

**ETUDE DE LA CONTAMINATION ENVIRONNEMENTALE  
PAR *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* DANS LES ELEVAGES  
DE VOLAILLES ATTEINTS DE BOTULISME**

**Souillard Rozenn<sup>1</sup>, Le Maréchal Caroline<sup>1</sup>, Léon Denis<sup>1</sup>, Sandra Rouxel<sup>1</sup>, Valentine Ballan<sup>1</sup>,  
Dia Mohamed<sup>1</sup>, Woudstra Cédric<sup>2</sup>, Fach Patrick<sup>2</sup>, Bayon-Auboyer Marie Hélène<sup>3</sup>,  
Le Bouquin Sophie<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Anses Laboratoire de ploufragan-Plouzané 22440 Ploufragan  
<sup>2</sup>Anses Laboratoire de sécurité des aliments 94706 Maisons Alfort  
<sup>3</sup>Labocea 22440 Ploufragan

[rozenn.souillard@anses.fr](mailto:rozenn.souillard@anses.fr)

**RÉSUMÉ**

Le botulisme aviaire est une affection nerveuse paralytique entraînant de fortes mortalités dans les élevages de volailles. La maladie est provoquée par l'action de neurotoxines produites par *Clostridium botulinum*. Il s'agit d'une bactérie pouvant résister dans l'environnement sous forme sporulée et susceptible d'être à l'origine de récurrence dans les élevages. Les objectifs de cette étude sont (1) d'évaluer la contamination environnementale des élevages atteints de botulisme par *C. botulinum* et (2) d'identifier les points à risque pour la décontamination des sites. Pour cela, 30 cas de botulisme aviaire ont été investigués. Au cours des épisodes cliniques, des prélèvements environnementaux ont été collectés selon 8 secteurs : bâtiment, sas sanitaire, circuit de ventilation, abords extérieurs, réservoir animal, eau de boisson, aliment et bac d'équarrissage. Pour 22 élevages, il a été possible de réaliser des prélèvements environnementaux après la désinfection des sites. Ces prélèvements ont été analysés par PCR afin de détecter *C. botulinum* de type C, D, CD, DC et E. Lors des épisodes cliniques, *C. botulinum* essentiellement de type CD, a été détecté dans 29.9% des prélèvements environnementaux (29 élevages sur les 30 investigués). Les zones les plus contaminées étaient le bâtiment (23 élevages positifs/30), les abords (18 élevages /29), l'eau de boisson (20 élevages /29) et les réservoirs animaux (13 élevages/22). Après la désinfection des sites, *C. botulinum* de type CD a été détecté dans 13.5% des prélèvements environnementaux (16 élevages sur les 22 investigués), notamment au niveau des circuits de ventilation, des abords et dans les canalisations d'eau. Il s'agit des principaux points à risque identifiés pour la décontamination des élevages de volailles atteints de botulisme, de même que la lutte contre les insectes qui constituent un réservoir de clostridies.

**ABSTRACT**

**Environmental contamination of *Clostridium botulinum* in poultry botulism outbreak.**

Botulism is a paralytic disease resulting in high mortality in poultry. Disease is caused by neurotoxins produced by *Clostridium botulinum*. This germ can survive in the environment as spore form, which is likely to be the cause of recurrence in poultry house. The aims of this study are (1) to assess the environmental contamination of the affected farms by *C. botulinum* and (2) to identify critical contamination areas for the decontamination operations. 30 avian botulism outbreaks have been investigated. During the disease, environmental samples have been collected in 8 sections: poultry house, changing room, ventilation system, surroundings, animal reservoir, drinking water, feed and carcasses containers. In 22 houses, samples were collected after cleaning and disinfection operations. These samples were analyzed by real-time PCR targeting the C, D, CD, DC and E genes. During the disease, 29,9% of environmental samples were positive, essentially *C. botulinum* type CD (29 houses / 30 investigated). Areas more frequently contaminated were the house (23 positive houses/30), the surroundings (18 houses/29), drinking water (20 houses/29), and animal reservoir (13 houses/22). After disinfection operations, *C. botulinum* type CD was detected in 13,5% of environmental samples (16 houses / 22 investigated), particularly in ventilation system, on the surroundings and in drinking water pipes. These are the major critical points for the decontamination of affected poultry farms, as well as the fight against insects, which are potential reservoir of *C. botulinum*.

