

LE BOTULISME AVIAIRE EN FRANCE : BILAN DES EPISODES DIAGNOSTIQUES PAR LE LNR BOTULISME AVIAIRE DEPUIS 2013

C. Le Maréchal¹, **T. Poezevara**¹, S. Rouxel¹, V. Ballan¹, E. Houard¹, R. Souillard², M. Chemaly¹

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

² Anses, Laboratoire de Ploufragan – Plouzané, Unité Epidémiologie Santé et Bien-Etre, Université Bretagne-Loire, BP 53, 22440 Ploufragan, France

Caroline.lemarechal@anses.fr

RÉSUMÉ

Le botulisme animal est considéré en Europe depuis une dizaine d'années comme une maladie émergente préoccupante pouvant entraîner des pertes économiques majeures dans les élevages de volailles. En France une forte hausse du nombre de foyers a été observée en volaille entre 2007 et 2010. Dans ce contexte, le LNR botulisme aviaire a été mis en place à l'Anses en 2012.

L'objectif de cette étude est de présenter les caractéristiques des foyers de botulisme aviaire confirmés par le LNR botulisme aviaire depuis 2013. Le diagnostic en laboratoire est réalisé par l'analyse de foies prélevés sur des animaux symptomatiques par PCR en temps réel pour la détection des gènes codant pour les types C, D, C/D, D/C et E, après enrichissement de ceux-ci en condition anaérobie à 37°C pendant minimum 24h.

Un total de 107 épisodes de botulisme aviaire confirmés par PCR des foies (67 en volaille et 40 en faune sauvage) est inclus dans cette étude. Le type C/D est le plus fréquent (80 %), suivi par le type D/C (9,2 %). Parmi les 107 foyers confirmés, les espèces aviaires concernées sont principalement les dindes (28,7% des épisodes) et les poulets (18,5 % des épisodes) en élevage et les canards (28,7% des épisodes), notamment les colverts en faune sauvage (28 épisodes sur 40 concernant les canards). Des épisodes ont aussi été confirmés en élevage de pintades, canards mulards, faisans, pondeuses et élevages reproducteurs. Les épisodes de type D et D/C ont majoritairement été diagnostiqués en élevage de dindes (92,3%).

Le botulisme est saisonnier avec un pic observé en été : 67 % des épisodes ont été diagnostiqués entre juillet et septembre, même si des épisodes sont recensés tout au long de l'année. Le nombre moyen d'épisodes de botulisme aviaire toutes espèces confondues confirmé par le LNR est relativement stable depuis 2013 (moyenne de 18,7 ± 6,8 épisodes par an). Ce danger sanitaire de première catégorie reste préoccupant : le caractère sporulant de la bactérie lui confère en effet une résistance dans l'environnement entraînant un fort risque de récurrence, nécessitant la mise en place d'une gestion appropriée.

ABSTRACT

Avian botulism in France: overview of outbreaks diagnosed by the French National Reference for avian botulism since 2013

Animal botulism is considered as an emerging disease in Europe for the last decade inducing large economic losses in poultry farms. In France, a raise in the number of outbreaks in poultry was reported between 2007 and 2010. In this context, the French National Reference Laboratory for avian botulism was created at Anses in 2011.

The objective of our study is to present the characteristics of the avian botulism outbreaks that have been diagnosed by the avian botulism NRL since 2013. Diagnosis is based on the analysis of livers collected on symptomatic animals using real-time PCR for the detection of genes encoding for botulinum neurotoxins type C, D, C/D and D/C, after an enrichment step in anaerobic conditions at 37°C during at least 24 hours.

107 avian botulism outbreaks were confirmed using the PCR analysis of livers (67 in poultry farms, 40 in wild birds). Type C/D was the most common BoNT type (80 %), followed by type D/C (9.2 %). Among the 107 outbreaks, turkeys (28.7% of outbreaks) were particularly concerned, as well as broilers (18.5%) and ducks (28.7 %), especially mallards that was the most common wild bird species involved in wild bird outbreaks (28 out of 40). Outbreaks are also reported in guinea fowls, pheasants, laying hens, breeding hens and mulard ducks. Type D/C outbreaks were mainly diagnosed in turkeys (92.3 %).

