

AVIS 26-2017

Objet:

**Risque associé à l'épandage de fumiers  
et de digestats contaminés par  
*Clostridium botulinum***

(SciCom N°2017/04)

Avis approuvé par le Comité scientifique le 15 décembre 2017

**Mots-clés :** botulisme, intoxication, toxi-infection, toxine botulique, spore, bovins, fumier, lisier, biométhanisation, digestat, hygiénisation/pasteurisation, épandage, pâturage

**Key terms:** botulism, intoxication, toxico-infection, botulinum toxin, spore, cattle, manure, liquid manure, biomethanisation, digestate, hygienisation/pasteurization, spreading, grazing

## Table des matières

Résumé.....	3
Summary .....	4
1. Termes de référence .....	5
1.1. Questions spécifiques.....	5
1.2. Dispositions législatives .....	5
1.3. Méthodologie.....	6
2. Définitions & Abréviations .....	6
3. Introduction.....	8
3.1. Contexte de la demande d'avis .....	8
3.2. <i>Clostridium botulinum</i> .....	9
3.2.1. Propriétés microbiologiques.....	9
3.2.2. Résistance environnementale, en particulier à la chaleur .....	9
3.2.3. Pathologie et aspects cliniques chez les animaux, en particulier les ruminants .....	10
3.2.4. Diagnostic .....	11
3.3. Processus de biométhanisation.....	11
3.4. Dangers sanitaires potentiels identifiés pour le processus de biométhanisation et données concernant <i>C. botulinum</i> .....	12
3.5. Aspects législatifs liés aux lisiers (fumiers) et aux digestats .....	12
4. Evaluation du risque.....	13
4.1. Modèle de voie du risque .....	13
4.2. Identification du danger.....	14
4.3. Caractérisation du danger.....	14
4.3.1. Appréciation de l'émission .....	14
4.3.2. Appréciation de l'exposition.....	15
4.3.3. Appréciation des conséquences.....	16
4.3.4. Estimation du risque.....	16
5. Réponses aux questions spécifiques .....	17
6. Incertitudes .....	22
7. Conclusions.....	23
8. Recommandations.....	23
Références .....	26
Présentation du Comité scientifique de l'AFSCA .....	29
Membres du Comité scientifique.....	29
Conflits d'intérêts.....	29
Remerciements .....	29
Composition du groupe de travail.....	30
Cadre juridique.....	30
Disclaimer.....	30
Annexes.....	31
Tableau I : Caractéristiques de survie, de croissance et de toxinogénèse des différents toxinotypes de <i>Clostridium botulinum</i> . .....	31
Tableau II : Taux d'incidence des cas de botulisme bovin inférés des chiffres de notification à l'AFSCA et de ceux des échantillons positifs au diagnostic au Laboratoire National de Référence (Institut scientifique de Santé Publique). .....	32
Figure 1 : Modèle de voie du risque pour du fumier de bovins contaminé par <i>Clostridium botulinum</i> pouvant éventuellement subir un processus de biométhanisation.....	33
Figure 2 : Identification dans le modèle (Fig. 1) des voies de contamination les plus importantes sur base des lignes de preuves. ....	34

## Résumé

### Contexte & Questions

Un foyer de botulisme bovin a eu lieu dans une exploitation utilisant le fumier provenant des animaux comme intrant dans son installation de biométhanisation. Le Comité scientifique est amené à évaluer les risques pour la santé animale associés à l'épandage de fumiers et de digestats contaminés par *Clostridium botulinum* toxinotype D. Plusieurs questions spécifiques sont posées.

### Méthodologie

L'avis est basé sur les données de littérature, une évaluation qualitative du risque et l'opinion d'experts.

### Résultats

Les données de la littérature relatives à l'émission, l'exposition et à leurs conséquences suggèrent que l'épandage de fumier ou d'un digestat contaminé par *C. botulinum* toxinotype D augmente potentiellement la concentration en spores dans l'environnement des bovins. Celle-ci mène à une augmentation du risque d'intoxication (absorption de toxines préformées). Ce risque a cependant été évalué par le Comité scientifique comme très faible dans les deux scénarios envisagés (épandage de fumier ou de digestat).

### Conclusion

Le Comité scientifique estime que, bien que le risque d'intoxication directe des bovins par des fumiers ou des digestats contaminés par *C. botulinum* type D-C soit très faible, des mesures visant à la contamination environnementale la plus faible possible devraient prévaloir. Des réponses aux questions spécifiques sont proposées. Des recommandations générales et spécifiques sont formulées.

Les conclusions et recommandations formulées dans le présent avis sont valables pour *C. botulinum* toxinotype C ou D. Le risque devra être ré-évalué dans le cas d'une mise en évidence de tout autre toxinotype de *C. botulinum*.

---

## Summary

### **Risk associated to the spreading of manure and digestate contaminated by *C. botulinum***

#### **Background & Terms of reference**

An outbreak of botulism in cattle has occurred in a holding using manure in its biomethanisation plant. The Scientific Committee has been requested to evaluate the animal health risks associated with the spreading of manure or digestates contaminated with *Clostridium botulinum* toxinotype D. Specific questions have been formulated.

#### **Methodology**

Answers to the specific questions have been provided based on data from the literature, on a risk assessment and expert opinion.

#### **Results**

The literature data concerning emission, exposure and their consequences suggest that spreading of manure and digestate contaminated by *C. botulinum* can potentially increase the spore concentration in the environment. This higher spore concentration can lead to an increased risk of intoxication (ingestion of already formed botulin toxins). This risk was however assessed by the Scientific Committee as very low within the two considered scenarios (spreading of either manure or digestate).

#### **Conclusion**

The Scientific Committee responded to the specific questions. Although the risk associated with manure or digestates contaminated by *C. botulinum* has been assessed as 'very low' by the Scientific Committee, recommendations based on measures minimizing the environmental contamination should prevail. Responses to the specific questions have been formulated. General and specific recommendations have also been presented.

The conclusions and recommendations formulated in this Advice are only valid for *C. botulinum* toxinotype C or D. The risk should be re-evaluated in the case of any other toxinotype of *C. botulinum*.

## 1. Termes de référence

### 1.1. Questions spécifiques

Dans le cadre d'un foyer de botulisme bovin s'étant produit dans une exploitation utilisant le fumier provenant des animaux comme intrant dans son installation de biométhanisation, le Comité scientifique est amené à évaluer les risques pour la santé animale associés à l'épandage de fumiers et de digestats contaminés par *Clostridium botulinum* toxinotype D.

Plus spécifiquement, différentes questions ont été posées au Comité scientifique :

- « Quel est le niveau de contamination naturel d'un fumier issu d'une exploitation saine ?
- Peut-on valoriser des fumiers contaminés directement sur des pâturages ? Le traitement de biométhanisation diminue-t-il ou annule-t-il le risque représenté par un fumier contaminé ?
- Est-il préférable de traiter le fumier contaminé via l'unité de biométhanisation ?
- Combien de temps doit-on considérer que le digestat est potentiellement contaminé par *Clostridium botulinum* ?
- Tenant compte des antagonistes microbiologiques dans les sols et de l'aspect ubiquitaire de *Clostridium botulinum*, l'épandage de digestat contaminé par injection dans les sols de pâturage, avec un délai sanitaire avant pâturage, permet-il de gérer le risque ? Quelle durée pour le délai sanitaire ?
- Quelles solutions alternatives peuvent être envisagées : traitement, autres méthodes d'utilisation ?
- Comment interpréter des résultats discordants entre laboratoires ? »

### 1.2. Dispositions législatives

Loi du 24 mars 1987 relative à la santé des animaux.

Arrêté royal du 3 février 2014 désignant les maladies des animaux soumises à l'application du chapitre III de la loi du 24 mars 1987 relative à la santé des animaux et portant règlement de la déclaration obligatoire.

Arrêté royal du 22 mai 2005 portant des mesures pour la surveillance de et la protection contre certaines zoonoses et agents zoonotiques.

Arrêté royal du 28 janvier 2013 relatif à la mise sur le marché et à l'utilisation des engrais, des amendements du sol et des substrats de culture

Arrêté royal du 14 novembre 2003 concernant l'autocontrôle, la notification obligatoire et la traçabilité dans la chaîne alimentaire.

Directive du Conseil du 12 juin 1986 (86/278/CE) relative à la protection de l'environnement et notamment des sols, lors de l'utilisation des boues d'épuration en agriculture.

Règlement (CE) no 1069/2009 du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre 2009 établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux et produits dérivés non destinés à la consommation humaine et abrogeant le Règlement (CE) no 1774/2002 (règlement relatif aux sous-produits animaux).

Règlement (UE) no 142/2011 de la Commission du 25 février 2011 portant application du règlement (CE) no 1069/2009 du Parlement européen et du Conseil établissant des règles

sanitaires applicables aux sous-produits animaux et produits dérivés non destinés à la consommation humaine et portant application de la Directive 97/78/CE du Conseil en ce qui concerne certains échantillons et articles exemptés des contrôles vétérinaires effectués aux frontières en vertu de cette directive.

### 1.3. Méthodologie

Cet avis est fondé sur une revue des données disponibles de la littérature scientifique, sur une évaluation de risque ainsi que sur l'opinion d'experts.

