammond-Aryee K, van Helden P, Higgins SA, Gerhold RW, Rosenthal BM, Zhao X, Dubey JP, Su C. Human impact on the diversity and virulence of the ubiquitous zoonotic parasite *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 Jul 17;115(29):E6956-E6963. doi: 10.1073/pnas.1722202115.
53. Sroka J, Karamon J, Wójcik-Fatla A, Piotrowska W, Dutkiewicz J, Bilska-Zajac E, Zajac V, Kochanowski M, Dąbrowska J, Cencek T. *Toxoplasma gondii* infection in slaughtered pigs and cattle in Poland: seroprevalence, molecular detection and characterization of parasites in meat. *Parasit Vectors.* 2020 May 4;13(1):223. doi: 10.1186/s13071-020-04106-1.
54. Stelzer S, Basso W, Benavides Silván J, Ortega-Mora LM, Maksimov P, Gethmann J, Conraths FJ, Schares G. *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis in farm animals: Risk factors and economic impact. *Food Waterborne Parasitol.* 2019 Apr 3;15:e00037. doi: 10.1016/j.fawpar.2019.e00037.
55. Tagwireyi WM, Etter E, Neves L. Seroprevalence and associated risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in domestic animals in southeastern South Africa. *Onderstepoort J Vet Res.* 2019 Nov 5;86(1):e1-e6. doi: 10.4102/ojvr.v86i1.1688.
56. Tonouhewa ABN, Akpo Y, Sherasiya A, Sessou P, Adinci JM, Aplogan GL, Youssao I, Assogba MN, Farougou S. A serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in sheep and goat from Benin, West-Africa. *J Parasit Dis.* 2019 Sep;43(3):343-349. doi: 10.1007/s12639-018-01076-1.
57. Vaitukaitis J, Robbins JB, Nieschlag E, Ross GT. A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J Clin Endocrinol Metab.* 1971 Dec;33(6):988-91. doi: 10.1210/jcem-33-6-988.
58. Weigel RM, Dubey JP, Siegel AM, Kitron UD, Mannelli A, Mitchell MA, Mateus-Pinilla NE, Thulliez P, Shen SK, Kwok OC, et al. Risk factors for transmission of *Toxoplasma gondii* on swine farms in Illinois. *J Parasitol.* 1995 Oct;81(5):736-41.
59. Xu P, Song X, Wang W, Wang F, Cao L, Liu Q. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in chickens in Jinzhou, northeastern China. *J Parasitol.* 2012 Dec;98(6):1300-1. doi: 10.1645/GE-3164.1.
60. Yan C, Yue CL, Yuan ZG, He Y, Yin CC, Lin RQ, Dubey JP, Zhu XQ. *Toxoplasma gondii* infection in domestic ducks, free-range and caged chickens in southern China. *Vet Parasitol.* 2009 Nov 12;165(3-4):337-40. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.07.015.
61. Zhu J, Yin J, Xiao Y, Jiang N, Ankarlev J, Lindh J, Chen Q. A sero-epidemiological survey of *Toxoplasma gondii* infection in free-range and caged chickens in northeast China. *Vet Parasitol.* 2008 Dec 20;158(4):360-3. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.09.024.
62. Zou J, Huang XX, Yin GW, Ding Y, Liu XY, Wang H, Chen QJ, Suo X. Evaluation of *Toxoplasma gondii* as a live vaccine vector in susceptible and resistant hosts. *Parasit Vectors.* 2011 Aug 28;4:168. doi: 10.1186/1756-3305-4-168.