

EVALUATION DE LA CONTAMINATION DU FUMIER SUITE A UN EPISODE DE BOTULISME AVIAIRE

C. Le Maréchal, S. Rouxel, L. Balaine, T. Poëzévara, V. Ballan, M. Chemaly, S. Le
Bouquin et R. Souillard

ANSES Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, BP53, 22440 PLOUFRAGAN, France
caroline.lemarechal@anses.fr

RÉSUMÉ

Des épisodes de botulisme sont rapportés annuellement dans les élevages avicoles. La gestion des opérations de nettoyage-désinfection et des effluents reste délicate. *C. botulinum* est en effet une bactérie sporulante, capable de résister dans l'environnement pendant plusieurs années et pouvant donner lieu à des récurrences. L'objectif de cette étude préliminaire est d'évaluer la contamination de fumier stocké suite à un épisode de botulisme et l'évolution de cette contamination dans le temps. Pour cela, 5 élevages ont été suivis : 2 élevages de dindes (type D et D/C), 2 élevages de poulets (type C/D) et un élevage de poules (type C/D). Pour chaque élevage, suite au stockage du fumier à l'extérieur, 2 visites ont été réalisées avec 1 à 2 mois d'intervalle. Lors de chaque visite, le tas de fumier a fait l'objet de 15 prélèvements avec 5 prélèvements (2 en surface et 3 en profondeur) réalisés dans 3 endroits différents. Des données épidémiologiques sur les épisodes de botulisme et la gestion du fumier ont également été collectées. Les prélèvements de fumier ont été enrichis en milieu TPGY pendant au moins 4 jours à 37°C en conditions anaérobies puis stockés à -18°C. L'ADN a ensuite été extrait via l'utilisation d'un kit commercial puis la présence des gènes codant pour les toxines botuliques a été détectée par PCR en temps réel. *C. botulinum* a été détecté dans les tas de fumiers des 5 élevages investigués lors d'au moins une des deux visites, que ce soit dans les prélèvements réalisés en surface (60,7%) ou en profondeur (46,9 %). Le nombre de prélèvements détectés positifs était plus élevé lors de la seconde visite (68 %) que lors de la première (42,2 %), indiquant une forte persistance de *C. botulinum* dans les fumiers au cours du temps. Cette étude préliminaire montre l'importance de la mise en place de mesures appropriées pour la gestion des fumiers qui constitue une source de re-contamination.

ABSTRACT

Botulism is a neuroparalytic disease due to the action of botulinum toxins, produced by *Clostridium botulinum*. Botulism outbreaks are reported each year in poultry farms in France. Animal botulism management is tricky, notably cleaning and disinfection operations and management of contaminated manure. *C. botulinum* is a spore-producing pathogen that can survive decades in the environment and induce recurrence of botulism outbreaks or cross-contaminations between farms. The objective of this preliminary study is to evaluate the contamination of manure after an outbreak and its development over time. Five farms were selected: 2 turkey farms (type D and D/C), 2 broiler farms (type C/D) and one laying farm (type C/D). Each farm was visited twice one month apart after removal of the manure from the house and its storage outside. Fifteen different samples were collected each time, including 5 samples (2 on the surface and 3 at depth) at 3 different positions. Epidemiological data were collected regarding the outbreak and manure management. Samples were diluted in TPGY and incubated during at least 4 days at 37°C under anaerobic conditions and then stored at a temperature below -18°C. DNA extraction was performed using a commercial kit and detection of genes encoding botulinum toxin was performed using real-time PCR. *C. botulinum* was detected in all investigated manure during at least one of the visits, in both samples collected on surface (60.7 %) or in depth (46.9 %). *C. botulinum* was detected in a higher number of samples at the second visit (68 %) than at the first one (42.2 %), showing a high persistence of *C. botulinum* in manure over time. This study demonstrates that management of manure is a key point in preventing recurrence of the outbreak.

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/D, D/C, C et D (Woudstra et al., 2012, Skarin et al. 2013). Des épisodes de botulisme aviaire de type E ont déjà été diagnostiqués en France en élevage et en faune sauvage. Ce type toxinique étant dangereux pour l'homme, il fait l'objet d'une surveillance. Les spores de *C. botulinum* peuvent résister pendant de nombreuses années dans l'environnement et être à l'origine de récurrences dans les élevages (Okamoto et al., 1999). Le fumier de volailles peut également être à l'origine de cas de botulisme chez les bovins, suite à de l'épandage de fumier sur les pâtures (Popoff 1989, Payne, 2011). La gestion des opérations de décontamination d'un élevage de volailles suite à un épisode de botulisme est délicate, notamment en ce qui concerne le devenir des effluents. Aucune donnée n'est actuellement disponible sur la persistance des spores de *C. botulinum* dans le fumier. L'objectif de cette étude préliminaire est d'évaluer la contamination par *C. botulinum* de fumiers stockés suite à un épisode de botulisme aviaire et l'évolution de cette contamination dans le temps.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Prélèvements des échantillons de fumier et collecte de données en élevage