## 2. Définitions & Abréviations

WIV-ISP	Institut scientifique de Santé Publique
LNR	Laboratoire national de référence (WIV-ISP pour le diagnostic de <i>Clostridium botulinum</i> en Belgique)
MBA	<i>Mouse bio-assay</i> , test <i>in vivo</i> sur souris pour le diagnostic de laboratoire de <i>Clostridium botulinum</i>
SPA	Sous-produits animaux

**Biométhanisation** : Processus biologique permettant de convertir par digestion anaérobie sous conditions thermiques particulières la matière organique (= intrants) en éléments simples (méthane et dioxyde de carbone principalement). Le résidu de digestion (dont la composition microbiologique est habituellement modifiée par rapport à la composition microbiologique des intrants) est le digestat. Le processus s'inscrit dans les possibilités de traitement pour valorisation des effluents.

**Digestat** : Résidu issu du processus de biométhanisation. Il peut être valorisé en agriculture par épandage sur les terres arables et les prairies pâturées notamment.

**Digestion anaérobie** : Processus de fermentation biologique en conditions anaérobies d'intrants, dans le cadre de la biométhanisation, résultant du traitement thermique. Le processus peut se dérouler en conditions mésophile (30-38°C) ou thermophile (50-60°C). Il en résulte une modification de la flore microbienne et une production de gaz.

**Hygiénisation** : Etape de pasteurisation exigée par le règlement (UE) n° 142/2011 portant application du règlement (CE) n° 1069/2009 dans le cadre de la biométhanisation de sous-produits animaux. Le traitement de référence s'effectue à 70°C durant au minimum une heure. D'autres traitements ou des exceptions sont possibles dans certaines situations (voir ci-dessous le point 3.5).

**Intoxication (botulique)** : Intoxication résultant de l'ingestion de la toxine botulique préformée dans un aliment, dans l'eau de boisson ou dans une matrice protéique (e.g. cadavre d'animal, ensilage d'herbe ou drêches de brasserie).

**Intrants** : Matières rentrant dans le processus de biométhanisation. Les intrants peuvent être des effluents issus de l'élevage des animaux (lisier), des co-produits de l'industrie agro-alimentaire, des déchets végétaux, la fraction organique solide triée des déchets domestiques et boues issues de station d'épuration.

Lisier : Tout excrément et/ou urine d'animaux d'élevage, avec ou sans litière (le terme fumier utilisé dans la demande d'avis s'applique au premier cas) ; synonyme d'« effluent d'élevage ».

Toxico-infection (botulique) : Germination *in vivo* de spores de *Clostridium botulinum* dans la lumière intestinale (« botulisme infantile » et « botulisme intestinal » chez l'homme) ou dans une plaie, suivie de croissance des formes végétatives et de la production de toxines menant à la maladie clinique.

Considérant les discussions menées durant les réunions du groupe de travail du 15 juin 2017 et du 6 juillet 2017 ainsi que lors des séances plénières du 20 octobre 2017 et du 15 décembre 2017,

## le Comité scientifique émet l'avis suivant:

### 3. Introduction

#### 3.1. Contexte de la demande d'avis

En octobre 2016, une forte mortalité de bovins a été constatée dans une exploitation bovine. Sur base des signes cliniques, le botulisme a été suspecté et différents échantillons ont été analysés par l'Institut de Santé Publique (WIV-ISP, LNR pour le diagnostic de *C. botulinum* en Belgique). Les résultats d'un test *in vivo* sur souris (*mouse bioassay*, MBA, test de référence pour le diagnostic du botulisme) ont démontré la présence de toxine de *C. botulinum* toxinogène (toxinotype D) dans différents échantillons (contenu de rumen de bovin, aliment pour bétail, fumier des bovins). La toxine botulique identifiée par les analyses moléculaires (PCR en temps réel sur le gène codant la toxine) était une hybride D-C. D'autres causes étiologiques possibles ont été exclues.

Sur base de la clé de diagnostic proposée dans l'avis 45-2006 du Comité Scientifique (c'est-à-dire (i) anamnèse et signes cliniques en faveur, (ii) identification de toxine botulique, (iii) pas d'identification d'autres causes possibles ; SciCom 2006b), le botulisme pouvait donc être raisonnablement confirmé. L'arrêté royal du 22 mai 2005 mentionne le botulisme comme zoonose bactérienne soumise à l'application du chapitre III de la loi du 24 mars 1987 relative à la santé des animaux, donc à une déclaration obligatoire. Le botulisme apparaît également dans l'arrêté royal du 3 février 2014, désignant les maladies des animaux soumises à l'application du chapitre III de la loi du 24 mars 1987 relative à la santé des animaux et portant règlement de la déclaration obligatoire tant dans les zoonoses bactériennes que spécifiquement chez l'espèce bovine.

L'exploitation possède une unité de biométhanisation équipée de deux digesteurs et d'un post-digester qui fonctionnent avec différents intrants. Le processus de fermentation se déroule via les trois digesteurs en série. La fermentation se poursuit dans le post-digester où le méthane est aussi récupéré. Le temps de séjour des intrants varie de 40 à 75 jours. A la sortie du post-digester, le digestat est hygiénisé (1h à 70°C). Le digestat passe par plusieurs cuves et son refroidissement se termine dans une des cuves de stockage. Du fumier contaminé par *C. botulinum* a été introduit dans l'unité de biométhanisation avant que le botulisme ne fasse l'objet d'un diagnostic. Des échantillons provenant des digesteurs et des cuves de stockage se sont révélés positifs pour la présence de formes végétatives et de spores de *C. botulinum* lorsqu'analysés au WIV-ISP mais négatifs lorsqu'analysés plus tard par deux autres laboratoires de référence en Europe (toutes les analyses ayant été réalisées sur les mêmes échantillons).

Il est demandé au Comité scientifique de se prononcer sur les risques pour la santé animale de la valorisation par épandage de fumiers et de digestats contaminés par *C. botulinum* (toxinotype D).



Plus spécifiquement, différentes questions ont été posées au Comité scientifique :

- Quel est le niveau de contamination naturel d'un fumier issu d'une exploitation saine ?
- Peut-on valoriser des fumiers contaminés directement sur des pâturages ? Le traitement de biométhanisation diminue-t-il ou annule-t-il le risque représenté par un fumier contaminé ?
- Est-il préférable de traiter le fumier contaminé via l'unité de biométhanisation ?
- Combien de temps doit-on considérer que le digestat est potentiellement contaminé par *Clostridium botulinum* ?
- Tenant compte des antagonistes microbiologiques dans les sols et de l'aspect ubiquitaire de *Clostridium botulinum*, l'épandage de digestat contaminé par injection dans les sols de pâturage, avec un délai sanitaire avant pâturage, permet-il de gérer le risque ? Quelle durée pour le délai sanitaire ?
- Quelles solutions alternatives peuvent être envisagées : traitement, autres méthodes d'utilisation ?
- Comment interpréter des résultats discordants entre laboratoires ?

## 3.2. *Clostridium botulinum*

### 3.2.1. Propriétés microbiologiques

*Clostridium botulinum* est une bactérie anaérobie gram-positive sporulante. C'est une bactérie pathogène causant le botulisme, une maladie (intoxication) neuroparalytique rare mais souvent fatale. Les bactéries et leurs spores sont ubiquitaires et peuvent être détectées dans les sols, les boues, les sédiments marins et fluviaux et les végétaux en décomposition. Elles peuvent également être présentes dans le tractus gastro-intestinal des animaux et des humains. Suite à une contamination, *C. botulinum* peut se transmettre dans la chaîne alimentaire, principalement sous la forme de spores. La germination de la spore se produit en conditions anaérobies et le relargage de la toxine se déroule principalement en fin de phase de croissance, coïncidant avec la lyse bactérienne (Siegel *et al.*, 1979).

L'espèce *C. botulinum* est subdivisée en 7 toxinotypes ou types basés sur la spécificité antigénique de la neurotoxine produite : A, B, C, D, E, F et H (le type G a été récemment reclassé comme une espèce différente, *Clostridium argentinense*) (EC, 2006 ; WRAP, 2015).

L'espèce *C. botulinum* est subdivisée en quatre groupes (I, II, III, IV) sur base de ses caractéristiques phylogénétiques et de virulence. Les bactéries des groupes I et II produisent des toxines des types A, B, E et F qui sont associées au botulisme humain. Le type B est le plus répandu en Europe et se traduit par des formes le plus souvent modérées par rapport au type A. Il a également été décrit que des vaches avaient présenté des signes cliniques et pouvaient mourir suite à l'ingestion de toxines de *C. botulinum* type B (Notermans *et al.*, 1979, 1981). Le groupe III comprend les types C et D qui ne sont responsables de cas de botulisme que chez les animaux et pas chez les humains (ACMSF, 2006 ; AFSSA, 2002 ; Lindström *et al.*, 2010 ; SciCom, 2006a). Le groupe IV comprend *Clostridium argentinense*.

### 3.2.2. Résistance environnementale, en particulier à la chaleur

Les spores de *C. botulinum* sont une forme de résistance cellulaire à des conditions environnementales extrêmes, dont la chaleur. Elles survivent très longtemps dans l'environnement et résistent bien à la congélation et à la déshydratation. La toxine botulique est par contre assez rapidement inactivée dans le milieu extérieur et réputée labile à la chaleur (30 minutes à 80°C). Les caractéristiques de survie et de croissance des *C. botulinum* varient en fonction de leur toxinotype et de leur groupe. Une synthèse en est donnée dans le Tableau I en

annexe. Les cellules végétatives de *C. botulinum* sont détruites par le processus de pasteurisation.

