

## DEVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UNE NOUVELLE METHODE DE DIAGNOSTIC DU BOTULISME AVIAIRE.

C. Le Maréchal <sup>1</sup>, S. Rouxel <sup>1</sup>, V. Ballan <sup>1</sup>, E. Houard <sup>1</sup>, T. Poezevara <sup>1</sup>, M.H Bayon-Auboyer <sup>3</sup>, R. Souillard <sup>2</sup>, H. Morvan <sup>3</sup>, Séverine Rautureau <sup>6</sup>, Isabelle Guerry <sup>6</sup>, Loïc Cartau <sup>6</sup>, M.A. Baudouard <sup>3</sup>, C. Woudstra <sup>4</sup>, C. Mazuet <sup>5</sup>, S. Le Bouquin <sup>2</sup>, P. Fach <sup>4</sup>, M. Popoff <sup>5</sup>, M. Chemaly <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Anses, Laboratoire de Ploufragan – Plouzané, Unité Hygiène et qualité des produits avicoles et porcins, Université Bretagne-Loire, BP 53, 22440 Ploufragan, France

<sup>2</sup> Anses, Laboratoire de Ploufragan – Plouzané, Unité d'Epidémiologie et bien-être en aviculture et cuniculture, Université Bretagne-Loire, BP 53, 22440 Ploufragan, France

<sup>3</sup> Laboce, 22440 Ploufragan, France

<sup>4</sup> Anses, Laboratoire de sécurité des aliments, 94 700 Maisons Alfort, France

<sup>5</sup> Institut Pasteur, Bactéries anaérobies et Toxines, 75 724 Paris Cedex 15, France

<sup>6</sup> Direction Générale de l'Alimentation 251 rue de Vaugirard, 75732 Paris Cedex 15, France

[Caroline.lemarechal@anses.fr](mailto:Caroline.lemarechal@anses.fr)

### RÉSUMÉ

Le diagnostic du botulisme aviaire est réalisé sur la base des symptômes cliniques qui sont évocateurs mais non caractéristiques et nécessite une confirmation en laboratoire pour identifier le type toxinique impliqué. Pour cela, deux approches sont possibles : la démonstration de la présence de la toxine botulique ou la démonstration de la présence du pathogène capable de produire la toxine botulique. Cette dernière approche a été retenue et une étude a été mise en place afin 1) d'identifier les prélèvements les plus pertinents à analyser pour confirmer le botulisme en laboratoire et 2) d'optimiser les paramètres de l'analyse. Le développement et la validation de la méthode ont été réalisés selon les recommandations de la norme NF U 47-600. Pour 63 suspicions de botulisme aviaire, les foies, rates, écouvillons cloacaux et contenus intestinaux ont été prélevés sur des animaux suspects et ont été analysés par PCR temps réel après enrichissement en conditions anaérobies. Suite à la sélection de l'organe à prélever lors de la première partie de l'étude, les étapes allant des conditions de conservation du prélèvement jusqu'à l'extraction d'ADN ont été optimisées à partir de matrices d'origine aviaire naturellement et artificiellement contaminées. Cette étude montre que l'analyse des foies prélevés sur 4 animaux suspects permet d'obtenir le taux de confirmation le plus élevé (97%). Les prélèvements de foie peuvent être conservés 24h à 5°C avant mise en analyse ou à une température inférieure à -18°C s'ils doivent être conservés plus longtemps. La prise d'essai optimal est l'organe entier. La température optimale d'enrichissement est 37°C de préférence en enceinte anaérobie. L'analyse de 73 suspicions en appliquant cette méthode montre une spécificité de 100 % et une sensibilité de 95.35% en comparaison avec d'autres méthodes PCR.

### ABSTRACT

#### Development and validation of a new method for the diagnosis of avian botulism

Avian botulism diagnosis is based on clinical symptoms which are indicative but not specific and requires laboratory confirmation. Two strategies can be applied: demonstration of the presence of the BoNT or of the presence of the BoNT-producing clostridia. This latter strategy was selected and a study was implemented to 1) determine the most relevant samples for avian botulism diagnosis, 2) optimize the method. Development and validation of the method was done according to the recommendations of Norma NF U 47-600. Livers, spleens, cloacal swabs and intestinal contents from 63 suspicions were collected from suspected animals and analyzed using real-time PCR after an enrichment step in anaerobic conditions. After the selection of the most relevant matrix, steps going from the conditions of sample preservation to DNA extraction were optimized using both naturally contaminated samples and spiked samples. This study shows that the analysis of whole livers collected from 4 animals is the best approach to confirm botulism (97% of confirmation). Livers can be stored at 5°C during 24h before the analysis or at -18°C if needed. Analysis of whole liver is recommended. Optimal temperature for the enrichment is 37°C in an anaerobic station. Analysis of 73 suspicions using the method developed here, showed a specificity of 100 % and sensitivity of 95.35 % when compared to other PCR methods.

