

## SUIVI DE LA DETECTION DE *C. BOTULINUM* DEPUIS L'ELEVAGE DE VOLAILLES JUSQU'A L'EPANDAGE DU FUMIER DANS LES PARCELLES

Souillard Rozenn<sup>1</sup>, Rouxel Sandra<sup>2</sup>, Dorenlor Virginie<sup>1</sup>, Poezevara Typhaine<sup>2</sup>, Balaine Loïc<sup>1</sup>,  
Jambou Léa<sup>2</sup>, Eono Florent<sup>1</sup>, Avouac Amandine<sup>2</sup>, Kerphérique Stéphane<sup>1</sup>, Gouet Mathys<sup>2</sup>,  
Cailton Eloïse<sup>1</sup>, Le Bouquin Sophie<sup>1</sup>, Le Maréchal Caroline<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ANSES, Laboratoire de Ploufragan - Plouzané - Niort, Unité Epidémiologie Santé Bien Etre, 22440  
PLOUFRAGAN

<sup>2</sup> ANSES, Laboratoire de Ploufragan - Plouzané - Niort, Unité Hygiène et Qualité des Produits  
Avicoles et Porcins, 22440 PLOUFRAGAN

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

### RÉSUMÉ

Le botulisme est une affection nerveuse paralytique due à l'action de neurotoxines produites par *Clostridium botulinum*, principalement associé aux toxines C, D, C/D et D/C chez l'animal. Il a été montré que les volailles pouvaient être porteuses asymptomatiques de la bactérie avec des risques de contaminations croisées avec les bovins. L'objectif de l'étude (projet BOTUSOL) est d'évaluer le portage de *C. botulinum* et de suivre la contamination des fumiers lors du retour au sol dans 30 élevages de volailles indemnes de botulisme: 14 élevages sans historique de botulisme, 7 élevages avec un historique de botulisme et 9 élevages mixtes avec un épisode clinique en cours dans l'atelier bovin. Des prélèvements ont été collectés: 20 écouvillons cloacaux et 2 pédichiffonnettes en fin de lot des volailles, 12 pots et 2 chiffonnettes dans le tas de fumier et 12 pots de terre et 2 pédichiffonnettes dans la parcelle (une semaine avant épandage du fumier puis un mois plus tard). La détection de *C. botulinum* de type C, D, C/D et D/C a été réalisée par PCR en temps réel. Pour les exploitations sans historique de botulisme, *C. botulinum* a été détecté dans **0,8%** des prélèvements dans 3 élevages/14 (en fin de lot 1/14, dans le fumier 2/5 et dans la terre avant épandage 1/5). Pour les élevages avec un historique de botulisme, *C. botulinum* a été détecté dans **5%** des prélèvements dans 4 élevages/7 (en fin de lot 1/7, dans le fumier 3/6, dans la terre avant épandage 3/5 et après épandage 2/5). Pour les exploitations mixtes avec un épisode chez les bovins, *C. botulinum* a été détecté dans **38,4%** des prélèvements dans 7 élevages/9 (en fin de lot 4/6, dans le fumier 5/7, dans la terre avant épandage 3/5 et après épandage 3/6). Ces résultats confirment la présence de *C. botulinum* dans certains élevages avicoles en l'absence de signes cliniques sur les oiseaux (en portage, dans les fumiers et les parcelles), particulièrement dans les élevages avec un épisode bovin en cours, rappelant l'importance de la biosécurité et des barrières sanitaires entre les ateliers pour limiter les risques de contaminations croisées et de récurrences.

