

Investigation d'un cas de botulisme aviaire dans un élevage de poules pondeuses plein-air

Sophie Le Bouquin (1), Caroline Le Maréchal (2), Valentine Ballan (2), Sandra Rouxel (2), Denis Léon (1), Loïc Balaine (1), Typhaine Poëzevara (2), Emmanuelle Houard (2), Brice Robineau (3), Corinne Robinault (4), Marianne Chemaly (2), Rozenn Souillard (1)

*Auteur correspondant: sophie.lebouquin-leneveu@anses.fr

(1) Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité d'épidémiologie et bien-être en aviculture et cuniculture, Ploufragan, France

(2) Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité hygiène et qualité des produits avicoles et porcins, Ploufragan, France

(3) Celtivet, Ploumagoar, France

(4) Direction départementale de la protection des populations des Côtes-d'Armor, Ploufragan, France

Résumé

Le botulisme est une affection neuro-paralytique sévère due aux toxines de *Clostridium botulinum*, commune à l'Homme et à l'animal. Elle se traduit chez les oiseaux par une paralysie flasque ascendante qui engendre régulièrement des pertes importantes dans les élevages de volailles. Si des cas ont déjà été rapportés et décrits dans l'avifaune et chez les volailles de chair, peu de cas ont été décrits en élevage de poules pondeuses. Cet article rapporte les investigations épidémiologiques conduites en 2014 dans un élevage de 5000 poules pondeuses plein-air des Côtes-d'Armor atteint de botulisme aviaire. Compte tenu de la durée d'élevage particulièrement longue dans cette filière, les investigations avaient pour objectif d'étudier en présence des animaux, la diffusion et la persistance de *C. botulinum* dans l'élevage au cours des six mois qui ont suivi l'épisode clinique. Une évaluation de la contamination des œufs par *C. botulinum* a aussi été réalisée. Un suivi longitudinal a été conduit, au cours duquel des échantillons ont été collectés dans le bâtiment d'élevage et dans son environnement. Trente œufs propres et trente œufs sales ont aussi été chiffonnés et le contenu de 24 œufs analysé. La bactérie a été détectée dans le bâtiment plus de cinq mois après l'épisode clinique, notamment sur les murs et le circuit des œufs. Concernant l'analyse des œufs, la bactérie a été retrouvée sur la coquille mais jamais dans le contenu de l'œuf, ce qui confirme l'absence de transmission verticale du botulisme. En l'absence de mesures de police sanitaire définies pour ce danger sanitaire de première catégorie, des pistes sont proposées, concernant notamment l'identification des principales zones critiques pour les opérations de décontamination et l'instauration de mesures spécifiques permettant d'éviter la dissémination du germe à l'extérieur du bâtiment atteint.

Mots-clés

Botulisme, poules pondeuses, investigation épidémiologique

Abstract

Investigation of a botulism outbreak in a free-range laying hen farm

*Botulism is a severe paralytic disease caused by botulinum neurotoxins (BoNTs), shared by both humans and animals. In birds, an ascending flaccid paralysis has been observed that regularly leads to significant losses in poultry farms. Botulism outbreaks have already been reported and described in wild birds and broiler flocks, but more rarely in other poultry species such as laying hens. This article reports on the epidemiological investigations carried out in 2014 in a flock of 5000 free-range laying hens with avian botulism. Given the duration of the rearing period, the aim of the study was to investigate the distribution and persistence of *C. botulinum* in the poultry farm during the six months following the outbreak. An evaluation of egg contamination by *C. botulinum* was also made. A longitudinal study was carried out and several samples were collected in the poultry house and the surrounding area. Sixty clean and soiled eggs were also swabbed at each visit. In addition, 24 eggs were collected to analyze the eggshell and egg content. More than five months after the outbreak, *C. botulinum* could still be detected in the house, mostly on the walls and in the egg circuit. Regarding egg contamination, the bacterium was detected on the shells but not inside the eggs, confirming the absence of vertical botulism transmission.*

In the absence of any clear animal health policy measures for this disease, proposals including identification of the main critical areas for decontamination operations and the implementation of specific measures to prevent the spread of the disease outside affected houses, have been made.