Avian botulism is seasonal: a raise is observed in summer (67 % of outbreaks are confirmed between July and September), but outbreaks are detected all along the year. The average number of outbreaks is stable since 2013 (18,7 ± 6,8 outbreaks per year). This disease is of main concern: spores are highly resistant in the environment and recurrence of the disease is quite common, requiring the implementation of appropriate management of the outbreaks.

INTRODUCTION

Le botulisme est une affection neuromusculaire due à l'action de la toxine botulique produite principalement par *Clostridium botulinum*, une bactérie anaérobie et sporulante. Il existe 7 types toxiques caractérisés annotés de A à G. Le botulisme humain est associé aux types A, B, E et F. Le botulisme animal est principalement associé aux types C, D, C/D et D/C. Des épisodes de botulisme aviaire de type E sont rapportés en faune sauvage, notamment aux Etats-Unis (Lan Chun et al., 2015) et des épisodes de type E ont été rapportés en France en élevage de volailles à la fin des années 90 (AFSSA, 2002).

Le botulisme aviaire est considéré comme la maladie des oiseaux la plus importante en termes de mortalité au niveau mondial (Rocke, 2006). En Europe, le botulisme animal est considéré comme une maladie émergente préoccupante (Skarin et al., 2013a) pouvant entraîner des pertes économiques majeures dans les élevages de volailles (Le Marechal et al., 2016). En France entre 2000 et 2013, les réseaux d'épidémiologie SAGIR (« Surveiller et Agir ») et le RNOEA (Réseau National d'Observations Epidemiologiques en Aviculture) ont rapporté 129 foyers de botulisme signalés chez les oiseaux sauvages et 396 chez les volailles (Ventujol et al., 2017). Une forte augmentation du nombre de foyers de botulisme en élevage avicole a été observée entre 2007 et 2011 sans que l'origine de cette augmentation n'ait été identifiée. C'est dans ce contexte que le Laboratoire National de Référence pour le botulisme aviaire a été mis en place en 2012 à l'Anses au laboratoire de Ploufragan.

Dans le cadre de ses activités de référence, le LNR a développé et validé une méthode de confirmation en laboratoire du botulisme aviaire basée sur une méthode PCR. Dans cette étude, nous présentons les caractéristiques des foyers de botulisme confirmés par le LNR botulisme aviaire depuis 2013 et la mise en place de cette approche diagnostique.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Echantillonnage

Afin d'optimiser le diagnostic du botulisme aviaire, un protocole a été mis en place en collaboration avec le LABOCEA de Ploufragan à partir de 2013. Les foies (le LNR recommande l'envoi de 4 foies entiers pour la confirmation du botulisme en laboratoire) sont envoyés par les vétérinaires, le personnel de l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage, les fédérations de chasse ou les laboratoires départementaux lorsque les signes cliniques sont évocateurs de botulisme (paralysie flasque ascendante). Les foies sont expédiés sous régime du froid dans les 24 heures qui suivent le prélèvement ou congelés si une durée de stockage plus importante est à envisager.

1.2. Analyses des suspicions de botulisme aviaire

Le diagnostic en laboratoire pour le botulisme aviaire se fait selon la méthode développée et validée par le LNR (Le Marechal et al., 2017). Celle-ci consiste en l'analyse de foies entiers (max 25 g) prélevés sur des animaux symptomatiques. Les foies sont dilués individuellement au 1/10^{ème} dans du bouillon régénéré Tryptone Peptone Glucose Yeast (TPGY) (Skarin et al., 2010) puis homogénéisés à l'aide d'un Pulsifier® (Microgen, Surrey, UK) pendant 15 secondes. L'ensemble des prélèvements est incubé pendant au moins 24h à 37°C dans une enceinte anaérobie (station A35, Don Whitley).

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

La détection des gènes codant pour les toxines C, D, C/D, D/C et E est réalisée par PCR en temps réel tel que décrit précédemment (Le Marechal et al., 2017) et un kit commercial (QuantiFast Pathogen +IC kits, Qiagen) est utilisé comme contrôle interne.