### 3.2.3. Pathologie et aspects cliniques chez les animaux, en particulier les ruminants

Chez les bovins, les équins et les petits ruminants, le botulisme est principalement causé par les toxines B, C et D. Dans certaines régions des États-Unis, les équins présentent également des cas de botulisme dus à la toxine A. Le botulisme est rare chez les chiens et les chats. Les porcs sont également moins sensibles au botulisme. La volaille et les oiseaux aquatiques sont principalement sensibles à la toxine C et son hybride C-D. Des cas sporadiques dus aux toxines A et E ont été décrits, respectivement, chez les poulets et les oiseaux aquatiques.

La pathologie peut résulter :

- soit d'une toxi-infection (ingestion de cellules végétatives et/ou spores de *C. botulinum* et production subséquente de toxines, entres autres dans le système digestif de l'hôte infecté) ;
- soit d'une intoxication (ingestion de toxines botuliques préformées présentes dans les aliments, l'eau de boisson ou dans l'environnement en contact direct avec les aliments ou l'eau de boisson).

La toxine botulique exerce son effet pathologique chez l'animal en agissant au niveau de la jonction neuromusculaire où elle inhibe la libération de l'acétylcholine, et provoque une paralysie des nerfs moteurs.

Les intoxications sont les manifestations cliniques les plus fréquentes dans l'espèce bovine (Seyboldt et al., 2015). La période d'incubation dépend entres autres facteurs de la quantité de toxines ingérées et varie pour les bovins entre 18 heures et 16 jours. En règle générale, plusieurs animaux de l'exploitation sont affectés sur une très courte période de temps. Chez les différentes espèces sensibles, les intoxications par les toxines C et D sont caractérisées par une faiblesse musculaire généralisée, une paralysie flasque, ascendante et symétrique des muscles moteurs. Chez les bovins, un premier signe clinique est souvent une démarche mal assurée (traînante au niveau des pattes postérieures) avec une tendance accrue à s'allonger et à se relever avec difficulté. Le tonus de la queue peut être aussi nettement réduit. Il y a perte de poids (paralysie des muscles masticateurs et de la langue). Dans les cas associés à la toxine de type B chez les bovins et les équins, les troubles gastro-intestinaux sont généralement observés au stade initial : déglutition, météorisation, colique, constipation ou diarrhée. Par la suite, une paralysie peut se produire. Des cas présentant des symptômes de paralysie simple sans signes cliniques au niveau du tube digestif sont également observés. La mort survient généralement suite à la paralysie des muscles respiratoires.

Les toxico-infections, dues à la croissance du germe et la production de toxines dans le système digestif (à relier au « botulisme infantile » chez l'homme), ont été décrites chez les volailles. Chez le poulain, on parle du syndrome du "*shaker foal*". Cette affection se caractérise principalement par une faiblesse musculaire et un tremblement musculaire. En outre, la « maladie de l'herbe », chez les chevaux, serait selon certains auteurs à relier à une toxico-infection due à la production de la toxine botulique dans le tractus gastro-intestinal distal, mais cela n'a jamais été clairement démontré. Chez les bovins, on parle de « botulisme viscéral » (Bohnel *et al.*, 2001 ; Krüger *et al.*, 2014b). Il reste largement minoritaire face aux formes cliniques associées à une intoxication et fait l'objet de débat dans la littérature (EC, 2006 ; Popoff, 1989 ; Seyboldt *et al.*, 2015 ; Van Huffel

et al., 2008). Les signes cliniques les plus fréquents sont l'augmentation du taux de mortalité, de la constipation alternant avec de la diarrhée, une fourbure, une ataxie, une démarche raide, de l'apathie, les veines jugulaires gonflées, de l'œdème au niveau des pattes, de la mâchoire et de la mamelle, de la dyspnée.

### 3.2.4. Diagnostic

Les neurotoxines clostridiennes étant des agents extrêmement puissants, un diagnostic rapide est essentiel. Chez l'animal et l'homme, le diagnostic est avant tout clinique (symptomatologie clinique) et celui-ci est confirmé au laboratoire. Le diagnostic en laboratoire s'appuie sur des résultats positifs obtenus pour la détection de neurotoxines botuliques dans un prélèvement clinique (organes, sérum, selles). En complément, la détection de gènes codant pour ces neurotoxines botuliques et/ou l'isolement de clostridies productrices de neurotoxines soutiennent ce diagnostic. Lors de foyers d'intoxications, des investigations poussées sont réalisées afin de retrouver la source de l'intoxication et les analyses décrites ci-dessous sont réalisées en laboratoire.

#### Détection des toxines botuliques

La procédure standard pour la détection des toxines botuliques est le bio-essai sur souris (*mouse bioassay*, MBA). Celui-ci consiste en l'injection intra-péritonéale chez au moins deux souris d'un extrait d'échantillon et/ou d'un surnageant de culture bactérienne. En présence de toxine(s) botulique(s), les souris injectées vont présenter des signes cliniques typiques (hypotonie abdominale, une « taille de guêpe » ou abdomen « levretté » signalant une paralysie des muscles respiratoires, respiration en soufflet, paralysie) qui peuvent entraîner la mort. Ces signes cliniques pouvant ne se manifester qu'après un délai de plusieurs jours, l'observation est réalisée pendant quatre jours. Pour déterminer le type de toxine(s) présente(s), un test de neutralisation est ensuite réalisé à l'aide d'antitoxines spécifiques. L'antitoxine neutralise spécifiquement la toxine présente et permettra ainsi aux souris de survivre, ce qui permet de déterminer le type de toxine en présence. Ceci permet également d'exclure une mort aspécifique survenue chez les souris.

Des méthodes alternatives pour la détection des toxines ont été développées et/ou sont en cours de validation telles que des tests immunologiques. Cependant, ces derniers requièrent l'utilisation d'anticorps de bonne qualité et présentent une plus faible sensibilité, notamment pour les échantillons cliniques.

#### Détection et isolement du germe producteur de toxines botuliques

Les méthodes conventionnelles utilisées pour la détection de *C. botulinum* consistent en l'ensemencement d'un milieu d'enrichissement liquide suivi de la détection des toxines dans le surnageant de culture à l'aide du MBA. La diversité physiologique des groupes de *C. botulinum* complique le diagnostic. Divers milieux non sélectifs peuvent être utilisés, sachant que ceux-ci permettent la croissance d'autres organismes, ainsi que diverses températures d'incubation (de 30°C à 37°C). Une incubation de minimum 5 à 7 jours est recommandée. Une méthode alternative de détection par approche moléculaire est basée sur la détection de l'ADN des gènes codant pour les toxines présentes chez *C. botulinum* neurotoxino-gène, après culture d'enrichissement en milieu liquide. Ces méthodes ne peuvent donc ni détecter les toxines ni en démontrer l'activité, mais elles ont l'avantage d'être rapides et d'éviter l'utilisation d'animaux de laboratoire.

### 3.3. Processus de biométhanisation

La (bio)méthanisation est un processus biologique naturel qui permet de convertir la matière organique (biomasse = glucides, lipides, protéines) en éléments simples (CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S, H<sub>2</sub>) grâce à l'action de bactéries anaérobies. Cette digestion anaérobie, processus biologique

complexe, peut être décrite en quatre phases de dégradation : l'hydrolyse, l'acidogénèse, l'acétogénèse et la méthanogénèse. Chaque phase fait intervenir des groupes de bactéries et/ou d'archées particuliers. Toutes les molécules qui ne seront pas dégradées par cette voie pour produire du biogaz (lignine par exemple) et les déchets de ces réactions anaérobies composeront le digestat. Le processus se déroule dans des digesteurs disposés en série, au sein desquels les conditions de température et de pH et d'autres paramètres doivent être parfaitement maîtrisés afin d'assurer un rendement optimal. La biométhanisation produit donc de l'énergie sous forme de gaz en valorisant les sous-produits des productions végétales et animales, des industries agro-alimentaires ou des collectivités. Son sous-produit, le digestat, peut lui-même être valorisé en agriculture pour la fertilisation des sols. C'est un fertilisant à haute valeur agronomique en raison de la biodisponibilité accrue des nutriments combinés à une matrice organique qui assure une excellente rétention des éléments nutritifs dans le sol et une protection de la qualité des eaux souterraines.

### 3.4. Dangers sanitaires potentiels identifiés pour le processus de biométhanisation et données concernant *C. botulinum*

Les dangers biologiques potentiels liés au processus de biométhanisation sont liés à l'origine des intrants qui y sont utilisés. Les microorganismes pathogènes résidant dans le tube digestif constituent des dangers potentiels lors de la valorisation des fumiers par épandage direct ou de leur valorisation à travers le processus de biométhanisation: *Salmonella* spp., pathotypes d'*Escherichia coli*, autres *Enterobacteriaceae* (dont celles productrices de bêta-lactamases à spectre élargi), *Listeria* spp., *Campylobacter* spp., certains *Clostridium* et *Bacillus*, *Coxiella burnetii*, *Staphylococcus* spp. (dont ceux résistants à la méthicilline), *Yersinia* spp., virus de l'hépatite E, *Coccidia* spp., *Cryptosporidium parvum*, *Giardia* spp., *Ascaris* spp. et *Trichostrangylidae* spp.