Keywords

Botulism, Laying hens, Epidemiological investigation

Le botulisme est une affection neuro-paralytique sévère, commune à l'Homme et à l'animal due aux toxines produites par la bactérie *Clostridium botulinum*. Parmi les sept toxines botuliniques caractérisées à ce jour, le botulisme humain est surtout associé aux toxines A, B, E et F, tandis que la toxine C/D est la principale responsable des foyers de botulisme (Le Maréchal et al., 2016; Skarin et al., 2010; Woudstra et al., 2012). Bien que rares, des cas de type E (type toxinique dangereux pour l'Homme) ont déjà été diagnostiqués à la fin des années 1990 en France en élevage de volailles et chez les oiseaux sauvages.

Chez les oiseaux, des signes cliniques de paralysie flasque sont observés et progressent de manière ascendante, touchant d'abord les pattes puis les ailes, le cou et les paupières. L'appareil respiratoire et le cœur sont ensuite atteints, entraînant la mort de l'animal en moins d'une semaine.

En France, le botulisme est actuellement classé comme danger sanitaire de première catégorie pour toutes les espèces sensibles, incluant donc les volailles et les oiseaux sauvages (arrêté ministériel du 29 juillet 2013).

Une recrudescence du botulisme aviaire a été observée dans les années 2007-2008. Selon les données du RNOEA (Réseau

national d'observations épidémiologiques en aviculture), basées sur des signalements volontaires des correspondants (vétérinaires et laboratoires), 100 à 120 signalements par an étaient alors rapportés. L'incidence est retombée à environ vingt foyers par an depuis 2012. Le botulisme aviaire reste toutefois une préoccupation sanitaire dans les élevages de volailles, car il engendre des pertes importantes (mortalités élevées, non valeurs économiques des animaux, euthanasie des lots...).

Des cas ont souvent été décrits dans l'avifaune sauvage, dans les élevages de gibiers et de poulets de chair (Dohms et al., 1982; Pecelunas et al., 1999; Roberts and Collings, 1973), mais beaucoup plus rarement dans les autres productions, notamment les poules pondeuses (Sharpe et al., 2011; Skarin et al., 2015). Cet article rapporte les investigations épidémiologiques conduites en 2014 dans un élevage de poules pondeuses plein air des Côtes-d'Armor, atteint de botulisme aviaire. Ces investigations ont été conduites afin: i) d'étudier la diffusion et la persistance de *C. botulinum* dans l'élevage, dans les mois qui ont suivi l'épisode clinique, et ii) d'évaluer la contamination des œufs par *C. botulinum*.

Matériel et méthodes

Diagnostic de la maladie

Un total de 5020 poulettes futures pondeuses ont été mises en place le 15 mai 2014 dans un bâtiment de 700 m² d'un élevage plein-air. L'accès au parcours s'est fait après trois semaines d'élevage. Aucun évènement sanitaire notable ne s'est produit au cours des premières semaines d'élevage. Le 30 novembre 2014, à 46 semaines d'âge, un étouffement dont l'origine n'a pas été identifiée a causé la mort de 260 poules. Dans les deux jours qui ont suivi, l'éleveur a constaté une paralysie flasque sur certains animaux associée à une augmentation de la mortalité (7 poules trouvées mortes le premier jour et 25 le second). Une suspicion de botulisme a été posée par le vétérinaire du fait des signes observés, sans lésions associées. Six prélèvements intestinaux (4 sur cadavres et 2 sur animaux malades) et quatre prélèvements sanguins (sur animaux malades) ont été réalisés (Encadré 1). Un traitement à base de tylosine (200 g/jour dans l'eau de boisson pendant trois jours soit 20 mg/kg) a été mis en place le 3 décembre. Le test de létalité sur souris associé à une PCR en temps réel ont permis le 8 décembre de confirmer le diagnostic et de mettre en évidence *C. botulinum* de type C/D (Woudstra et al., 2012) (Encadré 2). Le 10 décembre, un arrêté portant mise sous surveillance (APMS) a été pris, fixant l'application de mesures sanitaires dans l'exploitation.