## INTRODUCTION

Le botulisme est une affection nerveuse paralytique provoquée par l'action de neurotoxines produites par *Clostridium botulinum*, une bactérie anaérobie et sporulante. Le botulisme humain est principalement associé aux toxines A, B et E et plus rarement F, alors que le botulisme animal est principalement lié aux toxines C et D (Dohms, 2008). Des types mosaïques C-D et D-C ont été récemment identifiés chez les oiseaux et les bovins (Woudstra et al., 2012). Les épisodes de botulisme ont augmenté en Europe depuis une dizaine d'année (Skarin et al., 2010). Les causes de cette recrudescence n'ont pas été identifiées et peu de données sont disponibles sur l'épidémiologie de la maladie. Les spores de *C. botulinum* peuvent résister pendant de nombreuses années dans l'environnement et être à l'origine de récurrence dans les élevages (Okamoto et al., 1999). L'évaluation de la contamination environnementale des élevages par *C. botulinum* est essentielle pour mieux prévenir et contrôler la maladie en évitant les risques de récurrences et de contamination croisée. Pour cela, des premières investigations épidémiologiques ont été menées dans des élevages de volailles (Souillard et al., 2014). Les objectifs de cette étude conduite sur un nombre plus important d'élevages sont (1) d'évaluer la contamination environnementale des sites atteints de botulisme par *C. botulinum* et (2) d'identifier les points à risque pour la décontamination.

## 1. MATERIELS ET METHODES

### 1.1. Prélèvements dans les élevages atteints de botulisme

Entre 2011 et 2014, 30 élevages de volailles atteints de botulisme clinique ont été investigués. Les cas de botulisme ont été confirmés par le test de létalité sur souris et par PCR sur contenu intestinaux et/ou organes permettant d'identifier le type toxinique. Tous ces élevages ont été confirmés de type CD, sauf 2 de type DC. Dans ces 30 élevages, des prélèvements environnementaux ont été collectés selon 8 secteurs: bâtiment, sas sanitaire, circuit de ventilation, abords extérieurs, réservoir animal, eau de boisson, aliment et bac d'équarrissage. Différents prélèvements ont été réalisés dans ces secteurs: chiffonnettes, pédichiffonnettes, écouvillons, litière, terre, eau, aliment et insectes. Ces prélèvements ont été réalisés au moment du cas de botulisme et pour 22 élevages, une seconde visite a été réalisée après la première désinfection du site. Le nombre de prélèvements collectés est variable selon les élevages (en moyenne 15 prélèvements par élevage, de 2 à 26). Un nombre plus complet de prélèvements a en effet pu être réalisé depuis la création du Laboratoire National de Référence (LNR) botulisme à l'Anses en 2012 et les

types de prélèvements ont été également adaptés à chaque situation épidémiologique.

### 1.2. Analyses des prélèvements par PCR

Pour l'étape d'enrichissement, les échantillons ont été dilués au 1/10 en milieu d'enrichissement TPGY (trypticase-peptone glucose extrait de levure) et incubés en enceinte anaérobie à 37°C pendant 4 jours. Une quantité de 20g d'aliment, de litière, de terre, de 100 ml d'eau, de 10 à 15 ténébrions (lavés au détergent, rincés et écrasés) ont été analysés. Pour les chiffonnettes et les pédichiffonnettes, le TPGY a été rajouté directement dans le sac pour les immerger (200 à 250 ml). Après incubation, l'ADN de chaque échantillon a été extrait à partir de 1 ml d'enrichissement en utilisant le QIAamp® DNA Mini kit (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. Puis des analyses PCR en temps réel ont été réalisées, comme décrites dans une précédente étude (Souillard et al., 2014), permettant de détecter les séquences des gènes associées aux types C, D, CD, DC et E.