Cette méthode a un seuil de détection de 5 spores par gramme de foie pour le type C et D et 250 spores par gramme de foie pour le type E (détermination selon les critères de la norme NF U 47-600). La spécificité diagnostique de cette méthode à l'échelle d'une suspicion est de 100 % et la sensibilité de 95,35 % (Le Marechal et al., 2017).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Nombres de suspicions analysées

225 suspicions de botulisme aviaire ont été traitées par le LNR botulisme aviaire entre février 2013 et août 2018. 107 épisodes de botulisme aviaire ont été confirmés, 67 en élevages de volailles et 40 en faune sauvage. Le nombre total de suspicions toutes espèces confondues est stable (environ $37.5 \pm 13,3$ suspicions par an) ainsi que le nombre d'épisodes confirmés (moyenne de $18,7 \pm 6,8$ épisodes par an) (cf. Figure 1). Il est moins élevé que celui observé sur la période 2007-2011 où le nombre d'épisodes confirmés avait fortement augmenté mais des épisodes continuent d'être confirmés annuellement que ce soit en volaille ou en faune sauvage.

Le botulisme animal n'est pas à déclaration obligatoire dans la plupart des pays (Skarin et al., 2013), il y a donc très peu de données disponibles sur le nombre d'épisodes retrouvés dans les autres pays. Il est donc difficile de comparer les données du LNR avec les données des autres pays.

2.2. Saisonnalité du botulisme

Un effet saison du botulisme aviaire est observé : la majorité des foyers de botulisme est déclarée en été (67,3% des épisodes confirmés ont été diagnostiqués entre juillet et septembre). Cette saisonnalité est particulièrement marquée en faune sauvage où 90% des épisodes ont été confirmés pendant cette période. En élevage, la majorité des foyers de botulisme (53,7%) est retrouvée en été, des cas sont cependant confirmés toute l'année (cf. Figure 2). La saisonnalité du botulisme est bien connue (Ventujol et al., 2017) notamment en faune sauvage où les facteurs de risque d'initiation d'un épisode sont les plus importants lorsque la température est élevée, notamment la température de l'eau et le potentiel redox faible. Ces conditions sont retrouvées en été et le nombre d'épisodes recensés est important lorsque les températures sont élevées (Le Maréchal et al., 2015).

2.3 Types toxiques

Toutes espèces aviaires confondues, le type toxinique le plus fréquent est le type C/D (80%) suivi par le type D/C (9,2%) (cf. Figure 3 et 4). Le type C/D est rapporté comme étant le type toxinique majoritairement impliqué dans les épisodes de botulisme aviaire en Europe actuellement (Anza et al., 2014; Bano et al., 2017; Woudstra et al., 2012).

Dans tous les épisodes de botulisme en faune sauvage, le type toxinique identifié est le type C/D. Dans 2 de ces épisodes, plusieurs types toxiques ont été mis en évidence (1 cas avec une souche de C et C/D en 2015 et 1 cas C/D et E en 2018). Des épisodes de botulisme aviaire impliquant plusieurs types toxiques ont déjà été rapportés par ailleurs dans la littérature (Woudstra et al., 2012). A notre connaissance la détection concomitante du type E et C/D à partir de l'analyse du foie d'un oiseau (canard colvert) est rapporté ici pour la première fois. Les implications de la détection du type E dans le foie d'un oiseau sauvage en terme de gestion pour la santé publique sont donc difficiles à évaluer pour le moment.

En élevage, le type C/D est retrouvé dans 72% des cas. Parmi les 28 % restants, 9% des élevages sont positifs pour le type C/D associé avec un autre type toxinique (C/D et C, C/D et D ou C/D et D/C). Les types D (15,6%) et D/C (3,4%) n'ont été identifiés qu'en élevage (Figure 3). Aucun cas de botulisme de type C ou E seul n'a été détecté en élevage par le LNR botulisme aviaire entre 2013 et 2018.

Les épisodes de botulisme humain ne sont pas associés au type C/D, C, D ou D/C. Ces types toxiques semblent uniquement associés aux épisodes de botulisme animal; le type C/D apparaissant comme particulièrement adapté aux espèces aviaires.

Au contraire le type E est retrouvé dans des cas humains et pourrait donc présenter un risque pour la

santé publique. L'identification du type toxinique est un élément essentiel pour la mise en place de mesures de gestion appropriées des épisodes de botulisme aviaire, l'objectif principal étant de démontrer que le type E n'est pas impliqué.