Collecte d'échantillons et recueil de données épidémiologiques au cours des visites

Un suivi longitudinal a été réalisé dans l'élevage au cours de cinq visites réalisées entre décembre 2014 et mai 2015. Un questionnaire épidémiologique portant sur les caractéristiques de l'élevage et du bâtiment, les pratiques d'élevage et les caractéristiques sanitaires des animaux a été complété à chaque visite. Des prélèvements environnementaux ont été réalisés en différents points du bâtiment (chiffonnettes ou pédi-chiffonnettes sur le sol, les murs, le circuit de

ventilation, le circuit des œufs, le local de conditionnement des œufs, le sas à l'entrée du bâtiment, le bac d'équarrissage et les abords). Des prélèvements d'eau et d'aliment ont aussi été réalisés ainsi que des ténébrions, petit insecte fréquemment rencontré dans les litières d'élevage. En complément, des écouvillons cloacaux ont été réalisés sur dix poules à chaque visite, ainsi que des chiffonnettes sur 30 œufs sales et 30 œufs propres. Par ailleurs, au cours des quatre dernières visites, douze œufs propres et douze œufs sales ont été prélevés en supplément pour analyser le contenu des œufs et les coquilles.

Protocole de laboratoire

La prise d'essai pour les échantillons était de minimum 20 g pour l'aliment, le sol, les fientes, 100 ml d'eau et 10 à 15 ténébrions (lavés avec un détergent pour éliminer *C. botulinum* s'il était présent en surface). Les ténébrions ont été écrasés puis dilués au 1/10 dans du milieu TPGY (Tryptone Peptone Glucose Yeast). Les autres échantillons ont été dilués au 1/2 puis au 1/5 dans le milieu d'enrichissement TPGY selon les recommandations de la norme NF EN ISO 6887-6, puis homogénéisés à l'aide d'un Pulsifier (Microgen) pendant quinze secondes. Pour les chiffonnettes, 250 ml de TPGY ont été ajoutés puis l'échantillon a été homogénéisé à l'aide d'un Pulsifier (Microgen) pendant quinze secondes. Les écouvillons cloacaux ont été dilués dans 9 ml de TPGY. Les œufs ont été groupés par trois puis immergés dans du TPGY et frottés pendant deux minutes dans le milieu. Puis les coquilles ont été décontaminées à l'aide d'Anioxyspray WS (Anios) avec un temps de contact de quinze minutes. Les œufs ont ensuite été cassés par trois puis 25 g ont été dilués au 1/10 dans du TPGY et homogénéisés à l'aide d'un Pulsifier (Microgen) pendant quinze secondes.

Les échantillons ainsi préparés ont été incubés au moins quatre jours à 37°C en conditions anaérobies (station A35, Don Whitley). L'ADN a ensuite été extrait à partir d'un ml de chaque enrichissement à l'aide du kit QiaAmp DNA Mini kit (Qiagen). La détection des gènes codant pour la toxine C/D a été réalisée par PCR en temps réel (Le Maréchal et

Encadré 1. Prélèvements pour le diagnostic du botulisme aviaire

Une étude est en cours depuis 2013 afin d'optimiser le diagnostic du botulisme aviaire. Cette étude est menée conjointement par le LNR botulisme aviaire (Anses, laboratoire de Ploufragan-Plouzané) et par Labocea-site de Ploufragan.

Dans le cadre du schéma diagnostique actuellement en place, les prélèvements suivants sont à réaliser.

Les prélèvements sont à expédier à Labocea, site de Ploufragan. Les foies seront ensuite transmis directement au LNR pour analyse.

Type d'échantillon	Quantité par prélèvement	Nombre d'animaux à prélever	Transport	Température de transport	Délai d'acheminement
Sérum	5 ml	4	Tube sec (sans anticoagulant) ou gel avec activateur de coagulation	Température ambiante	<48 h
Contenu intestinal	1 g	4	Pot à coproculture	Froid (ne pas congeler)	<48 h
Foie	Entier (au moins 25 g pour les gros animaux)		Pot/sachet individuel	Froid	<24 h
				-18°C	>24 h

Nous attirons votre attention sur le fait que ce schéma est susceptible d'évoluer au cours des prochains mois.

Encadré 2. Méthodes de confirmation du diagnostic de botulisme

Les analyses sont réparties entre Labocea et le LNR.