## INTRODUCTION

Le botulisme est une affection neuromusculaire due à l'action de toxines produites par *Clostridium botulinum*. Il existe 7 types toxiques annotés de A à G. Le botulisme humain est associé aux types A, B, E et F. Les cas de botulisme animal recensés ces dernières années en Europe sont majoritairement associés aux toxines mosaïques C/D et D/C (Skarin et al. 2013; Woudstra et al., 2012). Le diagnostic du botulisme animal peut se faire de deux façons : soit par la mise en évidence de la toxine botulique soit par la mise en évidence de la présence de clostridies capables de produire la toxine botulique. Cette dernière approche a été retenue et un outil de détection de PCR en temps réel a été développé (Woudstra et al. 2012). Les étapes d'analyse qui précèdent l'étape de PCR en temps réel n'ont pas été optimisées jusqu'à présent. Dans cette étude nous nous sommes donc intéressés aux étapes d'analyse réalisées en amont de la PCR en temps réel et à leur optimisation: choix du prélèvement à analyser, conditions de conservation des prélèvements, prise d'essai, conditions d'enrichissement. La méthode ainsi développée a ensuite été validée selon les recommandations de la norme NF U 47-600 partie 2. Des échantillons naturellement ou artificiellement contaminés ont été utilisés dans cette étude.

## 1. MATERIELS ET METHODES

### 1.1. Analyse des prélèvements sur animaux

Entre 2013 et 2016, il a été demandé aux vétérinaires (sur la base du volontariat) d'envoyer des foies, rates, contenus intestinaux, écouvillons cloacaux prélevés sur 5 animaux (de préférence animaux malades euthanasiés) en cas de suspicion de botulisme aviaire. Les contenus intestinaux ont été regroupés et 1g de mélange a été analysé. Pour les foies, différentes prises d'essai ont été testées : pool des 5 foies puis analyse d'1g, analyse individuelle d'1g de chaque foie, analyse des foies entiers individuellement (max 25g).

Tous les prélèvements ont été dilués au 1/10<sup>ème</sup> dans du milieu régénéré Tryptone Peptone Glucose Yeast (TPGY) (Skarin et al. 2010), homogénéisés à l'aide d'un Pulsifier® (Microgen, Surrey, UK) pendant 15 secondes. L'ensemble des prélèvements a été incubé au moins 48h à 37°C dans une enceinte anaérobie.

### 1.2 Inoculation artificielle des foies.

Des foies de poulets de chair ont été broyés à l'aide d'un mixeur puis aliquotés par 5g. Ils ont ensuite été artificiellement inoculés par différentes quantités de spores de clostridies. Une souche de type C (CIP 109 785), une de type D (CIP 105 256) et une de type E (HV) ont été utilisées. Les spores ont été préparées selon Lindberg et al. 2010.

Une fois contaminés, les échantillons ont été dilués au 1/10<sup>ème</sup> dans du TPGY régénéré puis homogénéisés via l'utilisation du Pulsifier® pendant 15 secondes et incubés au moins 24h en anaérobie avant extraction d'ADN.

### 1.3. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN a été réalisée à partir d'1ml de chaque enrichissement via le kit commercial QiaAmp DNA MiniKit® (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur.

### 1.4 PCR en temps réel

La détection des gènes codant pour les toxines C, D, C/D, D/C et E a été réalisée par PCR en temps réel tel que décrit précédemment (Le Maréchal et al. 2016) et un kit commercial (QuantiFast Pathogen +IC kits, Qiagen) a été utilisé comme contrôle interne.

### 1.5 Conditions de conservation des prélèvements

Des foies contaminés artificiellement ont été conservés à température ambiante, 5°C ou -18°C pendant des durées variables (allant de 24h à 6 mois selon les températures). Ils ont ensuite été analysés selon la méthode décrite ci-dessus. Six réplicats ont été réalisés pour chaque condition.

### 1.6 Conditions d'enrichissement

Des foies contaminés artificiellement ont été incubés à 3 températures : 30°C, 37°C et 41,5°C. Ils ont ensuite été analysés selon la méthode décrite ci-dessus. Six réplicats ont été réalisés pour chaque condition.