2.4 Répartition des épisodes de botulisme en fonction des espèces aviaires

Dans 70 % des foyers de botulisme en faune sauvage, des canards colverts étaient impliqués. La deuxième espèce représentée est le cygne (15%). D'autres espèces d'oiseaux ont été analysées au LNR comme des bécassines des marais, des goélands, des corneilles, des sarcelles d'hiver, des oies, des fuligules morillons, des hérons, des poules d'eau ou des canards souchets.

En volaille, 48% des foyers de botulisme aviaire concernent des dindes, 34% des élevages de productions de Gallus (poulets ou poules), 9% des élevages de pintades et ~5% des élevages de canards et de faisans. Les types toxiques D et D/C ne sont quasiment retrouvés que sur les dindes et le mélange C et C/D a été identifié à deux reprises en canard, une fois en faune sauvage et une fois en élevage.

Les épisodes de botulisme impliquant des dindes sont peu rapportés dans la littérature (Popp et al., 2012), bien qu'elles apparaissent comme sensibles. De plus, les dindes semblent sensibles au type C/D mais également au type D et D/C.

CONCLUSION

Le botulisme aviaire touche de nombreuses espèces aviaires et peut engendrer des mortalités importantes. C'est une maladie saisonnière, principalement retrouvée en été, même si des épisodes peuvent être diagnostiqués toute l'année. Le type C/D est le type toxinique le plus fréquent dans les épisodes de botulisme aviaire. Il est à noter la détection du type E et C/D par PCR dans le foie d'un canard colvert en 2018.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AFSSA, 2002. Rapport sur le botulisme d'origine aviaire et bovine.
- Anza, I., Skarin, H., Vidal, D., Lindberg, A., Baverud, V., Mateo, R., 2014. The same clade of *Clostridium botulinum* strains is causing avian botulism in southern and northern Europe. *Anaerobe* 26, 20-23.
- Bano, L., Drigo, I., Tonon, E., Pascoletti, S., Puiatti, C., Anniballi, F., Auricchio, B., Lista, F., Montecucco, C., Agnoletti, F., 2017. Identification and characterization of *Clostridium botulinum* group III field strains by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Anaerobe* 48, 126-134.
- Lan Chun, C., Kahn, C.I., Borchert, A.J., Byappanahalli, M.N., Whitman, R.L., Peller, J., Pier, C., Lin, G., Johnson, E.A., Sadowsky, M.J., 2015. Prevalence of toxin-producing *Clostridium botulinum* associated with the macroalga *Cladophora* in three Great Lakes: growth and management. *The Science of the total environment* 511, 523-529.
- Le Maréchal, C., Decors, A., Quintaine, T., 2015. Le botulisme, une gestion délicate. *Lettre SAGIR* 182, 4-7.
- Le Marechal, C., Rouxel, S., Ballan, V., Houard, E., Poezevara, T., Bayon-Auboyer, M.H., Souillard, R., Morvan, H., Baudouard, M.A., Woudstra, C., Mazuet, C., Le Bouquin, S., Fach, P., Popoff, M., Chemaly, M., 2017. Development and Validation of a New Reliable Method for the Diagnosis of Avian Botulism. *PLoS One* 12, e0169640.
- 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.
- Rocke, T.E. 2006. The global importance of avian botulism, In: G.C. Boere, C.A.G., D.A. Stroud (Ed.) *Waterbirds around the world*. The stationery office, Edinburgh, UK, 422-426.
- 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.
- Ventujol, A., Decors, A., Le Maréchal, C., Toux, J.Y., Allain, V., Mazuet, C., Bayon-Auboyer, M.-H., Le Bouquin, S., Souillard, R., 2017. Le botulisme aviaire en France: Etude des cas signalés dans la faune sauvage et dans les élevages par deux réseaux de surveillance entre 2000 et 2013. *Epidémiologie et santé animale* 72, 85-102.
- 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.