Cinq élevages de volailles atteints de botulisme ont été suivis. Pour chaque élevage, après l'enlèvement du fumier du bâtiment et son stockage à l'extérieur, 2 visites ont été réalisées. La première visite a eu lieu 1 à 2 semaines après la sortie du fumier et la seconde visite a eu lieu 1 à 2 mois plus tard. Le délai pour la seconde visite était variable, car dépendait du devenir du fumier et de sa présence sur l'exploitation. Lors de chaque visite, le tas de fumier a fait l'objet de 15 prélèvements : 5 prélèvements (2 en surface et 3 en profondeur) réalisés à 3 endroits différents. Les prélèvements en profondeur ont été effectués à environ 50 cm. Par ailleurs, la température du fumier a été relevée à l'aide d'une sonde lors de chaque prélèvement. Des données épidémiologiques sur les cas de botulisme et sur les modalités de gestion du fumier ont également été collectées.

1.2. Analyses des échantillons de fumier

Les fumiers ont été dilués au $\frac{1}{2}$ puis au $\frac{1}{5}$ dans du milieu TPGY (Tryptone Peptone Glucose Yeast) puis homogénéisés à l'aide d'un Pulsifier® (Microgenbioproducts) pendant 15 secondes. Ils ont ensuite été incubés pendant au moins 4 jours à 37°C en conditions anaérobies (Station A35, Don Whitley). Les enrichissements ont ensuite été stockés plusieurs mois à une température inférieure à -18°C. L'ADN a été extrait à partir d'1 ml de chaque enrichissement avec le kit NucleoSpin Soil (Macherey Nagel). Les gènes codant pour les toxines C, D, C/D et D/C ont été détectés par PCR en temps réel à partir de ces extraits. Les amorces et sondes utilisées sont celles décrites précédemment (Souillard et al. 2014). Chaque PCR est réalisée dans un volume final de 25 µL, contenant 5 µL d'ADN, 10 µL de PerfeCTa qPCR ToughMix (Quanta BioSciences), une concentration finale de 600 nm des amorces et 400 nm de sonde. Le profil d'amplification consiste en une dénaturation pendant 5 minutes à 95°C puis à 45 cycles avec une dénaturation à 95°C pendant 15 secondes, puis une extension à 55°C pendant 30 secondes. Un kit commercial (QuantiFast Pathogen +IC kits, Qiagen) a été utilisé comme contrôle interne.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Les 5 épisodes de botulisme et la gestion du fumier

Les 5 épisodes de botulisme ont été suivis dans 2 élevages de dindes (type D et D/C), 2 élevages de poulets (type C/D) et 1 élevage de poules pondeuses (type C/D). Pour chaque élevage, la contamination par des spores de *C. botulinum* a été investiguée dans un seul tas de fumier, sauf pour l'élevage 46 pour lequel 2 tas de fumiers ont été suivis, suite au départ non simultané des dindes femelles et mâles. Les caractéristiques des cas de botulisme et les modalités de gestion du fumier dans ces élevages sont décrites dans le tableau 1. Pour les volailles de chair, la maladie est apparue entre 40j et 87j d'âge, et pour les poules pondeuses en fin de période de ponte à 62 semaines. La mortalité associée à la maladie a varié de 2% à 25%. Concernant la gestion du fumier, sur les 6 tas de fumiers suivis, de la chaux a été ajoutée dans 4 tas de fumier : ajout de chaux dans le bâtiment (Cas 4), ajout de chaux dans le bâtiment et également lors de la mise en tas à l'extérieur (Cas 22), et ajout de

chaux uniquement lors de la mise en tas à l'extérieur (Cas 44 et 46F). Pour 2 d'entre eux, le tas a ensuite été bâché (cas 22 et 4). Une incinération du fumier a été observée lors des visites pour 2 tas: cas 44 et le cas 46F. Celle-ci était en cours dès la première visite. Pour les 2 tas de fumier pour lesquels aucun produit n'a été ajouté (cas 46M et cas B9), ils ont simplement été stockés et bâchés pour l'un d'entre eux (cas B9). Suite à un épisode de botulisme aviaire, le fumier représente une source de contamination pour l'environnement et peut notamment être à l'origine de cas de botulisme chez des bovins lors de l'épandage de fumier sur les pâtures (Appleyard et al., 1985 ; Clegg et al., 1985 ; Payne et al. 2011, Popoff 1989). Selon le rapport AFSSA (AFSSA, 2002), sachant que *Clostridium botulinum*, sous forme de spores, peut survivre pendant plusieurs années dans le milieu extérieur et que le compostage ou l'enfouissement peuvent créer des conditions d'anaérobiose associées à de basses températures, potentiellement favorables à *C. botulinum*, La seule solution économiquement acceptable pour détruire un fumier riche en éléments botuliques reste l'incinération, sous contrôle des pompiers. En pratique, la méthode la plus utilisée sur le terrain pour l'incinération du fumier est le mélange avec de la chaux (Balloy et al, 2009), dans une zone éloignée des bâtiments d'élevage, des pâtures destinées aux bovins et de tout voisinage, et en prenant toutes les précautions par rapport au risque d'incendie et à la protection des personnes. Mais, cette méthode reste délicate à mettre en œuvre (problème lié au voisinage et à la dangerosité) et il n'existe pas de méthode appropriée et facilement réalisable sur le terrain.