S'il a été établi que le processus de biométhanisation avait un effet majeur d'hygiénisation sur les bactéries non sporulantes (e.g. *E. coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria* spp. ou *Yersinia* spp.), cet effet est moindre et beaucoup moins bien caractérisé quantitativement sur les spores bactériennes (i.e. *Bacillus*, spp., *Clostridium* spp.) ainsi que sur certains virus (Bagge 2009 ; EC, 2001 ; RIVM, 2014 ; Sahlström, 2006). Des études récentes et contradictoires indiquent soit un effet hygiénisateur sur la plupart des clostridies pathogènes, surtout dans le cas des réacteurs de biométhanisation en conditions thermophiles et exception faite pour *Clostridium difficile* qui montre une résistance confirmée au processus (Fröschle *et al.*, 2015), soit au contraire un accroissement du risque comparé à des effluents animaux non-digérés (Neuhaus *et al.*, 2015). Cependant, dans ce dernier cas, un biais de méthodologie a pu faciliter la détection de *C. botulinum* dans les digestats par rapport à sa détection dans les lisiers : l'échantillon de digestat a été préalablement enrichi par rapport à l'échantillon de lisier).

### 3.5. Aspects législatifs liés aux lisiers (fumiers) et aux digestats

Le règlement (CE) n° 1069/2009 et le règlement (UE) n° 142/2011 (règlements relatifs aux sous-produits animaux, SPA), fixent les règles en matière de valorisation des lisiers bruts ou transformés. Ces règlements sont également d'application pour les unités de biométhanisation qui transforment du lisier ou d'autres sous-produits animaux.

#### Lisier

Dans les règlements relatifs aux SPA, le lisier est défini comme « tout excrément et/ou urine d'animaux d'élevage autres que les poissons, avec ou sans litière ». Il est classé comme matière de catégorie 2 (Règlement (CE) n° 1069/2009). Le lisier tombe sous la définition d'« engrais organiques et amendements » du règlement (CE) n° 1069/2009. La particularité du lisier par

rapport aux autres engrais organiques et amendements à base d'autres sous-produits animaux, est qu'il fait l'objet de toute une série d'exemptions vis-à-vis des règles de transformation et d'utilisation. Le lisier peut être utilisé pour la fabrication d'engrais organiques ou d'amendements. Il peut être converti en compost ou en biogaz avec ou sans transformation préalable. Il peut être utilisé dans les sols sans transformation préalable et sans délai sanitaire avant pâturage ou récolte du fourrage. Dans ce cas, le lisier est considéré comme « non transformé ».

Le lisier peut être échangé entre exploitations agricoles via un système simplifié. Entre Etats-membres le lisier doit être « transformé » (hygiénisé) pour pouvoir être échangé sauf sous certaines conditions particulières entre Etats-membres voisins.

Pour qu'il soit considéré comme « transformé », le lisier doit subir un traitement de minimum 1 heure à 70°C (hygiénisation). Il pourra ensuite être échangé. Les Etats-membres (en Belgique : la compétence relève des Régions) peuvent valider des méthodes alternatives de transformation. Dans ce cas, le lisier transformé doit respecter certains critères et notamment des critères bactériologiques.

#### Digestats de biométhanisation

Globalement, le digestat qui contient des sous-produits animaux doit respecter les règles précisées dans le règlement (UE) n° 142/2011 portant application du règlement (CE) n°1069/2009 : d'une part, une taille maximale de particule de 12 mm à l'entrée de l'unité et, d'autre part, un traitement à 70°C pendant 1 heure de l'intrant ou du digestat. Seuls des sous-produits de catégorie 2 (lisier) ou de catégorie 3 (déchets de cuisines, œufs sains, lait cru sain) peuvent être utilisés comme intrant. Le digestat peut aussi contenir des intrants végétaux. Sauf exception, un délai sanitaire de 21 jours est d'application entre l'épandage du digestat et le pâturage ou la récolte du fourrage.

Les Etats-membres (en Belgique : les Régions) peuvent aussi valider des méthodes alternatives de transformation ou, selon les intrants (lisier, lait, déchets de cuisine), appliquer d'autres exigences spécifiques.

## 4. Evaluation du risque

### 4.1. Modèle de voie du risque

Sur base des différents éléments à prendre en compte pour l'évaluation du risque, un modèle de voie du risque<sup>1</sup> (SciCom, 2017) a été constitué (Fig. 1 en annexe).

---

<sup>1</sup> Le modèle de voies du risque est un outil structurant le processus et facilitant les échanges entre les experts en vue de mieux comprendre le problème, d'identifier les paramètres à prendre en compte ainsi que les informations et les données requises, d'organiser efficacement l'approche pour répondre aux questions de la demande, de formuler des hypothèses, etc. Il utilise les éléments identifiés au stade du processus de préparation de l'évaluation du risque. Le modèle de voies du risque donne une description et/ou une représentation schématique des relations connues ou suspectées entre les différents éléments identifiés, suivant les scénarios définis ou jugés pertinents. Dans le cadre de ce dossier, le danger constitué par les formes végétatives de *C. botulinum*, leurs spores et la présence de toxines botuliques a été intégré depuis leur émission par des bovins infectés jusqu'à une nouvelle ingestion par des bovins sains selon deux scénarios.

## 4.2. Identification du danger

Le botulisme est une maladie du système nerveux, commune à l'homme et aux animaux, due à l'action de la toxine botulique produite par *C. botulinum*. La toxine botulique est le poison le plus puissant connu à ce jour : la dose minimale létale pour la souris est de 0,0003 µg/kg (Popoff, 1989) et le bovin pourrait être jusqu'à 13 fois plus sensible que la souris (données pour la toxine C ; WRAP, 2015). Différents toxinotypes sont décrits (A à H) avec des sensibilités particulières d'hôte. Chez les bovins atteints de botulisme, les toxinotypes C et D et leurs chimères D-C et C-D sont les plus fréquents. Ils ne sont quasiment jamais identifiés dans des cas humains (ACMSF, 2006 ; AFSSA 2002 ; Lindström *et al.*, 2010 ; SciCom 2006a).

*Clostridium botulinum* est une bactérie sporulante dont les spores peuvent être présentes dans les matières fécales des animaux.

Dans le système agricole actuel, deux types de valorisation des fumiers animaux peuvent constituer un danger pour les bovins, animaux sensibles aux toxinotypes B, C et D de *C. botulinum* :

- l'épandage du fumier bovin brut contaminé sur les pâtures (ou de façon indirecte via cet épandage sur des terres situées à proximité des zones de pâturage) ;
- l'épandage de digestats, sous-produits résultant du processus de biométhanisation obtenus à partir de fumiers bovins contaminés.

## 4.3. Caractérisation du danger

### 4.3.1. Appréciation de l'émission

L'émission a été définie par le Comité scientifique comme la probabilité de retrouver *C. botulinum* (sous forme végétative ou sporulée) ou sa toxine dans le fumier ou le digestat.

Pour le fumier, l'étude de l'émission, doit prendre en compte les données de littérature suivantes :

- Plusieurs auteurs mentionnent la détection de *C. botulinum* (bactéries et/ou toxine botulique) dans le fumier (Bagge *et al.*, 2010 ; Dohrmann *et al.*, 2015 ; Neuhaus *et al.*, 2015) tandis que d'autres ne les ont pas détectés (Fröschle *et al.*, 2015). Ainsi, dans une étude réalisée au sein de fermes avec suspicion de botulisme, la toxine était présente dans 16,7% des fumiers liquides (n=24) et des spores dans 16,8% (Neuhaus *et al.*, 2015). Dans une autre étude réalisée dans une exploitation appliquant la biométhanisation (Dohrmann *et al.*, 2015), les 4 groupes phylogénétiques de *C. botulinum* (groupes I, II III et IV) ont été détectés au niveau des substrats/intrants (ensilages et fumiers), mais avec une occurrence assez faible (particulièrement pour le fumier). Diverses toxines pouvaient être potentiellement présentes (présence des 4 groupes phylogénétiques en détection moléculaire) mais leur toxicité n'a cependant pas pu être prouvée (analyses réalisées sur une sélection de 3 échantillons).
- Les ruminants infectés par *C. botulinum* rejettent ces bactéries (sous forme de spores et/ou de formes végétatives) dans leurs matières fécales à des concentrations parfois non négligeables (Notermans *et al.*, 1978). Le LNR pour le diagnostic de *C. botulinum* a déjà détecté à plusieurs reprises des fumiers positifs pour la toxine botulique et le germe lors de foyers d'intoxication de botulisme bovin. L'excrétion peut être assez longue, jusqu'à 8 semaines après arrêt de l'apport d'aliments contaminés aux animaux (Notermans *et al.*,

1981) et des nombres notables de bactéries ont été retrouvés au niveau des selles ( $10^5$ /kg de selles).

- Cependant, des spores de *C. botulinum* toxinotype B ont aussi été détectées dans des échantillons fécaux prélevés chez le bétail sain (Lindström *et al.*, 2010).