Labocea réalise le test de létalité sur souris à partir des sérums et contenus intestinaux et la détection de *C. botulinum* par PCR en temps réel à partir de l'enrichissement d'un mélange d'1 g de contenus intestinaux et d'un mélange d'1 g de foie. L'enrichissement est réalisé en milieu TPGY dans une enceinte anaérobie à 37°C pendant 48 h. L'extraction d'ADN est réalisée à partir d'1 ml de chaque enrichissement et la détection des gènes codant pour les toxines C, D, C/D et D/C est réalisée par PCR en temps réel (Gene Disc).

Le LNR se charge de la détection de *C. botulinum* par PCR en temps réel à partir de l'enrichissement individuel de chaque dans la mesure de 25 g de chaque foie. Les foies sont dilués individuellement au 1/10 en milieu TPGY puis homogénéisés à l'aide d'un pulsifier pendant quinze secondes et enrichis pendant au moins 24 h à 37°C en conditions anaérobies. L'ADN est ensuite extrait par un kit commercial incluant une étape de

lyse chimique puis une purification des ADN sur colonne de silice. Enfin la détection des gènes codant pour les toxines C, D, C/D, D/C et E est réalisée par PCR en temps réel (via un thermocycleur). Cette méthode permet de détecter la présence de *C. botulinum* de type C, D, C/D, D/C et E dans les prélèvements.

Les résultats sont disponibles sous 48 à 72 h (jours ouvrés) après réception des échantillons. Ce délai s'explique par la durée du test sur souris (observation des signes cliniques pendant 48 h) et par l'étape d'enrichissement pour la méthode de détection par PCR.

Pour toute information complémentaire les coordonnées du LNR botulisme aviaire sont :

Tél. : 02 96 01 85 33 (Caroline Le Maréchal, responsable LNR Botulisme aviaire) et 02 96 01 01 48 (Rozenn Souillard, EBEAC)
Mel: LNR-Botu-aviaire@anses.fr

al., 2016; Woudstra et al., 2012). Un contrôle interne commercial a été utilisé afin de vérifier l'absence d'inhibiteurs de PCR dans l'échantillon (QuantiFast Pathogen+ IC Kits, Qiagen).

Résultats

Évolution de la maladie

La phase clinique de la maladie a évolué sur une semaine au cours de laquelle 131 poules sont mortes, soit un taux de mortalité de 2,6 %, sans récurrence ultérieure. Aucun problème sanitaire n'a été constaté après 48 semaines, avec une moyenne de trois poules mortes par semaine jusqu'à l'abattage (Figure 1). Une légère chute de ponte (environ 5 %) a été constatée dans les jours qui ont suivi l'épisode de botulisme. En application de l'APMS, un recensement des animaux

présents sur l'exploitation a été réalisé et les mouvements de volailles ont été interdits. Des dispositions complémentaires ont été prises pour éviter la dissémination de la bactérie dans l'environnement : confinement des animaux si possible, isolement des animaux malades, retrait et stockage des cadavres au moins deux fois par jour et interdiction d'enfouissement des cadavres, tri des œufs souillés avant conditionnement. Des mesures de biosécurité renforcées (port d'équipement dédié, lavage et désinfection des mains et du matériel) ont été mises en place. Enfin, des procédures de décontamination, une fois les animaux partis, ont été prescrites.

Détection de *Clostridium botulinum* dans les échantillons collectés

C. botulinum type C/D a été détecté dans 16,4 % des échantillons collectés au cours des cinq visites (Tableau 1). Il a été détecté dans un