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

### 2.1. Les élevages de volailles atteints de botulisme

Les productions avicoles touchées par la maladie étaient essentiellement des poulets et dindes de chair: 14 élevages de dindes, 12 élevages de poulets, 2 élevages de canards, 1 élevage de poules pondeuses et 1 élevage de poulets futurs reproducteurs. Les taux de mortalité ont atteints plus de 20% dans 9 élevages et 4 lots ont été euthanasiés. Les taux de mortalité varient le plus souvent de 1% à 25% (Dohms *et al.*, 1982), mais des taux plus élevés ont aussi été observés jusqu'à 50% chez les dindes (Popp *et al.*, 2012). Parmi les 18 élevages sexés, uniquement les mâles ont été atteints dans 8 élevages, les femelles dans 2 élevages et les 2 sexes dans 8 élevages. Comme cela a déjà été rapporté dans d'autres études, les mâles semblent plus fréquemment atteints par la maladie (Popp *et al.*, 2012). Le botulisme s'est déclaré en moyenne à 28j (entre 10 et 45j) pour les poulets, et à 84j pour les dindes (entre 50 et 115j). Un historique botulisme a été signalé dans 8 élevages.

### 2.2. Détection de *C. botulinum* dans les élevages lors des épisodes cliniques

Lors des visites réalisées au moment des épisodes cliniques de botulisme, 29,9% (145/485) des prélèvements collectés ont été détectés positifs pour *C. botulinum*, essentiellement de type CD. On retrouve le même type toxinique sur les animaux et à partir des prélèvements environnementaux. En effet, pour les 2 élevages confirmés type DC sur animaux, les prélèvements environnementaux ont également été identifiés comme étant de type DC. Dans les élevages

identifiés type CD sur animaux, tous les prélèvements environnementaux collectés étaient de type CD, sauf dans 2 élevages pour lesquels un seul prélèvement a été identifié de type DC. Même si le type CD est le plus fréquent chez les oiseaux en Europe, des cas de botulisme de type DC sont également rapportés (Woudstra et al., 2012). Entre 2 et 28 prélèvements environnementaux ont été analysés dans chaque élevage (Figure 1). Plus de la moitié des prélèvements collectés ont été détectés positifs dans 9 élevages. Pour un seul élevage, tous les prélèvements ont été trouvés négatifs. 5 secteurs ont été détectés positifs dans plus de la moitié des élevages investigués (Figure 3) : le bâtiment (23 élevages/30), les abords extérieurs (18 élevages/29), l'eau de boisson (20 élevages/29), les réservoirs animaux (13 élevages /22) et également le bac d'équarrissage (8 élevages/10). Dans le bâtiment, les pédichiffonnettes ont été les échantillons les plus fréquemment contaminés : 51% de pédichiffonnettes positives (21/41) dans 16 élevages/27. Il n'a pas été possible de détecter des spores de *C. botulinum* dans les 28 prélèvements de terre. Comme nous l'avons observé dans notre étude, il a déjà été rapporté que la litière pouvait être contaminée par *C. botulinum* lors d'épisode de botulisme (Okamoto et al., 1999), notamment par les fientes et les cadavres de volailles contaminés. Les pédichiffonnettes sur la litière se révèlent être une bonne méthode pour détecter le germe dans le bâtiment. La poussière des parois essentiellement composée de particules de fientes a également été trouvée positive sur des chiffonnettes dans 8 élevages. A partir du bâtiment, le germe semble diffuser vers l'extérieur, via les activités du personnel, le matériel et également la poussière. En effet, dans le sas sanitaire, environ un tiers des chiffonnettes a été détecté positif. Au niveau des circuits de ventilation, 29,2% des chiffonnettes ont été trouvées positives. La poussière contaminée semble diffuser par le système de ventilation. A l'extérieur du bâtiment, les pédichiffonnettes sur les abords ont été les prélèvements les plus contaminés (46,8% de pédichiffonnettes positives dans 14 élevages/29). *C. botulinum* est un germe hydrotellurique qui a déjà été identifié dans la terre ou la boue lors d'épisodes de botulisme chez les oiseaux (Okamoto et al., 1999). On a également retrouvé le germe dans de l'eau de surface (caniveau à proximité du bâtiment) et sur des stocks de paille dans des hangars proches du bâtiment. Comme ces prélèvements ont été réalisés au moment des épisodes cliniques, il est difficile de savoir s'il s'agit d'une source de contamination ou d'une dissémination du germe suite au cas de botulisme.