Pour le digestat, l'étude de l'émission doit prendre en compte les données de littérature suivantes :

- L'impact de la digestion anaérobie semble néfaste au développement de *C. botulinum* (Fröschle *et al.*, 2015). Cette étude a été réalisée avec une souche du groupe II, dont les spores sont les plus thermosensibles. La compétition avec d'autres bactéries présentes dans les matières organiques est également un facteur essentiel pour la croissance de *C. botulinum* qui semble défavorisée par rapport aux autres bactéries (Krüger *et al.* 2013a, 2013b ; Rodgers *et al.* 2003 ; Shehata *et al.* 2013 ; Sullivan *et al.* 1988) ;
- Le procédé d'hygiénisation à 70°C ne permet pas la destruction totale des spores de *C. botulinum* éventuellement présentes dans les matières organiques servant d'intrants pour les unités de biométhanisation (Bagge *et al.*, 2005, 2010 ; Neuhaus *et al.*, 2015) ;
- Les concentrations en spores retrouvées au niveau des digestats ne sont pas plus élevées que celles retrouvées dans les fumiers (WRAP, 2015).

#### 4.3.2. **Appréciation de l'exposition**

L'exposition a été définie par le Comité scientifique comme la probabilité qu'un bovin ou un groupe de bovins soi(en)t exposé(s) à une quantité suffisante de toxines pour causer une maladie clinique.

Pour le fumier, l'étude de l'exposition doit prendre en compte les données de littérature suivantes :

- La résistance des spores dans le fumier et/ou l'environnement (Notermans *et al.*, 1981).
- La stabilité de la toxine botulique à des pH de 3,5 à 6,8 et sa sensibilité à la lumière.
- La compétition dans les microbiotes environnemental et intestinal (Krüger *et al.*, 2014a).
- La rareté des carences en phosphore chez les animaux dans nos élevages, ce qui limite les comportements de « pica » (comportement alimentaire déviant dû à des carences en minéraux) sur les cadavres parfois observés chez les bovins. En Belgique, les bovins sont de plus très peu exposés aux cadavres de leurs congénères.
- Le fait qu'une augmentation d'un facteur 1000 de la densité des spores au niveau environnemental n'ait pas induit d'augmentation parallèle de l'incidence des cas de botulisme chez des bovins exposés (Notermans *et al.*, 1981) ;
- L'incapacité de *C. botulinum* toxinotype D à utiliser les protéines végétales pour sa croissance, et le fait que les ensilages d'herbe contaminés ne constituent donc pas un milieu favorable pour sa croissance en l'absence d'autre sources protéiques (comme les cadavres).

- Le haut facteur de dilution environnementale lors de l'épandage même en cas de fortes concentrations en spores dans les fèces d'un ou plusieurs bovins infectés.

Pour le digestat, les données de littérature à prendre en compte pour l'exposition sont similaires à celles mentionnées pour le fumier.

#### 4.3.3. *Appréciation des conséquences*

Les conséquences pour la santé humaine n'ont pas été considérées étant donné que *C. botulinum* toxinotype D n'a jamais été associé à des cas humains de botulisme (ACMSF, 2006 ; AFSSA, 2002 ; Lindström *et al.*, 2010 ; SciCom, 2006a). Il a également été démontré, qu'*in vitro*, les cellules neuronales humaines présentent une sensibilité moindre à la toxine D qu'aux autres types de toxines (Pellett *et al.*, 2015).

Les conséquences pour la santé animale (production animale) font intervenir trois composantes :

- Les conséquences économiques de la survenue d'un ou plusieurs cas de botulisme dans une exploitation ;
- la capacité à la diffusion géographique après la survenue de ce(s) cas ;
- les conséquences économiques à l'échelle d'une région ou d'un pays.

De l'avis du Comité scientifique, ces conséquences se manifestent essentiellement pour l'exploitation dans laquelle sévissent les cas cliniques de botulisme compte tenu du haut taux de mortalité des animaux infectés et de l'interdiction de commercialisation du lait de ces animaux.

#### 4.3.4. *Estimation du risque*

Les données d'émission, d'exposition et des conséquences ont été introduites dans le modèle de voies du risque de la Fig. 1 pour en identifier les plus importantes (Fig. 2 en annexe). Il en ressort que la voie de risque principale associée à l'épandage de fumier ou d'un digestat contaminé par *C. botulinum* toxinotype D est liée à une augmentation de la concentration en spores dans l'environnement des bovins. Celle-ci mène à une augmentation du risque d'intoxication (absorption de toxines préformées) qui serait lié à l'ingestion par les bovins de cadavres d'animaux qui auraient eux-mêmes été contaminés (dans l'environnement) par des spores et qui leur auraient fourni les conditions adéquates pour leur germination et la production subséquente de toxine botulique. Sur base des appréciations de l'émission (nulle à très faible) et de l'exposition (très faible), la probabilité de survenue a été jugée comme étant « très faible ». Les conséquences, limitées pour la santé animale à la seule exploitation concernée par un foyer, ont été appréciées comme « marginales ». Le risque a donc été qualitativement estimé par le Comité scientifique comme « très faible » (voir aussi la figure 2 du document lignes directrices du SciCom ; SciCom, 2017) dans les deux scénarios envisagés (épandage de fumier ou de digestat).

Bien que les cas de terrain soient potentiellement sous-diagnostiqués et/ou sous-rapportés, les chiffres des taux d'incidence montrent que les cas de botulisme clinique chez les bovins restent rares, malgré l'utilisation intensive des fumiers et des digestats pour la fertilisation des sols agricoles ou des pâtures. Ainsi, les taux d'incidence maximaux des suspicions de cas de botulisme bovin en Angleterre et au Pays de Galles, rapportés aux populations bovines d'Angleterre (environ 5,5 millions de têtes) et du Pays de Galles (environ 250.000 têtes), étaient de l'ordre de  $1,8 \times 10^{-5}$  suspicion/an (103 suspicions enregistrées) et de  $1,35 \times 10^{-5}$  suspicion/an (78 suspicions enregistrées), en 2003 et 2004, respectivement (ACMSF, 2006). L'hypothèse d'une association avec l'épandage de fumier de volaille contenant encore parfois des cadavres



de volailles a prévalu, tout comme cela a pu être constaté en France, en Irlande du Nord et aux Pays-Bas (Payne *et al.*, 2011 ; Souillard *et al.*, 2015). Les mesures de gestion du risque visant à éviter l'épandage de fumier de volaille sur des terres pâturées par des bovins ainsi que son utilisation comme litière pour les bovins ont permis de revenir à des chiffres d'incidence plus faibles (ACMSF, 2006 ; WRAP, 2015). Si l'on se réfère aux cas de botulisme bovin notifiés à l'AFSCA (Tableau II en annexe), on obtient des taux d'incidence d'un niveau similaire ou dix fois inférieur selon l'année considérée. De l'avis du Comité scientifique, l'évitement de l'utilisation de fumier de volaille pouvant être contaminés par des carcasses et une bonne gestion des ensilages à distribuer aux bovins de façon à ce qu'ils ne soient pas contaminés par des cadavres d'animaux peuvent permettre de limiter les risques associés au botulisme chez les bovins.

## 5. Réponses aux questions spécifiques

### - Quel est le niveau de contamination naturel en *C. botulinum* toxinotype D d'un fumier issu d'une exploitation saine ?

Selon l'arbre de décision diagnostique de l'avis 45-2006, une exploitation saine a été considérée par le Comité scientifique comme une exploitation dans laquelle aucun cas clinique de botulisme classique (expression clinique de type « paralysie flasque ascendante ») n'est constaté.

Les différentes données de littérature montrent un niveau de contamination variable (nul à extrêmement faible) et saisonnier des fumiers de bovins dans les exploitations saines ou via les méthodes de détection appliquées aux intrants des unités de biométhanisation (Bagge *et al.*, 2005, 2010 ; Fohler *et al.*, 2016 ; Fröschle *et al.*, 2015 ; Neuhaus *et al.*, 2015 ; Souillard *et al.*, 2015). La diversité des échantillonnages et des méthodes de détection utilisées dans les différentes publications ne permet cependant pas de déterminer avec précision un intervalle précis et fiable. Au niveau de l'origine du danger, le Comité scientifique rappelle que les formes végétatives et les spores de *C. botulinum* sont également naturellement présentes dans les sols, l'eau, les sédiments des lacs et des rivières et la végétation, c.-à-d. à partir de l'environnement des bovins.

De l'avis du Comité scientifique, *C. botulinum* (sous forme sporulée) doit être considéré comme un passager de la flore digestive bovine. Il ne s'y établira éventuellement (germination et multiplication) qu'en cas de dysbactériose de cause alimentaire, pathologique ou iatrogène (antibiothérapie) (Fohler *et al.*, 2016).

### - Peut-on valoriser des fumiers contaminés par *C. botulinum* toxinotype D directement sur des pâturages ?

Pour sa réponse le Comité scientifique a tenu compte des données de littérature suivantes :

- *C. botulinum* toxinotype D n'utilise pas les substrats végétaux pour sa croissance (seuls les toxinotypes A et B sont capables de produire des toxines à partir d'une matrice végétale comme l'ensilage d'herbe (Notermans *et al.*, 1979)).
- Les formes cliniques de botulisme chez les bovins sont liées majoritairement aux intoxications (Lindström *et al.*, 2010) et les cas dits de « botulisme viscéral » semblent rares chez les bovins (Seyboldt *et al.*, 2015). Le risque engendré par l'absorption directe de spores est donc faible.