Tableau 1. Détection de *C. botulinum* dans l'élevage

		Visite 1	Visite 2	Visite 3	Visite 4	Visite 5	Nb échantillons positifs/nb échantillons prélevés	Total par catégorie	Proportion de prélèvements positifs (en %)
		15/12/2014	26/01/2014	12/03/2014	14/04/2014	18/05/2014			
Bâtiment	1 pédi-chiffonnette sur caillebotis	C/D	ND	C/D	ND	ND	2/5		
	1 chiffonnette sur les murs	ND	ND	Nég	ND	C/D	1/5		
	1 chiffonnette sur les murs	ND	ND	C/D	ND	C/D	2/5	5/15	33
Ventilation	1 chiffonnette sortie d'air	ND					0/1		
	1 chiffonnette entrée d'air	ND	ND	ND	C/D	ND	1/5	1/6	
Circuit d'œufs	1 chiffonnette tapis à œufs en haut	C/D	C/D	ND	ND	ND	2/5		
	1 chiffonnette pondoir en haut	C/D	Nég	ND	ND	ND	1/5		
	1 chiffonnette tapis à œufs en bas	C/D	C/D	C/D	C/D	C/D	5/5		
	1 chiffonnette pondoir en bas	C/D	ND	C/D	Nég	C/D	3/5	11/20	55
Eau et aliment	1 eau	ND	ND	ND	ND	ND	0/5		
	1 aliment	ND					0/1	0/6	
Ténébrions	1 prélèvement de ténébrions	ND	ND	ND	C/D	Nég	1/5	1/5	
Sas sanitaire	1 pédi-chiffonnette sas	ND	ND	ND	ND	ND	0/5		
	1 chiffonnette local à œufs	ND	ND	ND	ND	ND	0/5	0/10	
Poules	10 écouvillons cloacaux		ND	ND	ND	ND	0/4	0/4	
Fientes	1 chiffonnette sur les fientes	ND	ND	ND	ND	ND	0/5		
	1 prélèvement de fientes	ND	ND	ND	ND	ND	0/5	0/10	
Surface des œufs	1 chiffonnette sur 30 œufs propres	C/D	C/D	C/D	Nég	C/D	4/5		
	1 chiffonnette sur 30 œufs sales	C/D	Nég	Nég	Nég	Nég	1/5	5/10	
Extérieurs	1 chiffonnette dans bac équarrissage	C/D	Nég	Nég	Nég	Nég	1/5		
	1 prélèvement de terre	ND	ND	ND	ND	ND	0/5		
	1 pédi-chiffonnette sur les abords	ND	ND	ND	ND	ND	0/5		
	1 prélèvement de terre du parcours		ND	ND	ND	ND	0/4		
	1 pédi-chiffonnette sur parcours	ND	ND	ND	ND	ND	0/5	1/24	
Total								24/110	21,8

ND : non détecté

Nég : négatif

C/D : *C. botulinum* de type C/D

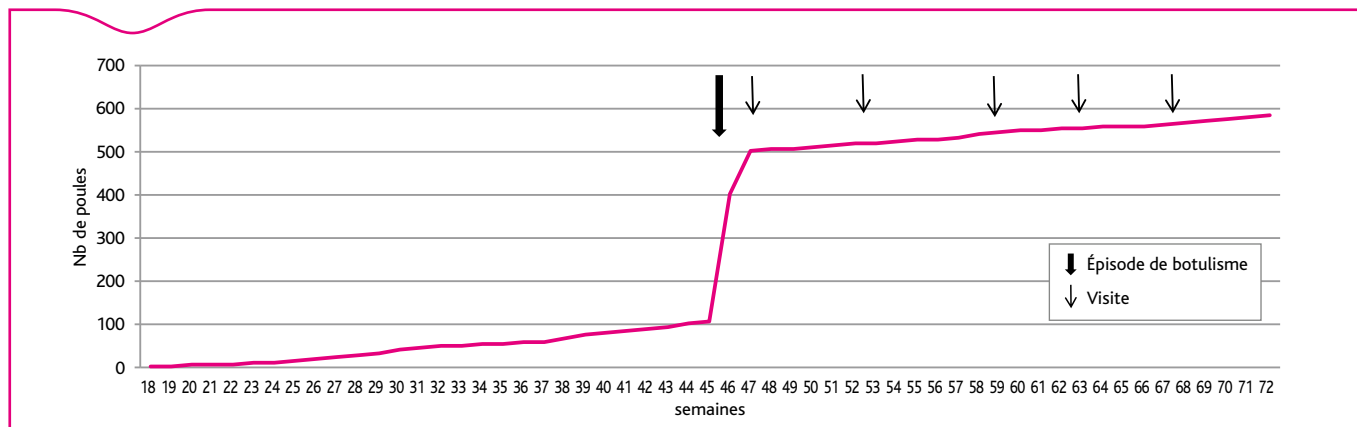


Figure 1. Mortalité cumulée

Tableau 2. Analyse des œufs (par pool de 3 œufs)