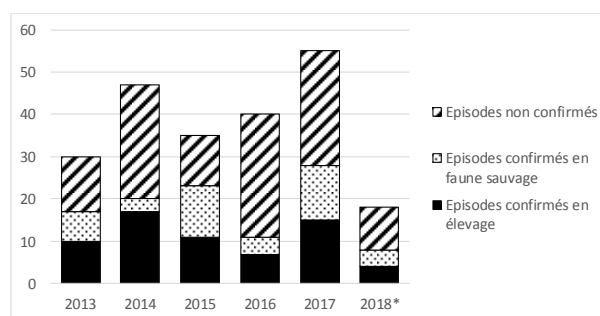


Figure 1 : Nombre de suspicions de botulisme analysées entre 2013 et 2018 et répartition des épisodes confirmés (* : Janvier-Août 2018)

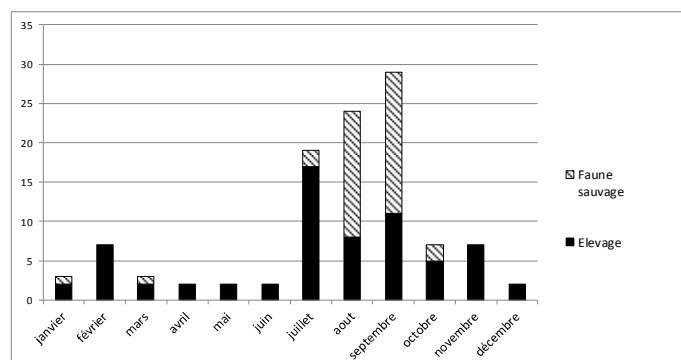


Figure 2. Répartition des épisodes de botulisme aviaire en fonction des mois de l'année

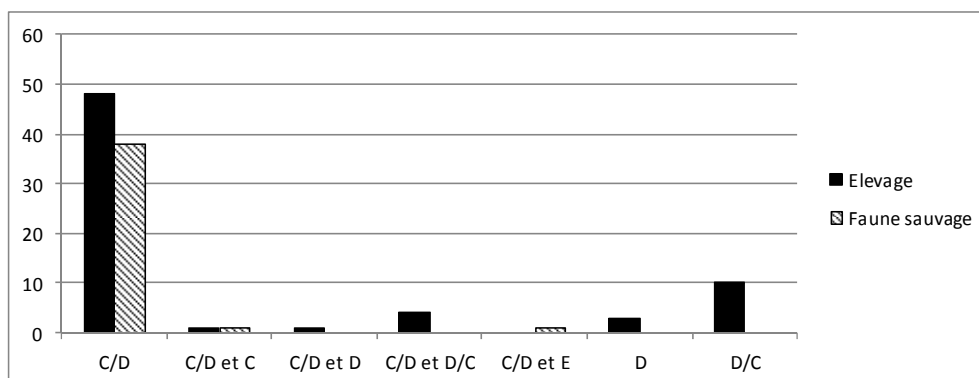


Figure 3. Répartition des épisodes de botulisme en fonction du type toxinique

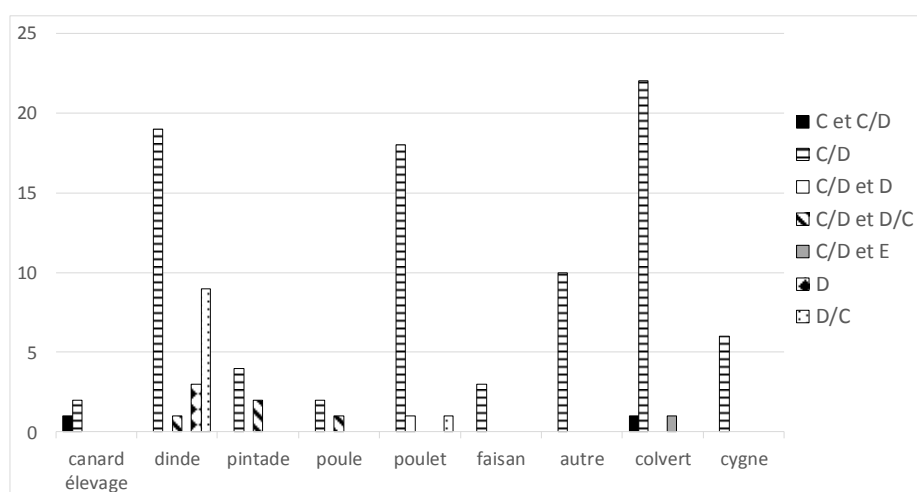


Figure 4 : Répartition des types toxiques en fonction des espèces