Trois modes d'anaérobie ont aussi été testés : enceinte anaérobie, jarre avec gaz ou jarre avec AnaeroGen (Oxoid). Six réplicats ont été réalisés pour chaque condition.

### 1.7 Validation de la méthode

Des foies ont été contaminés artificiellement avec différents niveaux de spores puis analysés selon la méthode développée dans l'étude. La dernière dilution de spores permettant d'obtenir 100 % de détection est considérée comme la limite de détection de la méthode. Huit réplicats ont été réalisés pour chaque condition.

L'analyse de 73 suspicions a été réalisée avec la méthode développée. Les résultats obtenus ont été comparés avec d'autres méthodes PCR publiées (Hill et al. 2010 ; Kougouchi et al. 2006) afin de déterminer la spécificité et sensibilité de la méthode.

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

### 2.1 Identification du prélèvement à analyser.

Soixante-trois suspicions (49 en élevage, 14 en faune sauvage) ont été analysées et 37 d'entre-elles ont été confirmées. Les épisodes étaient majoritairement de type C/D (84 %), aucun épisode de type E n'a été

diagnostiqué. L'analyse des foies a permis de confirmer 97 % des épisodes de botulisme contre 90 % via l'analyse des rates, 93 % via l'analyse des écouvillons cloacaux et 46 % via l'analyse des contenus intestinaux poolés (Figure 1) et constitue donc la matrice la plus appropriée pour la détection de *C. botulinum* en cas de botulisme aviaire. Le foie avait été choisi à l'origine car la présence de *C. botulinum* dans cet organe lors d'épisodes de botulisme aviaire a été rapportée à plusieurs reprises dans la littérature (Annibali et al. 2013, Dohms et al. 1982, Franciosa et al. 1996, Popp et al. 2012, Wlodarczyk et al. 2014). Les contenus intestinaux poolés ne semblent pas une bonne matrice pour détecter *C. botulinum* par PCR. Ceci pourrait s'expliquer par la présence de la flore annexe qui inhiberait *C. botulinum* pendant la phase d'enrichissement (Okereke et al. 1991, Krüger et al. 2013) ou par le fait de pooler les échantillons qui pourrait avoir un effet de dilution (Le Maréchal et al. 2016).

L'analyse de 4 foies permet d'obtenir les mêmes résultats que l'analyse de 5 foies (méthode statistique adaptée de Sandberg et al. 2006). Ceci pourrait s'expliquer par le fort taux d'échantillons positifs parmi les échantillons analysés dans les élevages atteints.

## 2.2 Prise d'essai pour l'analyse des foies

Différentes prises d'essai ont été testées pour 34 suspicions de botulisme aviaire dont 22 confirmés. L'analyse des foies en entier (dans la limite de 25g) est la méthode qui permet d'obtenir la meilleure sensibilité (100 % de détection) par rapport à l'analyse d'1g de chaque foie (90 % de confirmation), ou de pools de foie (58 % de confirmation). Ces résultats montrent que la contamination n'est pas homogène dans le foie et que l'analyse de l'organe en entier est préférable.

## 2.3 Conditions de conservation des foies.

Des foies inoculés artificiellement avec 5 spores par gramme de foie ont été conservés 7 jours à température ambiante, à 5°C et à -18°C. Seuls les foies stockés à -18°C ont permis de détecter *C. botulinum*, aucune détection n'a été mise en évidence pour les foies stockés à 5°C ou à température ambiante pendant 7 jours. La conservation des foies à 5°C est possible pendant 24 h sans modification de sensibilité de la méthode mais une diminution de la détection est observée à partir de 48 h de conservation à cette température (83,5 % de détection pour le type C et 50 % pour le type D pour les foies inoculés avec 5 spores/g de foie). Au contraire la détection reste identique après 1 mois et 6 mois de stockage à -18°C. Ces résultats montrent que les foies peuvent être stockés avant analyse à 5°C pendant 24 h ou à -18°C pour une durée de stockage plus longue.

## Conditions d'enrichissement

Des foies inoculés artificiellement avec 5 spores par gramme de foie ont été incubés 24 h dans une enceinte anaérobie ou une jarre remplie de gaz ou une jarre avec un sachet AnaeroGen (Oxoid) à 37°C. Les résultats montrent que l'enceinte anaérobie permet d'obtenir une meilleure sensibilité que les deux autres méthodes (100 % de détection pour les foies inoculés avec 5 spores/g de foie contre 33,3% pour la jarre avec le gaz et 66,7 % pour la jarre avec un sachet pour la souche de type C) et doit donc être privilégiée. Aucune différence n'a été notée avec la souche de type D pour les 3 modes d'anaérobiose.