				Visite 2	Visite 3	Visite 4	Visite 5
				26/01/2014	12/03/2014	14/04/2014	18/05/2014
Œufs propres	Pool 1	Coquille	ND	ND	ND	ND	ND
		Contenu	ND	ND	ND	ND*	
	Pool 2	Coquille	ND	ND	ND	ND	
		Contenu	ND	ND	ND	ND*	
	Pool 3	Coquille	ND	ND	ND	ND	
		Contenu	ND	ND	ND	ND*	
	Pool 4	Coquille	ND	ND	ND	ND	
		Contenu	ND	ND	ND	ND*	
Œufs sales	Pool 1	Coquille	ND	ND	ND	ND	
		Contenu	ND	ND	ND*	ND*	
	Pool 2	Coquille	ND	ND	ND	ND	
		Contenu	ND	ND	ND	ND	
	Pool 3	Coquille	C/D	ND	ND	ND	
		Contenu	ND	ND	ND	ND*	
	Pool 4	Coquille	C/D	ND	ND**	ND	
		Contenu	ND	ND	ND**	ND*	

ND : non détecté
 * Pool de 2 œufs
 ** 1 œuf
 C/D : *C. botulinum* de type C/D

tiers des chiffonnettes (5/15) prélevées à l'intérieur du bâtiment, sur le caillebotis et sur les murs, et dans plus de la moitié des chiffonnettes prélevées sur le circuit des œufs (55 %). *C. botulinum* de type C/D a aussi été détecté dans un prélèvement de ténébrions. À l'extérieur, la bactérie a seulement été retrouvée dans le bac d'équarrissage. Elle n'a jamais été détectée dans les échantillons d'eau ni dans les aliments, pas plus que dans le local de stockage des œufs, dans le sas ou sur le parcours.

C. botulinum a été retrouvé pendant quatre mois après l'épisode de botulisme au niveau du circuit d'admission d'air et pendant plus de cinq mois sur les murs du bâtiment, dans les pondoirs et sur les tapis à œufs.

Le germe a aussi été mis en évidence dans la moitié des chiffonnettes effectuées sur les œufs, essentiellement les œufs propres, sur lesquels il était toujours détecté plus de cinq mois après l'épisode de botulisme. Si l'on s'intéresse à l'analyse des œufs (Tableau 2), *C. botulinum* a seulement été détecté sur les coquilles mais jamais dans le contenu de l'œuf.

Il n'a jamais été détecté dans les prélèvements de fientes, ni dans les écouillons cloacaux effectués directement sur les animaux.

Discussion

Il n'a pas été possible, au vu des données disponibles, d'identifier l'origine de la contamination de cet élevage. Deux hypothèses, qui

peuvent parfois coexister dans un même élevage, sont classiquement avancées pour expliquer le déclenchement d'un épisode de botulisme : l'ingestion de toxines préformées - on parle alors d'intoxication, et la production *in situ* de toxines associée à une colonisation caecale par *C. botulinum* - on parle alors de toxi-infection. Dans le cas présent, la mise en évidence de *C. botulinum* permet de conclure à la survenue d'une toxi-infection. Même si l'existence d'un portage sain reste controversé chez les oiseaux et qu'aucune étude n'a permis de le démontrer, on ne peut toutefois exclure un portage de ce germe à un niveau très faible, inférieur au seuil de détection des méthodes disponibles (Popoff, 1989). Le stress consécutif à l'étouffement survenu le jour précédant la déclaration des premiers signes cliniques aurait alors pu être à l'origine du déclenchement d'une toxi-infection. Les cadavres ont aussi pu constituer une source de contamination des animaux même s'ils ont été ramassés rapidement. Ces derniers constituent en effet un excellent substrat de développement pour *C. botulinum*, du fait des conditions anaérobies et de la présence de matière en décomposition qui représentent des conditions idéales pour sa germination et sa croissance (Popoff, 1989). La présence du bac d'équarrissage à proximité du bâtiment et le passage des camions d'équarrissage devant le bâtiment peuvent aussi être considérés comme des facteurs de risque de contamination de ces volailles, d'autant plus qu'elles sont élevées sur parcours.