- Dans les foyers de botulisme, même en cas de forte mortalité, des cas secondaires (e.g. non liés à l'absorption directe de la toxine préformée) ne sont que très rarement observés. Ainsi, dans un cas récent de botulisme aviaire dû à *C. botulinum* toxinotype C-D, aucune mortalité secondaire de volailles n'a été constatée dans l'exploitation bien qu'une forte contamination environnementale par des spores de *C. botulinum* ait été démontrée plus de cinq mois après l'incident (Souillard *et al.*, 2017). Le suivi d'exploitations bovines proches de foyers de botulisme aviaire a permis la détection de différents toxinotypes dans l'environnement des bovins ou même chez des animaux (toxinotypes C, D, C-D, D-C et E) mais sans que des cas cliniques ne se déclarent et sans que le lien épidémiologique avec les souches circulant dans les exploitations aviaires ne puisse être clairement établi (Souillard *et al.*, 2015). Le suivi de l'environnement et des bovins proches d'un foyer de botulisme bovin a permis la détection de spores tout au long de la période (plus d'un an), tant dans les ensilages d'herbe que dans les fèces des animaux mais sans que des cas cliniques ne se déclarent chez les animaux (Notermans *et al.*, 1981).

Sur base de ces différents éléments le Comité scientifique conclut que l'épandage de fumiers bovins contaminés présente le risque d'accroître la concentration environnementale en spores de *C. botulinum* toxinotype D (le niveau initial de cette contamination environnementale étant peu documenté, voir section 6 ci-dessous). Cependant, cette pratique ne constitue pas un risque direct d'intoxication, c.-à-d. d'ingestion de toxine préformée. Pour qu'un risque pour la santé animale existe, il faudrait que les spores soient ingérées par des animaux (rongeurs, oiseaux, etc.) qui produiraient, à leur mort, les conditions propices à la germination de *C. botulinum* et une source potentielle de toxines botuliques. Les bovins pourraient alors absorber les toxines via leur alimentation ou leur abreuvement contaminés par ces cadavres.

Cependant, étant donné la très faible dose nécessaire pour une intoxication par la toxine botulique et afin de limiter la contamination environnementale, le Comité scientifique ne recommande pas l'épandage sans un traitement préalable (e.g. par biométhanisation ou un autre traitement alternatif) de fumier venant d'une exploitation où des cas de botulisme clinique sont confirmés par diagnostic de laboratoire. Un délai de 21 jours suivant le dernier cas clinique observé est proposé, ce laps de temps correspondant à la période pré-patente maximale observée dans les cas rapportés au Royaume-Uni (ACFMS, 2006). Les recommandations habituelles relatives à la production, à la gestion et à la distribution des ensilages en ferme devraient permettre de limiter les risques.

- Le traitement de biométhanisation diminue-t-il ou annule-t-il le risque représenté par un fumier contaminé ?

Pour sa réponse le Comité scientifique a tenu compte des données de littérature suivantes :

- Les paramètres du traitement d'hygiénisation (1 heure à 70°C) qui est requis ne sont pas suffisants pour éliminer les spores de *C. botulinum* (avis 23-2015 du Comité scientifique).
- Une étude exhaustive récente sur les valeurs logarithmiques D relatives à des souches non-protéolytiques du groupe II de *C. botulinum* (types B, E et F), réputées plus sensibles à la température que les souches du groupe III (C et D), montre que les températures atteintes en thermophilie ne sont théoriquement pas suffisantes pour éliminer toutes les spores de *C. botulinum* (Wachnicka *et al.*, 2016). En outre, il est à noter qu'il existe une certaine variabilité dans la résistance entre les souches au sein-même du groupe III (Anses, 2011).

- La bibliographie présente des résultats variables concernant l'effet de l'entièreté du processus de biométhanisation sur la réduction des spores de *C. botulinum* (d'une réduction partielle à totale). Cette réduction est dépendante de la température : la réduction (exprimée par la valeur logarithmique D (ç.-à-d. le temps de réduction décimale) à une température donnée) est assez logiquement plus importante pour les processus thermophiliques mais est également dépendante de la souche. Fröschle *et al.* (2015) ont évalué la réduction logarithmique D pour une souche de groupe II pour un mélange de cellules végétatives et de spores. Cette valeur était respectivement de 34,6 +/- 11,2 j (donc une réduction de 97,7% ± 2,2 de la charge initiale après 63 jours) en conditions mésophiliques (38 °C). En conditions thermophiliques (55 °C), la valeur de réduction D était de 1 ± 0,2 j (une réduction non log-linéaire d'environ 99,9 % de la charge initiale après 3 jours).
- En Belgique, la plupart des unités de biométhanisation utilisent une méthode mésophile pour la digestion anaérobie. Le temps de séjour des intrants varie de 40 à 75 jours (communication personnelle de A. Generet et P. Delfosse).
- La toxine botulique seule peut être relativement résistante à la température (Tableau I en annexe) mais est très sensible aux variations de pH (Rasooly *et al.*, 2010 ; Sugii *et al.*, 1977) et à l'action de protéases -dépendantes de la température. Ainsi, pour *C. botulinum* toxinotype A, même si l'expression des gènes de toxinogénèse est comparable à 37°C et 44°C, la toxicité résiduelle (analysée par MBA) des toxines est moindre pour une incubation de 24h à 44°C. Cela étant lié à l'action de protéases dont les gènes d'expression sont stimulés à cette température (Couesnon *et al.*, 2006)<sup>2</sup>. De plus, il a été suggéré que les quantités ingérées devaient être considérablement plus importantes (facteur 10<sup>6</sup>) que celles injectées par voie intra-péritonéales pour résister au pH de l'estomac et aux systèmes de défense de l'intestin (Rasooly *et al.*, 2010).

Le Comité scientifique conclut sur base de ces différents éléments que :

- la toxine botulique ne résiste pas au processus de biométhanisation (acidogénèse, température, complexité du microbiote) et que le risque d'intoxication directe des bovins via la valorisation du digestat est donc nul ;
- par contre, la réduction du nombre de spores opérée durant le processus de biométhanisation ne peut être considérée comme totale. Compte tenu du temps de séjour moyen des intrants dans les digesteurs, le processus permet néanmoins de réduire la charge initiale sous réserve que des conditions propices à la germination puis à une nouvelle sporulation ne soient favorisées. Ces conditions peuvent être retrouvées par exemple dans le cas d'une hygiénisation qui aurait lieu en post-digestion (stimulation de la sporulation de *C. botulinum* puis de sa germination en conditions dans lesquelles il y aurait moins d'autres microorganismes compétiteurs). Il est donc conseillé de réaliser l'hygiénisation avant la digestion anaérobie.

---

<sup>2</sup> Il est à noter que cette relation température-toxicité résiduelle de la toxine botulique n'a pas été retrouvée pour *C. botulinum* toxinotype E. Cependant, cette souche présente une architecture génomique de son gène de toxinogénèse très différente de celle des autres toxinotypes (Couesnon *et al.*, 2006) et la bactérie est amenée à se développer dans un environnement plus froid.

- Est-il préférable de traiter le fumier contaminé par *C. botulinum* toxinotype D via l'unité de biométhanisation ?

Compte tenu des éléments de littérature précédemment mentionnés, le Comité scientifique répond qu'il est préférable de traiter le fumier contaminé par *C. botulinum* toxinotype D via l'unité de biométhanisation dans le cas d'un foyer de botulisme bovin disposant localement d'une unité de biométhanisation. Dans le cas où le foyer n'en dispose pas, compte tenu de la résistance des spores, le Comité scientifique recommande de ne pas transporter le fumier contaminé vers une autre unité de biométhanisation afin de ne pas contaminer celle-ci ou son environnement. Le fumier devra donc être traité par une méthode alternative (voir ci-dessous).

- Combien de temps doit-on considérer que le digestat est potentiellement contaminé par *C. botulinum* toxinotype D ?

Considérant le niveau de thermostabilité connu des spores de *C. botulinum* en conditions expérimentales et les incertitudes quant à la durée de vie d'une spore dans les conditions observées dans l'environnement, aucune réponse claire ne peut être formulée. Idéalement, le suivi quantitatif d'un indicateur de survie des bactéries sporulantes devrait être réalisé sur le substrat (fumier) à l'entrée du processus et sur le sous-produit en sortie de processus. Considérant la toxine : comme précédemment mentionné, elle ne résistera pas au traitement de biométhanisation.

- Tenant compte des antagonistes microbiologiques dans les sols et de l'aspect ubiquitaire de *C. botulinum*, l'épandage de digestat contaminé par injection dans les sols de pâturage, avec un délai sanitaire avant pâturage, permet-il de gérer le risque ? Quelle durée pour le délai sanitaire ?

L'injection dans les sols de substrats contaminés par des spores de *C. botulinum* limite les possibilités de propagation indirecte (via le vent, les insectes ou les animaux) à d'autres prairies ainsi que l'exposition des animaux pâturant et de la faune sauvage. Elle facilite également la mise en compétition avec la flore bactérienne d'origine tellurique limitant les possibilités de croissance de *C. botulinum* qui est un organisme compétitivement plus faible. Cependant cette pratique peut augmenter le risque de transfert aux nappes phréatiques. De plus, il réside une incertitude sur le temps de survie des spores de *C. botulinum* dans les sols. Idéalement, les digestats seront épandus via une méthode par patins dispersant ces digestats dans des sillons légèrement creusés dans le sol ou par des tuyaux trainés qui assurent un contact rapide avec le sol et limitant les souillures des végétaux. Le délai sanitaire actuellement préconisé, sur une base empirique, est d'attendre au minimum trois semaines entre l'épandage sur une prairie d'un fumier non-contaminé et le pâturage de cette prairie. Un délai strictement égal ou supérieur à trois semaines peut être proposé pour les digestats contaminés, avec un épandage au début du printemps tenant compte des saisons de pâturage des bovins en Belgique. Le Comité scientifique recommande de n'épandre les digestats contaminés que sur des sols destinés aux cultures.