### ABSTRACT

#### Detection of *C. botulinum* from poultry farms to the manure spread on the fields

Botulism is a paralytic disease caused by the action of neurotoxins produced by *Clostridium botulinum*, mainly associated with toxins C, D, C/D and D/C in animals. Poultry can be asymptomatic carriers of the bacterium, with risks of cross-contamination with cattle. The aim of the study (BOTUSOL project) is to assess the carriage of *C. botulinum* and to monitor manure contamination during spreading in 30 healthy poultry farms: 14 farms with no history of botulism, 7 farms with an history of botulism and 9 farms with a bovine botulism ongoing outbreak. Samples were collected: 20 cloacal swabs and 2 boot swabs at the end of poultry rearing, 12 samples and 2 swabs in the manure pile and 12 soil samples and 2 boot swabs on the field (one week before manure spreading and one month later). Detection of *C. botulinum* types C, D, C/D and D/C was carried out using real-time PCR. For the farms with no history of botulism, *C. botulinum* was detected in **0.8%** of the samples from 3 farms/14 (at the end of rearing 1/14, in the manure 2/5 and in soil before spreading 1/5). Regarding the farms with botulism history, *C. botulinum* was detected in **5%** of the samples from 4 farms/7 (at the end of rearing 1/7, in the manure 3/6, in soil before spreading 3/5 and in soil after spreading 2/5). Regarding the farms with bovine botulism outbreak, *C. botulinum* was detected in **38.4%** of the samples from 7 farms/9 (at the end of rearing 4/6, in the manure 5/7, in soil before spreading 3/5 and in soil after spreading 3/6). These results confirm the detection of *C. botulinum* in poultry farms in the absence of clinical signs on birds (carriers, in manure and in soil), particularly in farms with a bovine botulism outbreak, reminding the importance of biosecurity and sanitary barriers between animal productions to limit the risks of cross-contamination and recurrence.

## INTRODUCTION

Le botulisme est une affection nerveuse paralytique due à l'action de neurotoxines produites par la bactérie *Clostridium botulinum*. Le botulisme humain est principalement associé aux toxines A, B, E et F et le botulisme animal aux toxines C/D, D/C, C et D (Le Bouquin et al., 2022), touchant essentiellement en France les bovins et les volailles avec des risques de contaminations croisées entre les productions. *C. botulinum* est une bactérie sporulante qui peut persister plusieurs années dans l'environnement (Notermans et al. 1981), rendant difficile la décontamination et la gestion du fumier dans les élevages atteints par la maladie (Rapport expertise Anses, 2022).

Dans les élevages indemnes sans signes cliniques, il a été montré que les volailles pouvaient être porteuses asymptomatiques de la bactérie avec des risques de contaminations des bovins notamment par les fumiers (Relun et al., 2017 ; Souillard et al., 2017). Il a été également rapporté que des bovins pouvaient être porteurs de la bactérie (Souillard et al., 2015). Cependant, le portage asymptomatique de *Clostridium botulinum* chez les animaux reste peu connu, ainsi que la contamination des fumiers et des sols lors de l'épandage. Or, il s'agit de données essentielles pour mieux prévenir les contaminations croisées entre les productions et les risques de récurrences pour une meilleure maîtrise de la maladie dans les filières avicoles et bovines.

L'objectif de cette étude est de déterminer l'occurrence de *C. botulinum* de type C, D, C/D et D/C dans les élevages de volailles indemnes de botulisme depuis les animaux jusqu'au retour au sol des effluents.

## 1. MATERIELS ET METHODES

### 1.1. Les visites dans les élevages de volailles

Au cours de l'étude, 30 lots de volailles indemnes de botulisme ont été suivis : 14 élevages sans historique de botulisme sur leur exploitation, 9 élevages mixtes bovins/volailles avec un épisode clinique de botulisme en cours dans l'atelier bovin au moment de la réalisation des prélèvements et 7 élevages avec un historique de botulisme (bovin ou aviaire) sur leur exploitation dans les deux années précédentes. Le nombre d'élevages dans ces 3 catégories n'est pas équivalent car lié aux possibilités de recrutement selon les situations épidémiologiques des exploitations. Les 3 catégories d'élevages sont indiquées dans le tableau 1.

Dans la mesure du possible, les prélèvements suivants ont été collectés par l'Anses dans chaque élevage de volailles au cours de 3 visites :

- Visite 1 en fin de lot: 20 écouvillons cloacaux et 2 pédichiffonnettes dans la semaine avant le départ à l'abattoir des volailles

- Visite 2 une semaine avant l'épandage du fumier stocké: 12 prélèvements de terre et 2 pédichiffonnettes dans la parcelle prévue pour l'épandage ainsi que 12 prélèvements de fumier et 2 chiffonnettes dans le tas de fumier
- Visite 3 un mois après l'épandage : 12 prélèvements de terre et 2 pédichiffonnettes dans la parcelle épandue.

Un questionnaire épidémiologique a également été complété avec l'éleveur lors des visites (historique sanitaire du lot de volailles, modalités d'épandage).