2.2. La contamination du fumier par *C. botulinum*

C. botulinum a été détecté dans les 6 tas de fumier lors d'au moins une des 2 visites (Tableau 2). Le nombre de prélèvements positifs était plus élevé lors de la seconde visite que lors de la première visite : 42,2% de prélèvements positifs en visite 1 et 68% en visite 2.

Quelle que soit la modalité de gestion du fumier, avec ou sans mélange de chaux, des spores de *C. botulinum* ont été détectées. Il n'a pas été observé de différence selon les modalités de gestion du fumier, même si pour le fumier du cas 44 traité à la chaux, une diminution du nombre de positifs entre la première et la seconde visite a été notée pour les prélèvements réalisés en profondeur. L'ajout de chaux vive dans un fumier humidifié, en quantité suffisante, (5 à 7% selon Balloy et al. 2009) permet une incinération complète du fumier au bout de plusieurs semaines. Dans notre étude, une incinération quasi complète a été observée pour 2 tas de fumiers ayant été mélangés avec de la chaux. Les prélèvements ont été réalisés à partir du fumier restant non incinéré, en périphérie du tas, ce qui pourrait expliquer les résultats positifs obtenus.

Pour les 2 autres tas de fumiers pour lesquels la chaux avait été mélangée au fumier sans conduire à une incinération, il est possible que la quantité de chaux utilisée ait été insuffisante ou que le fumier n'ait pas été assez humidifié. Ces résultats montrent que du fumier résiduel reste contaminé après une incinération à la chaux. Il est donc nécessaire que tout le tas soit incinéré en suivant un protocole rigoureux et en prenant toutes les précautions par rapport au risque d'incendie et à la protection des personnes.

Quelle que soit la modalité de gestion du fumier, le nombre de prélèvements positifs était plus important au bout de 1 à 2 mois de stockage du fumier que lors des prélèvements initiaux. Deux hypothèses pourraient expliquer l'augmentation du nombre de prélèvements positifs au cours du temps : soit il y a un développement de *C. botulinum* dans le fumier, milieu potentiellement favorable à la bactérie (conditions anaérobies et présence de matière organique), soit il y a un abattement au niveau de la flore annexe inhibitrice de *C. botulinum*, permettant une meilleure détection du pathogène (Shehata et al. 2012). Dans tous les cas, cette méthode montre une persistance de la bactérie au cours du temps. Ces résultats montrent l'importance d'incinérer en totalité le fumier suite à un épisode de botulisme aviaire, puisque la contamination du fumier par *C. botulinum* persiste si celui-ci est simplement stocké ou incomplètement incinéré.

Parmi les prélèvements réalisés en surface, 60,7% sont positifs vs 46,9% pour ceux réalisés en profondeur. La température moyenne du fumier pour les prélèvements réalisés en surface était de 20,1°C (écart type 14,6) et de 36,7°C (écart type 16,6) pour ceux en profondeur. Il a été observé un lien statistique (test Wilcoxon $p < 0.01$) entre la détection de *C. botulinum* dans le fumier et la température du fumier, avec une température moyenne du fumier pour les prélèvements positifs de 20,2°C (écart type 16,5°C) vs 38,2°C (écart type 13,4°C) pour les prélèvements négatifs. Ces résultats montrent que *C. botulinum* a été détecté plus souvent en surface et à une température moyenne de 20,2°C. La température optimale de croissance de *C. botulinum* est comprise entre 30°C et 42°C selon les types toxiques. La température moyenne mesurée en profondeur est comprise dans cet intervalle et pourrait permettre la stimulation de la germination des spores puis les conditions environnementales présentes (pH, flore annexe...) pourraient induire l'inactivation des cellules végétatives. Ce phénomène a déjà été rapporté pour *Clostridium difficile* dont l'inactivation indirecte à 55°C dans des boues d'épuration a été montrée via la germination des spores puis l'inactivation des cellules végétatives (Xu et al. 2016). Néanmoins, l'identification des facteurs expliquant ces résultats nécessitent des investigations complémentaires.