Des foies inoculés artificiellement avec 5 spores par gramme de foie ont été incubés 24 h à 30°C, 37°C ou 41,5°C en anaérobiose. Les résultats montrent que la souche de type C est bien détectée à 41,5°C et 37°C alors que la souche de type D est bien détectée à 30°C et 37°C. La température de 37°C apparaît donc comme la température consensus pour détecter les deux souches en même temps.

## Validation de la méthode

Des foies ont été inoculés artificiellement avec différentes quantités de spores de *C. botulinum* de type C, D ou E (Tableau 1) et analysés selon la méthode développée dans cette étude (Figure 2). La limite de détection est de 5 spores/g de foie pour les souches de type C et D testées et 250 spores/g de foie pour la souche de type E.

Des échantillons naturellement contaminés (268 foies provenant de 73 suspicions de botulisme en France en 2014 et 2015) ont été analysés selon la méthode développée dans cette étude (Figure 2) et les résultats obtenus ont été comparés avec d'autres PCR (Kougouchi et al. 2006, Hill et al. 2010). A l'échelle de la suspicion, la méthode a une sensibilité de 95,35 % [90,52 %-100 %] et une spécificité de 100 %.

## CONCLUSION

Cette étude a permis de développer et valider une méthode robuste et sensible pour le diagnostic du botulisme aviaire. Cette méthode consiste en l'analyse de 4 foies entiers (dans la limite de 25g) prélevés sur des animaux symptomatiques. Les prélèvements peuvent être conservés 24 h à 5°C puis à -18°C avant mise en analyse. Chaque foie est enrichi individuellement à 37°C en enceinte anaérobie pendant au moins 24 h puis l'ADN est extrait et la détection est réalisée par PCR en temps réel.

## REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier l'ensemble des éleveurs, des vétérinaires et des organisations de production pour leur participation à l'étude. Cette étude est financée par le conseil général des Côtes d'Armor et la Direction Générale de l'Alimentation.