Les prélèvements collectés ont été analysés par l'Anses par PCR pour détecter *C. botulinum* de type C/D, D/C, C et D selon une approche décrite précédemment. Brièvement, les échantillons ont été enrichis en TPGY (Tryptone, Peptone Glucose Yeast) pendant 18h en conditions anaérobies à 37°C puis l'ADN a été extrait avec un kit commercial adapté à la matrice selon les recommandations des fournisseurs (QiaAmp DNA mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) pour les écouvillons cloacaux, NucleoSpin Soil (Macherey-Nagel, Hoerd, France) pour les fumiers, DNeasy PowerSoil pro kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) pour les sols, chiffonnettes et pédichiffonnettes). Les gènes codant les toxines C, D, C/D et D/C ont été détectés par PCR en temps réel (Le Maréchal et al, 2018 ; Le Maréchal et al, 2016).

### 1.2. Protocole de prélèvements dans les élevages

En fin de lot, les 20 écouvillons cloacaux ont été réalisés dans le bâtiment sur 20 animaux de manière aléatoire. Les 2 pédichiffonnettes ont été réalisées dans le bâtiment avec un aller – retour par pédichiffonnette sur chaque moitié de la surface du bâtiment.

Au niveau du tas de fumier, le protocole ci-dessous est réalisé :

- Division du tas de fumier en 3 zones
- Réalisation de 4 carrés de 30 cm par 30 cm pour chaque zone
- Dans chaque carré : prise du fumier sur une profondeur de 15 cm, mis dans un sac pour homogénéisation et remplissage d'un pot d'échantillon de 200mL
- Pour les 2 chiffonnettes : passage de chaque côté du tas avec une chiffonnette (1 aller-retour par chiffonnette en surface du tas)

Dans la parcelle, le protocole ci-dessous est suivi :

- Répartition de 12 carrés de 1m par 1m (3 fois 4 carrés) sur la surface de la parcelle (environ 1 hectare) avec des jalons
- Dans chaque carré : réalisation de 3 prélèvements de terre avec une tarière sur 30 cm de profondeur et 7 cm de diamètre
- Homogénéisation de ces 3 prélèvements et prise d'1 échantillon du mélange dans un pot
- Pour les 2 pédichiffonnettes : 1 aller-retour par pédichiffonnette au milieu de la parcelle

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

### 2.1. Descriptif des élevages de volailles suivis

Parmi les 30 élevages de volailles, les productions de poulets et dindes de chair ont été le plus souvent suivies : 20 élevages de poulets (18 standard, 1 label et 1 chapon), 8 élevages de dindes, 1 élevage de pintades et 1 élevage de poules pondeuses. Ces 30 élevages provenaient de 8 organisations de production et étaient localisés dans le Nord-Ouest de la France : 22 en Bretagne, 6 en Pays de la Loire et 2 en Normandie. Pour les 18 lots de poulets standards, l'effectif moyen était de 24 251 animaux (13 200 à 30 800), 6530 pour l'élevage de chapons et 4400 pour l'élevage de poulets label. Pour les 8 lots de dindes, l'effectif moyen était de 10 049 animaux (7200 à 16 000) et pour le lot de pintades il était de 18 000 animaux (donnée manquante pour le lot de pondeuses). Pour les 25 lots pour lesquels on a pu obtenir l'information, le taux de mortalité en fin d'élevage était en moyenne de 4,2% (1,3% jusqu'à 15,9% pour un lot dû à un étouffement des animaux).

### 2.2. La gestion du fumier sur les exploitations

Il n'a pas été possible de suivre le fumier et son épandage systématiquement pour chacun des 30 élevages de volailles (cela n'a pas été possible pour 11 exploitations), étant données certaines circonstances imprévues liées à la gestion du fumier dans les exploitations (mélange avec d'autres effluents ou exportation du fumier en dehors de l'exploitation).

Parmi les 19 élevages pour lesquels les tas de fumiers ont pu être suivis, les tas ont été stockés en moyenne 14 semaines (n=17 élevages) et pour 2 élevages, le fumier a été prélevé directement dans le bâtiment (pas de stockage car épandage avec enfouissement à la sortie du bâtiment).