Le taux de mortalité observé ici est faible (2,6 %) et inférieur à celui rencontré dans de nombreux cas de botulisme où des mortalités de 20 à 30 % ne sont pas rares (Sharpe *et al.*, 2011; Skarin *et al.*, 2015). Il a été démontré que la sensibilité des animaux diminuait avec l'âge (Dohms and Cloud, 1982), or l'épisode rapporté ici s'est produit sur des animaux âgés de 46 semaines. Les taux de morbidité et mortalité observés varient aussi en fonction de la quantité de toxine ingérée ou assimilée. L'éleveur a très rapidement mis en place des mesures de gestion sanitaire, notamment l'enlèvement des cadavres, la mise en quarantaine des animaux malades et la mise en place rapide d'un traitement antibiotique, qui peuvent aussi expliquer le faible taux de mortalité relevé durant cet épisode. Une légère chute de ponte a été observée ici, mais elle n'a pas été constatée dans les autres cas rapportés et ne semble pas être un signe caractéristique d'un épisode de botulisme (Sharpe *et al.*, 2011; Skarin *et al.*, 2015).

C. botulinum a persisté longtemps à l'intérieur du bâtiment et était toujours détectable cinq mois après l'épisode clinique, notamment sur les murs, le circuit des œufs et les coquilles. Ce résultat est cohérent avec ceux rapportés dans la bibliographie qui ont démontré la survie de *C. botulinum* dans l'environnement pendant plusieurs années (Okamoto *et al.*, 1999) et sa persistance même après nettoyage et désinfection dans des élevages infectés (Souillard *et al.*, 2014).

Alors que la contamination verticale n'a jamais été démontrée, la détection de *C. botulinum* dans le bâtiment, longtemps après l'épisode, pourrait s'expliquer par une contamination pseudo-verticale des œufs, via une contamination de la coquille d'origine caecale. En effet, les chiffonnettes réalisées sur le circuit des œufs et celles effectuées sur les

coquilles ont constitué le plus grand nombre d'échantillons contaminés. Même si le portage de *C. botulinum* n'a pu être démontré à partir des écouvillons cloacaux, les volailles pourraient rester porteuses de *C. botulinum* pendant plusieurs mois, à des niveaux non détectables par notre méthode et de ce fait pourraient être responsables de la contamination des coquilles.

Quelle que soit l'origine du maintien de *C. botulinum*, ces résultats permettent d'identifier les supports les plus appropriés pour détecter les bactéries dans l'environnement d'un élevage de poules suspect : le circuit des œufs en particulier semble un excellent candidat. C'est aussi sur ces supports identifiés qu'il faudra renforcer les mesures de nettoyage et de désinfection après le départ des animaux. D'autre part, ces résultats confirment la nécessité de mettre en œuvre des mesures de gestion sanitaire spécifiques sur le lot, notamment en termes de biosécurité, pour éviter la dispersion des clostridies vers d'autres bâtiments d'élevage ou vers d'autres élevages. Des mesures particulières sont aussi à préconiser sur les œufs issus de l'élevage, le matériel nécessaire au ramassage (alvéoles de stockage, palettes, chariots) et les camions de ramassage des œufs qui passent d'élevage en élevage. Une attention particulière devra être portée sur les contaminations croisées entre élevages, via les échanges de matériel (chariots, palettes,...) et le nettoyage et la désinfection du matériel et des véhicules.

En accord avec l'évaluation du risque publiée par l'Afssa (Afssa, 2002; Afssa, 2009), le risque de contamination humaine lié à la consommation d'œufs contaminés est considéré comme nul à négligeable, et est relié à la possible contamination de la coquille par la bactérie et non à la présence de toxine botulinique dans le jaune. Chez une pouleuse malade, une quantité de toxine circulante suffisamment importante pour permettre sa diffusion dans l'œuf provoquerait la mort rapide de l'animal (Afssa, 2009). Cette hypothèse semble être confirmée par notre étude dans laquelle nous avons fréquemment détecté *C. botulinum* sur la coquille, mais jamais dans l'œuf.