- Quelles solutions alternatives peuvent être envisagées : traitement, autres méthodes d'utilisation ?

Différentes solutions pour le traitement d'un fumier ou d'un digestat contaminé par *C. botulinum* ont été examinées par le Comité scientifique. L'évaluation de ces différents traitements se heurte aux considérations pratiques (la quantité de matières à traiter s'élève à des centaines de tonnes), économiques, de faisabilité technique ou des possibilités de maîtrise des paramètres et de l'efficacité. A partir de cette analyse, le Comité scientifique recommande le traitement chimique

par chaulage à la chaux vive (oxyde de calcium, CaO) du fumier résiduel (et si besoin également du digestat contaminé).

Les différentes possibilités analysées ont été :

- Le traitement chimique par acidification ou alcalinisation ;
- L'incinération (peu réaliste pour des biomasses contenant de 70 à 90% d'eau) ;
- La Tyndallisation: chauffage discontinu à basse température par lequel on ne chauffe que quelques minutes (environ une trentaine) toutes les 24 heures, en ne dépassant pas 60 °C ; le chauffage suffit à éliminer les formes végétatives, et provoque un choc thermique, qui est un facteur déclenchant de la germination des spores, et donne ainsi des formes végétatives; les intervalles laissés entre les chauffages permettent donc aux spores de donner lieu à des cellules végétatives, qui sont éliminées lors de l'augmentation de température suivante. Cependant, ce processus est difficilement maîtrisable lorsqu'il doit être appliqué à des centaines voire des milliers de tonnes d'effluents animaux ;
- L'*electrocracking* (utilisation d'un courant électrique passant à l'intérieur du substrat ; il y a de fortes incertitudes sur l'efficacité sur les spores) ;
- Le séchage : celui-ci peut être réalisé à l'aide de la chaleur produite lors de la génération d'électricité à partir du biogaz (70 à 80°C). Le produit est stabilisé via une diminution de l'activité de l'eau ( $A_w < 0,85$ ). Plusieurs systèmes de séchage sont disponibles. Le séchage est suivi d'une granulation pour faciliter l'épandage. La température de la matière atteinte durant le processus n'est pas connue mais ne seraient pas suffisantes pour assurer que toutes les spores soient inactivées ;
- L'hygiénisation selon les exigences européennes (chaleur humide à 70°C pendant 1 h au moins) pour éliminer les formes végétatives avant l'introduction des masses traitées dans un processus de digestion anaérobie en activité afin d'éviter le stockage des digestats hygiénisés dans des cuves où toute compétition microbienne aurait été supprimée par ce traitement). Les paramètres d'hygiénisation ne permettent pas d'éliminer les spores de *C. botulinum* ;
- L'irradiation, méthode pour laquelle il faudrait disposer d'unités mobiles et adaptées à de larges quantités d'effluents animaux.

- Comment interpréter des résultats discordants entre laboratoires ?

Pour sa réponse le Comité scientifique a tenu compte des données suivantes :

- Les analyses discordantes ont été réalisées sur les mêmes échantillons ;
- Le diagnostic de *C. botulinum* passe par une identification des formes végétatives, des spores et/ou de la toxine botulique. Différentes méthodes d'analyses existent : MBA, PCR classique ou en temps réel visant un motif du génome de la bactérie et/ou du gène de toxinogénèse ou encore ELISA. Le MBA reste encore à l'heure actuelle la technique de référence et est considérée comme la plus sensible. Or les données de littérature pour ce test montrent une meilleure spécificité (proportion moindre de faux positifs) face à la sensibilité (proportion moindre de faux négatifs), cette dernière n'atteignant parfois qu'environ 30% lors de l'analyse d'échantillons de terrain dans l'espèce équine (Johnson *et al.*, 2016) ;
- Les analyses qui sont réalisées au LNR sont qualitatives et ne permettent donc pas la quantification de la charge infectieuse présente. Le MBA réalisé directement au départ de l'échantillon ou après enrichissement permet tout au plus de déterminer si la charge

en agent infectieux (spores ou toxine préformée) est faible ou élevée. La dose toxique pour la toxine botulique est la plus faible actuellement connue (l'espèce bovine y est de plus particulièrement sensible) et la charge en spores des échantillons est souvent extrêmement faible (ce qui nécessite d'ailleurs un enrichissement) ;

- Si le MBA reste la technique de référence, les conditions de sa réalisation (comme par exemple les milieux d'enrichissement et/ou les temps d'incubation utilisés, la lignée de souris utilisée) peuvent différer entre les laboratoires (tout comme peuvent varier les conditions des autres types de tests qui peuvent y être réalisés). Les conditions optimales sont -dépendantes du toxinotype. De plus, si à l'ISP-WIV, une recherche en parallèle des spores et de la toxine est systématiquement réalisée, certains laboratoires ne réalisent que l'une ou l'autre en fonction des termes de la demande de diagnostic qui leur est soumise ;
- La toxine est beaucoup moins résistante au cours du temps que ne le sont les spores et que donc toute technique de diagnostic qui ne se focaliserait que sur le diagnostic de la toxine risquerait de rendre un résultat faussement négatif.

De l'avis du Comité scientifique, des résultats discordants peuvent être dus à des différences de sensibilité relative dans les tests utilisés dans les différents laboratoires. Un résultat négatif obtenu dans le cadre du diagnostic de *C. botulinum* ne permet pas d'exclure avec certitude sa présence.

## 6. Incertitudes

Différentes incertitudes doivent être prises en compte dans cet avis.

### Incertitudes de dose infectieuse en cas de toxico-infection (relation dose réponse, variabilité d'hôte, facteurs d'hôte)

La toxine botulique est la plus puissante connue à l'heure actuelle. Chez le bovin, dans le cas d'une toxico-infection, le nombre minimal de spores nécessaires à la production d'une dose létale de toxine botulique lors de leur germination n'est pas connue. Chez l'homme la toxinogénèse a été mise en relation avec une concentration de  $10^5$ - $10^6$  unités formant colonie (ufc) de *C. botulinum* toxinotypes A et B par gramme de denrée alimentaire (bien qu'une dose d'inoculation de  $5 \times 10^2$  spores a été suffisante pour induire celle-ci) (Daifas *et al.*, 1999).

La toxinogénèse dans le groupe III de l'espèce *Clostridium botulinum* est gouvernée par l'action des bactériophages sur ces bactéries ; c'est le processus dit « de conversion lysogénique » (Pellett *et al.*, 2015; Sakaguchi *et al.*, 2015). Il reste de nombreuses lacunes à combler dans la compréhension du mécanisme et des facteurs spécifiques d'hôte menant à la conversion lysogénique chez les bactéries (via les bactériophages, plasmides) et notamment dans l'espèce *Clostridium botulinum*.

### Incertitudes sur et variabilité des niveaux de contamination tellurique

Le niveau de contamination tellurique initial est peu connu. Cette contamination est par ailleurs non homogène, pourrait varier suivant le toxinotype. Une fourchette de concentrations allant de 50 à 1.050 spores/kg est mentionnée (WRAP, 2015).

### Incertitudes de résistance environnementale

Les spores de *C. botulinum* sont considérées comme très résistantes en conditions expérimentales. Si différentes études ont été menées pour connaître leur résistance à la chaleur dans des matrices alimentaires, très peu ont porté sur leur résistance environnementale :

compétition avec les flores résidentes, résistance aux UV ou aux variations des conditions combinées de pH, de température et d'humidité (Gould, 2006).

#### Incertitudes sur les valeurs de réduction D des spores, en particulier liées au processus de biométhanisation

L'efficacité (quantification exacte) du processus de biométhanisation en termes de réduction du nombre de spores bactériennes n'a fait l'objet que de très peu d'études. Les données actuellement disponibles pour les valeurs de réduction logarithmique D ont été obtenues en conditions de contamination expérimentale et souvent sur des souches non représentatives de *C. botulinum* toxinotype D (Diao *et al.*, 2014 ; Fröschle *et al.*, 2015 ; Wachnicka *et al.*, 2016). De plus, la valeur D n'est probablement pas le paramètre le plus approprié pour représenter la résistance étant donné que la réduction semble se dérouler de manière non linéaire.

#### Incertitudes et variabilité de méthodes de diagnostic et de quantification.

La détectabilité des spores via les méthodes d'amplification moléculaire dépend du rendement d'extraction et de la PCR utilisée. De plus, la démonstration du caractère toxigénique ou non des souches détectées par approche moléculaire n'est pas toujours possible. La capacité de détection et de la quantification (corrélation des charges détectées avec les charges initiales réelles) des spores par méthode moléculaire est inconnue.