Concernant les parcelles prélevées, il n'y avait jamais eu d'épandage de fumier sur ces parcelles suite à un épisode clinique de botulisme. Parmi les 15 élevages pour lesquels la parcelle a pu être prélevée avant épandage, la plupart des éleveurs (13/15) avait déjà épandu dans les 2 ans du fumier de volailles et/ou bovin sur cette parcelle. Parmi les 14 élevages pour lesquels la terre après épandage a pu être prélevée, la profondeur moyenne d'épandage était de 22 cm (10 à 40 cm). Pour 8 élevages, un enfouissement avait été réalisé (en moyenne à 14 cm, de 10 à 20 cm) et pour 6 élevages il s'agissait d'un labour (en moyenne à 31 cm, de 30 à 40 cm).

### 2.3. La détection de *C. botulinum*

Pour les **élevages sans historique de botulisme sur leur exploitation** (tableau 1), *C. botulinum* a été détecté dans seulement **0,8%** de l'ensemble des prélèvements collectés (4/516 prélèvements) dans 3 élevages/14. En fin de lot, 1 seul écouvillon a été

détecté positif pour *C. botulinum* de type C, D, C/D ou D/C (sans que le type toxinique n'ait pu être identifié) dans 1 élevage sur 14. Dans le fumier, 2 pots ont été détectés positifs (*C. botulinum* de type C/D et D/C) dans 2 élevages sur 5. Enfin, dans la parcelle, *C. botulinum* de type C, D, C/D ou D/C a été détecté dans 1 seul pot de terre avant épandage parmi les 5 élevages testés. *C. botulinum* a ainsi été très ponctuellement et rarement détecté dans les élevages de volailles sans aucun historique de botulisme sur leur exploitation.

Pour les **élevages avec un historique de botulisme sur leur exploitation** (tableau 1), *C. botulinum* a été détecté **dans 5%** de l'ensemble des prélèvements collectés (19/378 prélèvements) dans 4 élevages sur 7. Parmi ces 19 détections, il s'agissait essentiellement des types toxiques D/C et D (tableau 2). En fin de lot, 1 seule pédichiffonnette a été détectée positive dans un élevage sur les 7. Le fumier était le plus fréquemment contaminé avec 13% de prélèvements positifs dans 3 élevages sur 6. De la terre avant et après épandage a également été détectée positive dans respectivement 3 élevages et 2 élevages sur les 5 testés (5,7% et 4,3% des prélèvements). Ces résultats montrent une persistance et une circulation de *C. botulinum* dans des élevages ayant déjà connu un épisode de botulisme sur leur exploitation, avec une détection à la fois dans le fumier et lors du retour au sol dans les parcelles.

Enfin, pour les **élevages mixtes avec un épisode clinique de botulisme en cours sur les bovins** (tableau 1), *C. botulinum* a été détecté dans **38,4%** de l'ensemble des prélèvements collectés (141/367 prélèvements) dans 7 élevages sur les 9. Parmi ces 141 détections, il s'agissait essentiellement de *C. botulinum* de type D/C (85,1%) (tableau 2). En fin de lot, un portage sur les volailles a été détecté dans 4 élevages sur 6 (avec 32,7% de prélèvements positifs). Ces résultats confirment un portage de *C. botulinum* par les volailles dans ces exploitations touchées par un épisode de botulisme sur les bovins, avec également une contamination importante du fumier (65,3% de prélèvements positifs dans 5 élevages sur 7). Concernant les prélèvements de terre dans la parcelle, *C. botulinum* a été détecté dans 3 élevages sur 5 avant épandage du fumier (17,1% des prélèvements) et également après épandage avec une contamination plus importante de la terre dans 3 élevages sur 6 (32,6% des prélèvements).