Deux méthodes de détection sur les œufs ont été utilisées, par des chiffonnettes ou en analysant directement les coquilles. Au vu des résultats, les deux méthodes peuvent être utilisées, mais la présence de *C. botulinum* ne semble pas liée au niveau de propreté de la coquille. L'état de propreté de la coquille ne semble donc pas être un bon critère pour évaluer la contamination et le tri des œufs sales ne semble pas être une mesure d'hygiène efficace ni suffisante en cas d'épisode de botulisme dans un élevage de pouleuses. Or aucune mesure de restriction spécifique n'a été mise en place pour les œufs propres issus de cet élevage. Considérant la persistance de *C. botulinum* sur la coquille pendant plusieurs mois après l'épisode clinique, les risques de contamination croisée au centre de conditionnement ou à la casserie d'œufs existent et les conditions anaérobies doivent absolument être évitées pour prévenir la production de toxines pendant le processus de préparation des œufs.

Conclusion

Cette étude de cas a permis de montrer que *C. botulinum* est susceptible de persister pendant plusieurs mois dans un bâtiment d'élevage de poules pouleuses, essentiellement sur le circuit des

œufs, une zone critique pour les opérations de décontamination. *C. botulinum* a été détecté sur des coquilles d'œufs propres et sales mais pas dans leur contenu, ce qui confirme l'absence de transmission verticale pour cette maladie. En l'absence de mesures de police sanitaire définies pour ce danger sanitaire de première catégorie, des pistes sont proposées, concernant notamment l'instauration de mesures spécifiques permettant d'éviter la dissémination du germe à l'extérieur du bâtiment atteint.

Remerciements

Les auteurs remercient l'éleveur, le vétérinaire sanitaire et les agents de la direction départementale en charge de la protection des populations des Côtes-d'Armor, pour leur participation à cette étude.

Références bibliographiques

- Afssa 2002. Le botulisme d'origine aviaire et bovine. In Rapport Afssa, 82.
- Afssa 2009. Avis de l'Afssa sur un projet d'arrêté fixant des mesures techniques et administratives relatives à la lutte contre le botulisme aviaire. In Afssa saisine 2008-SA-0334, 9.
- Arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces animales.
- 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.
- Le Maréchal, C., Woudstra, C., Fach, P. 2016. Botulism. In *Clostridial diseases of animals*, In: F. A. Uzal, J. G. Songer, J. F. Prescott, Popoff, M.R. (Eds.) Blackwell Publishing Ltd Ames IA, 303-330.
- Okamoto, K., Adachi, M., Sato, K.I., Chuma, T., 1999. Epidemiological factors in chicken botulism. *Japan Veterinary Medical Association* 52, 168-173.
- Pecelunas, K.S., Wages, D.P., Helm, J.D., 1999. Botulism in chickens associated with elevated iron levels. *Avian Dis* 43, 783-787.
- Popoff, M.R., 1989. Revue sur l'épidémiologie du botulisme bovin en France et analyse de sa relation avec les élevages de volailles. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz* 8, 129-145.
- Roberts, T.A., Collings, D.F., 1973. An outbreak of type-C botulism in broiler chicken. *Avian Dis* 17, 650-658.
- Sharpe, A.E., Sharpe, E.J., Ryan, E.D., Clarke, H.J., McGettrick, S.A., 2011. Outbreak of type C botulism in laying hens. *Vet Rec* 168, 669.
- Skarin, H., Lindberg, A., Blomqvist, G., Aspan, A., Baverud, V., 2010. Molecular characterization and comparison of *Clostridium botulinum* type C avian strains. *Avian Pathol* 39, 511-518.
- Skarin, H., Lindgren, Y., Jansson, D.S., 2015. Investigations into an Outbreak of Botulism Caused by *Clostridium botulinum* Type C/D in Laying Hens. *Avian Dis* 59, 335-340.
- Souillard, R., Woudstra, C., Le Marechal, C., Dia, M., Bayon-Auboyer, M.H., Chemaly, M., Fach, P., Le Bouquin, S., 2014. Investigation of *Clostridium botulinum* in commercial poultry farms in France between 2011 and 2013. *Avian Pathol* 43, 458-464.
- 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.