Concernant l'eau de boisson, c'est essentiellement l'eau en bout de ligne qui a été détectée positive dans 41% des prélèvements (19/46). Des écouvillons réalisés dans les canalisations ont également été détectés positifs dans 5 élevages /15. Il est possible que l'eau en bout de ligne soit contaminée par la

poussière du bâtiment (remontée dans les canalisations ou par le bac à eau). L'hydrophobicité des spores pourraient leur permettre d'adhérer au biofilm des canalisations (Wienczek et al., 1990). L'eau de forage a également été prélevée et s'est révélée positive dans 4 élevages/14. L'eau de forage pourrait également être contaminée par des cadavres de petits animaux, et être à l'origine d'une contamination de l'eau de boisson. Pour l'aliment, 2 prélèvements dans les mangeoires se sont révélés positifs dans 2 élevages, ce qui peut s'expliquer par une contamination par les fientes et la poussière du bâtiment. Pour un élevage, de l'aliment du silo a été détecté positif. L'aliment pourrait être une source de contamination, mais du fait probablement de la difficulté de l'échantillonnage, cela a été peu rapporté dans la littérature.

Concernant les éventuels réservoirs animaux de *C. botulinum*, les insectes ont été trouvés positifs, notamment des mouches dans 3 élevages et des ténébrions dans 10 élevages. Il a été rapporté récemment que des mouches pouvaient être porteuses de *C. botulinum* (Vidal et al., 2011). Les ténébrions pourraient également être des vecteurs du germe. Par ailleurs, une chiffonnette réalisée sur un rongeur mort a été détectée positive. Lors d'un épisode de botulisme chez des dindes en Allemagne, le germe avait également été identifié à partir du foie et de la rate d'un rat mort (Popp et al., 2012). D'où l'importance de la dératisation et la désinsectisation dans la prévention du botulisme. *C. botulinum* a également été détecté dans les bacs d'équarrissage, confirmant la positivité des cadavres qui constituent un excellent milieu de culture pour *C. botulinum*, du fait des conditions d'anaérobiose (Rapport AFSSA, 2002).

Les prélèvements positifs détectés dans notre étude sont liés aux épisodes cliniques de botulisme. En effet, même si les données de la littérature indiquent que *C. botulinum* est un germe ubiquiste, cette donnée reste controversée. En effet, dans 2 études récentes menées en France (Souillard et al., 2013) et en Norvège (Hardy et al., 2013), aucun portage intestinal n'a été détecté dans 23 lots de poulets en France et dans 100 lots en Norvège. Dans l'environnement, un seul élevage de chaque étude a été trouvé positif. Par conséquent, *C. botulinum* ne semble pas être un germe ubiquiste dans les élevages de volailles et sa détection dans l'environnement est liée à un épisode clinique de la maladie.

### 2.3. Détection de *C. botulinum* dans les élevages après la désinfection

Après la première désinfection des 22 sites d'élevage, 13,5% des prélèvements collectés ont été détectés positifs (40/295). Entre 2 et 22 prélèvements ont été analysés dans chaque élevage (figure 2). Dans 6 élevages, tous les prélèvements ont été négatifs. Pour les autres, entre 1 et 6 prélèvements ont été trouvés

positifs. 4 secteurs ont été détectés positifs dans plus d'un quart des élevages (figure 3) : le bâtiment (8 élevages/21), le circuit de ventilation (6 élevages/22), les abords (7 élevages/21) et les canalisations d'eau (4 élevages/15). Dans le bâtiment, les pédichiffonnettes et les chiffonnettes (11%) ont été les plus fréquemment positives. Sur les abords, ce sont les pédichiffonnettes (18,1%) qui ont été le plus souvent contaminées. Le germe semble persister dans le sol du bâtiment et à l'extérieur. Etant donnée la résistance des spores dans l'environnement, il apparaît difficile de détruire complètement les spores dans la terre (Dohms et al, 2008). Au niveau du circuit de ventilation, 16.3% des chiffonnettes ont été détectées positives. Le nettoyage et la désinfection des circuits de ventilation est difficile étant donnée la difficulté d'accès, la poussière contaminée peut alors y persister. Enfin, concernant l'eau de boisson, ce sont des écouvillons dans les canalisations d'eau qui ont été trouvés positifs dans 4 élevages. Le germe pourrait persister dans le biofilm des canalisations.