Ces résultats montrent une détection de la bactérie en portage et dans le fumier des élevages de volailles suivis : très faiblement pour ceux qui n'ont pas d'historique de botulisme clinique mais de manière plus importante pour les élevages avec un historique de botulisme et particulièrement pour ceux avec un épisode en cours sur les bovins. Cela révèle une possible persistance et une circulation du germe dans des élevages de volailles ayant déjà été touchés par la maladie. Dans les exploitations avec un épisode en cours sur les bovins, les résultats confirment que *C.*

*botulinum* peut être présent en portage chez les volailles et dans le fumier, constituant une source de contamination potentielle des bovins très sensibles à la toxine D/C (Souillard et al., 2021)

Pour les prélèvements de terre avant et après épandage, il est possible de détecter la bactérie dans les 3 catégories d'élevages suivis, mais plus particulièrement pour ceux avec un épisode clinique sur les bovins. La détection dans la terre après épandage est plus importante dans ces élevages pour lesquels le fumier était également le prélèvement le plus contaminé. Cependant, il n'a pas été observé dans notre étude de lien systématique pour chaque élevage entre la détection de la bactérie dans le fumier et celle dans la terre après épandage. Parmi 9 élevages pour lesquels le fumier a été détecté positif, pour 4 d'entre eux la terre après épandage a également été retrouvée positive. Les résultats dans la terre sont en effet à prendre avec grande précaution car de nombreux paramètres peuvent influencer la détection de *C. botulinum* dans le sol. La structure du sol, la nature de l'effluent, les modalités d'épandage (Unc and Goss 2003; Semenov *et al.* 2009) et les précipitations (Ogden *et al.* 2001; Saini *et al.* 2003) sont autant de facteurs qui pourraient influencer la détection de la bactérie dans la terre (rapport expertise Anses, 2022). Par ailleurs, le protocole de prélèvements est aussi à considérer. En effet, 12 pots ont été réalisés sur une parcelle de 1 hectare. Une des limites à cette recherche dans le sol est donc également liée à l'échantillonnage de la terre. La profondeur a été fixée à 30 cm avec la tarière afin de pouvoir prélever la partie labourée ou enfouie (dans les 30 cm) pour l'ensemble des élevages. Tout en tenant compte de ces limites de détection dans la terre, ces résultats

montrent qu'il est possible de détecter *C. botulinum* dans la terre avant épandage (probablement liée à une circulation antérieure de la bactérie) et également après les épandages lors du retour au sol de fumier contaminé.

## CONCLUSION

Essentiellement dans les élevages de volailles avec un épisode bovin en cours sur leur exploitation, mais également dans une moindre mesure dans les élevages avec un historique de botulisme et plus rarement pour ceux sans historique de botulisme, cette étude montre une possible détection et circulation de *C. botulinum* de type C, D, C/D et D/C à la fois en portage sur les volailles mais aussi dans les effluents et les sols. Afin de prévenir tous risques de contamination croisées entre les productions et de récurrences dans les élevages, cette étude rappelle l'importance des règles de biosécurité avec notamment le respect des bonnes pratiques de gestion du fumier (éloignement des tas de fumier des lieux de productions, nettoyage des matériels et véhicules d'épandage, pas d'épandage en surface, absence de pâturage de bovins sur des parcelles épandues) et des barrières sanitaires entre les productions avicoles et bovines (respect des sas sanitaires pour le personnel, désinfection des matériels communs, gestion des flux de véhicules sur l'exploitation).

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient l'ensemble des éleveurs et les organisations de production, vétérinaires et techniciens, pour leur participation à l'étude. Le projet Botusol est financé par France Agrimer.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Le Bouquin S., Lucas C., Souillard R., Le Maréchal C., Petit K., Kooh P., Jourdan-Da Silva N., Meurens F., Guillier L., Mazuet C. 2022, Front Public Health.
- Le Maréchal C., Ballan V., Rouxel S., Bayon-Auboyer M.H., Baudouard M.A., Morvan H., Houard E., Poëzevara T., Souillard R., Woudstra C., Le Bouquin S., Fach P., Chemaly M. 2016, Anaerobe.
- Le Maréchal, C., Fourour, S., Ballan, V. Rouxel S., Souillard R., Chemaly M. 2018, BMC Res Notes 11, 441.
- Notermans, S., Dufrenne, J., Oosterom, J., 1981. Applied and Environmental Microbiology. 41, 179-183.
- Ogden, I.D., Fenlon, D.R., Vinten, A.J.A., Lewis, D., 2001. International Journal of Food Microbiology. 66, 111-117.
- Rapport expertise ANSES. 2022. Décontamination et gestion des sous-produits animaux lors des cas de botulisme bovin et aviaire.
- Relun, A., Dorso, L., Douart, A., Chartier, C., Guatteo, R., Mazuet, C., Popoff, M.R., Assié, S., 2017. Epidem and Inf. 145, 3477.
- Saini, R., Halverson, L.J., Lorimor, J.C., 2003. Journal of Environmental Quality. 32,1865-1872.
- Semenov, A.V., Van Overbeek, L., Van Bruggen, A.H.C., 2009. Applied and Environmental Microbiology. 75, 3206-3215.
- Souillard, R., Le Maréchal, C., Ballan, V., Mahé, F., Chemaly, M., Le Bouquin, S., 2017. Veterinary Microbiology. 208, 212-216.
- Souillard, R., Le Maréchal, C., Hollebecque, F., Rouxel, S., Barbé, A., Houard, E., Léon, D., Poëzevara, T., Fach, P., Woudstra, C., Mahé, F., Chemaly, M., Le Bouquin, S., 2015. Veterinary Microbiology. 180, 142-145.
- Souillard R. Grosjean D., Le Gratiot T., Poezevara T., Rouxel S, Balaine L, Macé S, Martin L, Anniballi F, Chemaly M, Le Bouquin S, Le Maréchal C. 2021, Front Microbiol.