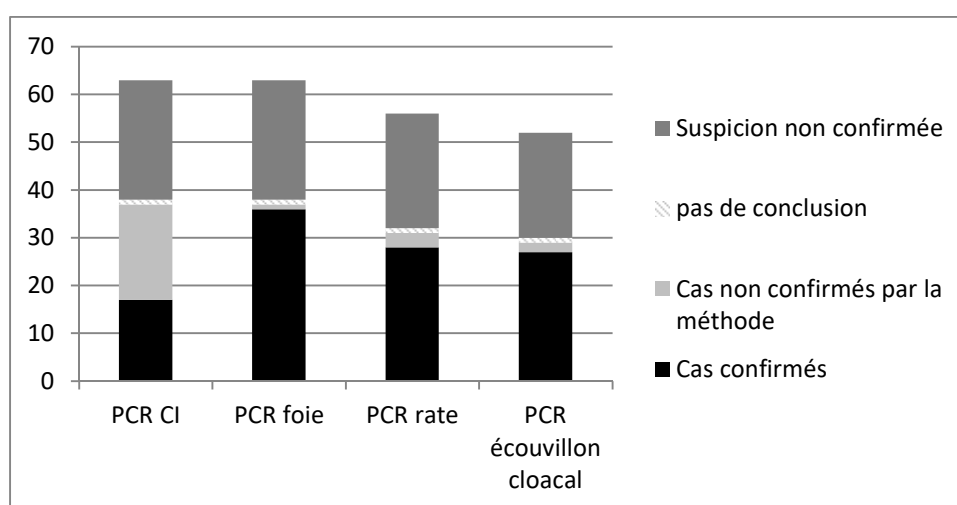
## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AFNOR 2015 NF U47-600-1. Méthodes d'analyse en santé animale - PCR (réaction de polymérisation en chaîne) - Partie 1 : exigences et recommandations pour la mise en œuvre de la PCR en santé animale.
- AFNOR 2015 NFU 47-600-2. Méthodes d'analyse en santé animale - PCR (réaction de polymérisation en chaîne) - Partie 2 : exigences et recommandations pour le développement et la validation de la PCR en santé animale.
- Anniballi, F., Auricchio, B., Woudstra, C., Fach, P., Fiore, A., Skarin, H., Bano, L., Segerman, B., Knutsson, R., De Medici, D., 2013. Multiplex real-time PCR for detecting and typing *Clostridium botulinum* group III organisms and their mosaic variants. *Biosecurity and Bioterrorism* 11, S207-S214.
- Dohms, J.E., Allen, P.H., Rosenberger, J.K., 1982. Cases of type C botulism in broiler chickens. *Avian Dis* 26, 204-210.
- Dohms, J.E., Cloud, S.S., 1982. Susceptibility of broiler chickens to *Clostridium botulinum* type C toxin. *Avian Dis* 26, 89-96.
- Hill, B.J., Skerry, J.C., Smith, T.J., Arnon, S.S., Douek, D.C., 2010. Universal and specific quantitative detection of botulinum neurotoxin genes. *BMC Microbiol* 10, 267.
- Kouguchi, H., Suzuki, T., Hasegawa, K., Mutoh, S., Watanabe, T., Niwa, K., Yoneyama, T., Katoh, Y., Ohyama, T., 2006. Quantitative detection of gene expression and toxin complex produced by *Clostridium botulinum* serotype D strain 4947. *J Microbiol Methods* 67, 416-423.
- Krüger, M., Shehata, A.A., Schrödl, W., Rodloff, A., 2013. Glyphosate suppresses the antagonistic effect of *Enterococcus* spp. on *Clostridium botulinum*. *Anaerobe* 20, 74-78.
- Le Marechal, C., Ballan, V., Rouxel, S., Bayon-Auboyer, M.H., Baudouard, M.A., Morvan, H., Houard, E., Poezevara, T., Souillard, R., Woudstra, C., Le Bouquin, S., Fach, P., Chemaly, M., 2016. Livers provide a reliable matrix for real-time PCR confirmation of avian botulism. *Anaerobe* 38, 7-13.
- Lindberg, A., Skarin, H., Knutsson, R., Blomqvist, G., Baverud, V., 2010. Real-time PCR for *Clostridium botulinum* type C neurotoxin (BoNTC) gene, also covering a chimeric C/D sequence-Application on outbreaks of botulism in poultry. *Veterinary Microbiology* 146, 118-123.
- Okereke, A., Montville, T.J., 1991. Bacteriocin-mediated inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria at refrigeration and abuse temperatures. *Appl Environ Microbiol* 57, 3423-3428.
- Popp, C., Hauck, R., Gad, W., Hafez, H.M., 2012. Type C botulism in a commercial Turkey farm: A case report. *Avian Diseases* 56, 760-763.
- Sandberg, M., Ostensvik, O., Aunsmo, A.L., Skjerve, E., Hofshagen, M., 2006. An evaluation of sampling- and culturing methods in the Norwegian action plan against *Campylobacter* in broilers. *Int J Food Microbiol* 106, 313-317.
- Skarin, H., Lindberg, A., Blomqvist, G., Aspan, A., Baverud, V., 2010. Molecular characterization and comparison of *Clostridium botulinum* type C avian strains. *Avian Pathology* 39, 511-518.
- Skarin, H., Tevell Åberg, A., Woudstra, C., Hansen, T., Löfström, C., Koene, M., Bano, L., Hedeland, M., Anniballi, F., De Medici, D., Olsson Engvall, E., 2013. The workshop on animal botulism in Europe. *Biosecurity and Bioterrorism* 11, S183-S190.
- Wlodarczyk, R., Minias, P., Kukier, E., Grenda, T., Smietanka, K., Janiszewski, T., 2014. The first case of a major avian type C botulism outbreak in Poland. *Avian Dis* 58, 488-490.
- Woudstra, C., Skarin, H., Anniballi, F., Fenicia, L., Bano, L., Drigo, I., Koene, M., Bayon-Auboyer, M.H., Buffereau, J.P., De Medici, D., Fach, P., 2012. Neurotoxin gene profiling of *Clostridium botulinum* types C and D native to different countries within Europe. *Appl Environ Microbiol* 78, 3120-3127.

**Tableau 1.** Détermination des limites de détection de la méthode : Pourcentage de détection pour chaque souche en fonction de la quantité de spores artificiellement inoculée dans la matrice foie. (- : Non Testé, NPP : Nombre le plus probable)

		Type toxinique		
		C	D	E
Spores (NPP/g foie)	500	-	-	100%
	250	-	-	100%
	50	100%	100%	75%
	5	100%	100%	0%
	<1	38%	63%	-

**Figure 1.** Résultats de confirmation des suspicions de botulisme aviaire en fonction des prélèvements analysés.  
CI : pool de contenus intestinaux



**Figure 2 :** Méthode de diagnostic du botulisme aviaire développée et validée dans cette étude.