Cette étude nous a permis d'identifier des zones à risque et des prélèvements de choix pour contrôler l'efficacité de la décontamination des sites. Un nettoyage désinfection renforcé doit en effet être réalisé notamment aux entrées d'air et sorties d'air (ventilateurs, lanterneau, démontage des jupes) avec un décapage et une désinfection efficace des canalisations d'eau. Sur le sol dans le bâtiment et sur les abords, même s'il existe peu de données sur leur

efficacité spécifique contre les spores de *C. botulinum*, de la chaux ou de la soude sont utilisés. Pour les désinfectants, même si les spores semblent être inactivées par les aldéhydes (Rapport AFSSA, 2002), il n'existe pas d'étude spécifique indiquant un effet sporicide des désinfectants sur *C. botulinum*.

## CONCLUSION

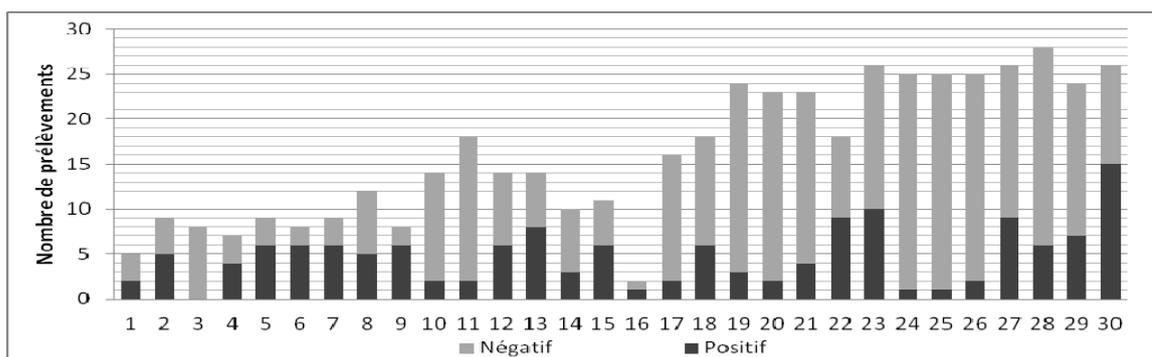
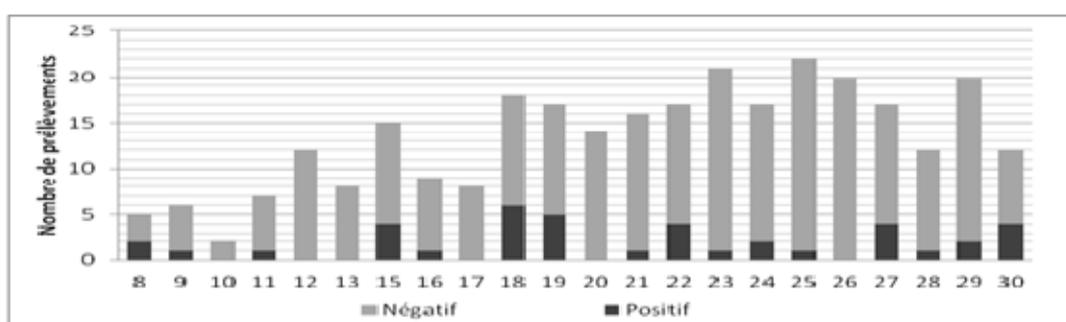
Cette étude a mis en évidence une dissémination de *C. botulinum* dans l'environnement des élevages de volailles atteints de botulisme. Elle a permis d'identifier les zones les plus contaminées lors des épisodes cliniques et de repérer les zones à risque pour la décontamination des sites, essentiellement les circuits de ventilation, les abords et les canalisations d'eau, sans oublier une lutte renforcée contre les réservoirs animaux (insectes et rongeurs). Il s'agit des principaux points à risque identifiés pour limiter les récurrences dans les élevages.

## REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier l'ensemble des éleveurs et des organisations de production pour leur participation à l'étude. Cette étude est financée par l'Anses et la Direction Générale de l'Alimentation, et a été menée dans le cadre de l'UMT Sanivol.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AFSSA., Octobre 2002 : Rapport sur le botulisme d'origine aviaire et bovine.
2. Dohms, J.E. (2008). In: *Diseases of poultry, 12th ed.* Ames Iowa State University Press, 879-885.
3. Dohms, J. E., Allen, P. H., & Rosenberger, J. K. (1982). *Avian Diseases*, 26, 204-210.
4. Hardy, S.P., Kaldhusdal, M. 2013. *Veterinary Microbiology*, 165, 466-468.
5. Okamoto, K., Adachi, M., Sato, K.I., Chuma, T. 1999. *Japan Veterinary Medical Association*, 52, 168-173.
6. Popp, C., Hauck, R., Gad, W., Hafez, H.M.. 2012. *Avian Diseases*, 56, 760-763.
7. Skarin, H., Lindberg, A., Blomqvist, G., Aspán, A., Båverud, V. 2010. *Avian Pathology*, 39, 511-518.
8. Souillard, R., Woudstra, C., Dia, M., Léon, D., Toux, J.Y., Guimaraes, V., Bayon-Auboyer, M.H., Michel, V., Le Bouquin, S., Fach, P. 2013. In 10ème *Journées de la Recherche Avicole*, 341-345.
9. Souillard R., C. Woudstra, C. Le Maréchal, M. Dia, M.H. Bayon-Auboyer, M. Chemaly, P. Fach, S. Le Bouquin. 2014. *Avian pathol.* 43 (5) p459-464.
10. Vidal, D., Anza, I., Taggart, M.A., Pérez-ramírez, E., Crespo, E., Hofle, U., Mateo, R., 2011. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23, 942-946.
11. Wiencek, K.M., Klapes, N.A., Foegeding, P.M., 1990. *Applied and Environmental Microbiol*, 56, 2600-2605.
12. 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 3120-3127.

**Figure 1.** Détection de *C. botulinum* dans les 30 élevages lors des épisodes cliniques.**Figure 2.** Détection de *C. botulinum* dans les 22 élevages après la désinfection.**Tableau 1.** Nombre de prélèvements et d'élevages positifs pour *C. botulinum* dans chaque secteur

		Episode clinique		Après la désinfection	
		nb de prélèvements positifs/nb de prélèvements analysés	nb d'élevages positifs/nb d'élevages prélevés	nb de prélèvements positifs/nb de prélèvements analysés	nb d'élevages positifs/nb d'élevages prélevés
<b>Bâtiment</b>	pedichiffonnette	21/41	16 /27	3/34	3/20
	chiffonnette parois	10/37	8 /22	5/36	3/21
	litiere	6/11	6 /10	-	-
	chiffonnette materiel	4/9	4/9	2/6	2/6
	terre	0/28	0/16	1/24	1/13
<b>Sas</b>	chiffonnette parois sol	10/29	10 /28	2/18	2/18
<b>Ventilation</b>	chiffonnette entree air	10/37	8 /21	7/35	5/21
	chiffonnette sortie air	9/28	6 /16	3/26	2/15
<b>Extérieur</b>	pedichiffonnette	15/32	14 /29	4/22	3/21
	terre	2/32	2 /18	2/31	2/16
	eau de surface	2/7	1 /4	2/4	2/4
	chiffonnette paille	3/9	3 /9	1/7	1/7
<b>Eau</b>	eau bout de ligne	19/46	16 /27	0/24	0/14
	ecouvillon canalisation	5/29	5 /15	6/18	4/10
	eau forage	4/33	4 /14	-	-
<b>Aliment</b>	aliment mangeoire	2/10	2 /10	-	-
	aliment silo tremie	1/29	1 /25	-	-
<b>Réservoirs</b>	rongeurs	1/5	1 /5	-	-
	mouches	3/3	3 /3	-	-
	tenebrions	10/20	10 /20	-	-
<b>Equarrissage</b>	chiffonnette bac	8/10	8 /10	2/10	2/10
<b>Total</b>	prélèvements positifs	145/485		40/295	

**Figure 3.** Détection de *C. botulinum* dans les élevages en présence des volailles \* et après la désinfection\*\*