**Tableau 1. Détection de *C. botulinum* dans les 30 élevages de volailles indemnes de botulisme**

|                             |                                         | Elevages volailles<br>sans historique<br>de botulisme<br>n=14 | Elevages volailles<br>avec historique<br>de botulisme<br>n=7 | Elevages volailles<br>avec épisode bovin<br>n=9 |
|-----------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| <b>Fin de lot</b>           | nb d'élevages positifs                  | 1/14                                                          | 1/7                                                          | 4/6                                             |
|                             | % et nb de prélèvements positifs        | <b>0,3% (1/307)</b>                                           | <b>0,6% (1/154)</b>                                          | <b>32,7% (33/101)</b>                           |
| <b>Fumier</b>               | nb d'élevages positifs                  | 2/5                                                           | 3/6                                                          | 5/7                                             |
|                             | % et nb de prélèvements positifs        | <b>2,8% (2/70)</b>                                            | <b>13% (11/84)</b>                                           | <b>65,3% (64/98)</b>                            |
| <b>Terre avant épandage</b> | nb d'élevages positifs                  | 1/5                                                           | 3/5                                                          | 3/5                                             |
|                             | % et nb de prélèvements positifs        | <b>1,4% (1/69)</b>                                            | <b>5,7% (4/70)</b>                                           | <b>17,1% (12/70)</b>                            |
| <b>Terre après épandage</b> | nb d'élevages positifs                  | 0/5                                                           | 2/5                                                          | 3/6                                             |
|                             | % et nb de prélèvements positifs        | <b>0% (0/70)</b>                                              | <b>4,3% (3/70)</b>                                           | <b>32,6% (32/98)</b>                            |
| <b>Total</b>                | <b>nb d'élevages positifs</b>           | <b>3/14</b>                                                   | <b>4/7</b>                                                   | <b>7/9</b>                                      |
|                             | <b>% et nb de prélèvements positifs</b> | <b>0,8% (4/516)</b>                                           | <b>5% (19/378)</b>                                           | <b>38,4% (141/367)</b>                          |

**Tableau 2. Les types toxiniques de *C. botulinum* détectés dans les élevages**

| Type toxinique                            | Elevages volailles<br>avec épisode bovin | Elevages volailles avec<br>historique botulisme | Elevages volailles sans<br>historique botulisme | Total            |
|-------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------|
| <i>C. botulinum</i> type D/C              | 120 (85,1%)                              | 9                                               | 1                                               | <b>130 (79%)</b> |
| <i>C. botulinum</i> type D                | 11 (7,8%)                                | 3                                               |                                                 | <b>14 (8,5%)</b> |
| <i>C. botulinum</i> type C, D, C/D ou D/C | 7 (4,9%)                                 | 5                                               | 2                                               | <b>14 (8,5%)</b> |
| <i>C. botulinum</i> type D, D/C           | 3 (2,1%)                                 |                                                 |                                                 | <b>3 (1,8%)</b>  |
| <i>C. botulinum</i> type C/D              |                                          | 2                                               | 1                                               | <b>3(1,8%)</b>   |
| <b>Total</b>                              | <b>141</b>                               | <b>19</b>                                       | <b>4</b>                                        | <b>164</b>       |