CONCLUSION

Cette étude préliminaire montre que les fumiers provenant de lots de volailles ayant connu un épisode de botulisme sont contaminés par *C. botulinum* et que cette contamination persiste dans le temps quelle que soit la méthode de gestion utilisée. L'incinération à la chaux permet de consommer le fumier et de détruire les spores mais une incinération complète du fumier est nécessaire puisqu'une contamination persiste au niveau des résidus de cette incinération. Il est donc essentiel de ne pas épandre de fumier après stockage

et/ou incinération partielle, surtout à proximité de pâtures de bovins, d'autres élevages ou de voies de circulation, afin d'éviter toute contamination croisée.

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

- AFSSA, 2002. Rapport sur le botulisme d'origine aviaire et bovine.
- Appleyard, W.T., Mollison, A., 1985. Suspected bovine botulism associated with broiler litter waste. Vet Rec 116, 522.
- Balloy, D., Facon, C., Chatenet, X., Durand, J. 2009. Botulisme aviaire, les constats de terrain. Huitièmes journées de la recherche avicole, Saint Malo, 25 et 26 mars, 340-344.
- Clegg, F.G., Jones, T.O., Smart, J.L., McMurty, M.J., 1985. Bovine botulism associated with broiler litter waste. Vet Rec 117, 22.
- Okamoto, K., Sato, K., Adachi, M., Chuma, T., 1999. Epidemiological factors in chicken botulism. Journal of the Japan Veterinary Medical Association 52, 168-173.
- Payne, J.H., Hogg, R.A., Otter, A., Roest, H.I.J., Livesey, C.T., 2011. Emergence of suspected type D botulism in ruminants in England and Wales (2001 to 2009), associated with exposure to broiler litter. Veterinary Record 168, 640.
- Popoff, M., 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.
- Shehata, A., Schrodle, W., Neuhaus, J., Kruger, M., 2013. Antagonistic effect of different bacteria on *Clostridium botulinum* types A, B, D and E in vitro. Vet Rec 172, 47.
- 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.
- 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 pathology : journal of the W.V.P.A 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.
- Xu, C., Salsali, H., Weese, S., Warriner, K., 2016. Inactivation of *Clostridium difficile* in sewage sludge by anaerobic thermophilic digestion. Canadian journal of microbiology 62, 16-23.

Tableau 1. Description des 5 épisodes de botulisme

N°	Espèce	Effectif	Bâtiment	Age	Mortalité	Gestion du fumier
22	Poules pondeuses plein air	20 000	2150m ²	62 semaines	5000 mortes sur 8 semaines (25%)	Chaux dans le bâtiment (1T) Chaux à la mise en tas à l'extérieur (1T) Tas bâché Tas non incinéré aux 2 visites
4	Poulets certifiés	23 756	1200 m ²	40j	1300 morts sur 5j (5,5%)	Chaux dans le bâtiment (2.8T) Tas bâché Tas non incinéré aux 2 visites
44	Dindes	3900 mâles et 3600 femelles	1000 m ²	mâle à 87j après départ des femelles	80 morts sur 7j (2%)	Chaux à la mise en tas à l'extérieur (6.6T) Tas non bâché Incinération en cours à V1 et presque entièrement incinéré en V2
46F		3264 femelles		64j	400 mortes sur 16j (12%)	Chaux à la mise en tas à l'extérieur (1T) Tas non bâché Tas presque intégralement incinéré en V1*, plus de fumier en V2
46M	Dindes	3876 males	980 m ²	50j	450 morts sur 24j (11.6%)	Tas mis à côté du tas de fumier femelle Tas non bâché Tas normal en V1 et a été presque entièrement épandu en V2 *
B9	poulet lourd	11 852 males et 12628 femelles	1200 m ²	mâle à 42j après départ des femelles	1050 males sur 3 j (8.8%)	Tas bâché Tas normal bâché aux 2 visites

**prélèvements uniquement en surface, pas assez de fumier pour prélever en profondeur*

Tableau 2. Résultats de la détection de *C. botulinum* dans les prélèvements de fumier (nombre de prélèvements positifs/nombre de prélèvements analysés)

N°	Visite 1			Visite 2		
	Profondeur	Surface	Total V1	Profondeur	Surface	Total V2
22	0/9	2/6	2/15	9/9	5/6	14/15
4	3/9	2/6	5/15	8/9	5/6	13/15
44	4/9	0/6	4/15	2/9	1/6	3/15
46F	NR	12/15	12/15	NR	NR	NR
46M	9/9	6/6	15/15	NR	15/15	15/15
B9	0/9	0/6	0/15	3/9	3/6	6/15
Total	16/45	22/45	38/90	22/36	29/39	51/75