## 7. Conclusions

Le Comité scientifique a répondu aux questions spécifiques. Il estime que, bien que le risque direct d'intoxication pour les bovins à partir de fumier ou de digestat contaminé par *C. botulinum* soit très faible, le principe de précaution et des mesures visant à réduire la contamination environnementale au niveau le plus faible possible devraient prévaloir. Elles sont préconisées dans les recommandations.

Les conclusions et recommandations formulées dans le présent avis sont valables pour *C. botulinum* des toxinotypes C ou D. Le risque devrait être à nouveau évalué pour un foyer dans lequel *Clostridium botulinum* toxinotype B (ou autres toxinotypes que C et D) serait mis en évidence.

## 8. Recommandations

Dans le cas considéré, le Comité scientifique recommande de traiter par biométhanisation sur site l'ensemble du fumier potentiellement contaminé (fumier récolté jusqu'à 21 jours après les derniers signes cliniques constatés sur les animaux, ce laps de temps correspondant à la période pré-patente maximale observée dans des cas rapportés au Royaume-Uni et au Brésil ; ACFMS, 2006 ; Ortolani *et al.*, 1997). Il recommande que l'étape d'hygiénisation soit préalable à la digestion anaérobie. Il recommande également que les fumiers et digestats contaminés ne soient pas utilisés sur des pâtures ou à proximité directe de pâtures pour bovins. Les digestats seront de préférence épanchés par une méthode d'injection dans le sol en début de printemps. En termes de coût économique et de faisabilité technique, le meilleur traitement tant du fumier que du digestat contaminé est le chaulage à la chaux vive (CaO).

Pour les futures suspicions de foyers d'infection à *C. botulinum*, le Comité scientifique recommande de bloquer les sorties de tous les sous-produits animaux dans l'attente du résultat du diagnostic et de l'identification du toxinotype.

- Dans les cas où le toxinotype impliqué sera de type B et étant donné la possibilité pour cette souche d'utiliser les protéines végétales pour sa croissance et pour la production de toxine, aucun fumier ni digestat potentiellement contaminé ne devrait pouvoir être épandu, ni sur les pâtures ni sur les cultures.
- En cas de diagnostic des toxinotypes C, D, C-D ou D-C, les fumiers contaminés devront être préférentiellement détruits par incinération si leur quantité et leur degré d'humidité le permettent ou traités par chaulage avant de pouvoir être épandus. Si l'exploitation-foyer dispose d'une unité de biométhanisation et si l'hygiénisation est appliquée en pré-digestion, ils pourront y être introduits. L'épandage de fumiers et de digestats contaminés devrait être réalisé sur des cultures (par une méthode telle que décrite précédemment pour éviter tout transport indirect des spores) et non sur des prairies pâturées ou destinées à l'ensilage, via une procédure d'injection dans les sols.

Le Comité scientifique recommande de rappeler au secteur l'importance des bonnes pratiques pour la production, la gestion et la distribution des ensilages aux bovins ainsi que celles qui s'appliquent à l'utilisation des lisiers de volaille dans des zones à forte densité de bovins, notamment pour ce qui concerne la détection des cadavres qui pourraient s'y trouver et la hauteur de coupe des ensilages pour en limiter la contamination par la terre et/ou les cadavres. Par ailleurs, le Comité scientifique recommande de rappeler aux exploitants agricoles de maintenir de bonnes conditions de stockage en évitant au maximum les conditions d'humidité élevée.

Étant donné son probable impact critique sur la flore microbienne totale (constituant un antagonisme de compétition vis-à-vis de *C. botulinum*) ainsi que le risque de germination induite pour les spores résiduelles, le Comité scientifique recommande que l'étape d'hygiénisation dans le processus de biométhanisation soit effectuée en pré-digestion.

Le Comité scientifique recommande le développement et la validation d'un indicateur quantitatif de salubrité des produits de traitement des effluents ou des sous-produits animaux en rapport avec leur teneur en organismes capables de sporuler (e.g. *Bacillus* spp. ou *Clostridium* spp.). Cet indicateur pourrait nécessiter le développement d'une recherche spécifique ou se baser sur la proposition du programme de recherche européen WRc Ref: CO 5026/1 / 12787-0 (EC, 2001) qui est un nombre inférieur à 3.000 spores de *Clostridium perfringens* par gramme de matière sèche.

Le Comité scientifique recommande la plus grande vigilance face aux signes cliniques menant à une suspicion de botulisme, notamment dans l'espèce bovine (résumés pour différentes espèces animales dans Hogg *et al.*, 2008). Une communication ciblée aux vétérinaires devrait être effectuée afin de leur rappeler de systématiquement inclure le botulisme dans le diagnostic différentiel des paralysies flasques progressives et ascendantes, des troubles digestifs ou des mortalités soudaines chez les bovins. Le Comité scientifique souligne la nécessité de la notification de toute suspicion clinique chez les animaux, de la sensibilisation de tous les acteurs de la filière et de la prise en compte de la possibilité de la contamination des sous-produits animaux dans les enquêtes épidémiologiques effectuées dans les foyers de botulisme bovin.



Il recommande la prise en compte du toxinotype de la souche potentiellement incriminée pour la gestion des produits et sous-produits animaux dans les foyers (voir l'avis 45-2006 du Comité scientifique) ainsi que pour la gestion du risque pour la santé publique dans le cas de l'implication d'une souche de toxinotype A, B, E ou F.

Pour le Comité scientifique,  
Le Président,

Prof. Dr. E. Thiry (Sé.)  
Bruxelles, le 22/12/2017

## Références

- ACMSF (2006).** Advisory committee on the microbiological safety of food *Ad Hoc* group on botulism in cattle. UK Food Standards Agency. Report on Botulism in Cattle. Food Standards Agency.
- AFSSA (2002).** Rapport sur le botulisme d'origine aviaire et bovine.
- Anses (2011).** Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments. *Clostridium botulinum*, *Clostridium neurotoxigenes*.
- Bagge (2009).** Hygiene Aspects of the Biogas Process with Emphasis on Spore-Forming Bacteria. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Bagge, E., Persson, M. & Johansson, K. -E. (2010).** Diversity of spore-forming bacteria in cattle manure, slaughterhouse waste and samples from biogas plants. *J Appl Microbiol* **109**, 1549–1565.
- Bagge, E., Sahlström, L. & Albin, A. (2005).** The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. *Water Res* **39**, 4879–4886.
- Bohnel, H., Schwagerick, B. & Gessler, F. (2001).** Visceral Botulism - A New Form of Bovine *Clostridium botulinum* Toxication. *J Vet Med Ser A* **48**, 373–383.
- Couesnon, A., Raffestin, S. & Popoff, M. R. (2006).** Expression of botulinum neurotoxins A and E, and associated non-toxin genes, during the transition phase and stability at high temperature: analysis by quantitative reverse transcription-PCR. *Microbiology* **152**, 759–770.
- Daifas, D. P., Smith, J. P., Blanchfield, B. & Austin, J. W. (1999).** Growth and toxin production by *Clostridium botulinum* in English-style crumpets packaged under modified atmospheres. *J Food Prot* **62**, 349–55.
- Diao, M. M., André, S. & Membré, J.-M. (2014).** Meta-analysis of D-values of proteolytic *Clostridium botulinum* and its surrogate strain *Clostridium sporogenes* PA 3679. *Int J Food Microbiol* **174**, 23–30.
- Dohrmann, A. B., Walz, M., Löwen, A. & Tebbe, C. C. (2015).** *Clostridium* cluster I and their pathogenic members in a full-scale operating biogas plant. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**, 3585–3598.
- EC (2001).** Evaluation of sludge treatments for pathogen reduction. Final report. Study contract No B4-3040/2001/322179/MAR/A2 for the European Commission Directorate-General Environment.
- EC (2006).** European Commission Concerted Action project “Pathology and Ecology of the Genus *Clostridium* in Humans, Animals and Foodstuffs: Identification, Epidemiology and Prophylaxis (Genus *Clostridium*)”. Project funded under the EU Quality of Life programme. Disponible en ligne : [http://cordis.europa.eu/project/rcn/58992\\_en.html](http://cordis.europa.eu/project/rcn/58992_en.html)
- Fohler, S., Discher, S., Jordan, E., Seyboldt, C., Klein, G., Neubauer, H., Hoedemaker, M., Scheu, T., Campe, A. & other authors. (2016).** Detection of *Clostridium botulinum* neurotoxin genes (A–F) in dairy farms from Northern Germany using PCR: A case-control study. *Anaerobe* **39**, 97–104.
- Fröschle, B., Messelhäusser, U., Höller, C. & Lebuhn, M. (2015).** Fate of *Clostridium botulinum* and incidence of pathogenic clostridia in biogas processes. *J Appl Microbiol* **119**, 936–947.
- Gould, G. W. (2006).** History of science – spores. *J Appl Microbiol* **101**, 507–513.
- Hogg, R., Livesey, C. & Payne, J. (2008).** Diagnosis and implications of botulism. *In Pract* **30**, 392–397.
- Johnson, A. L., McAdams-Gallagher, S. C. & Aceto, H. (2016).** Accuracy of a Mouse Bioassay for the Diagnosis of Botulism in Horses. *J Vet Intern Med* **30**, 1293–1299.
- Krüger, M., Shehata, A.A., Schrödl, W., Rodloff, A. (2013a).** Glyphosate suppresses the antagonistic effect of *Enterococcus* spp. on *Clostridium botulinum*. *Anaerobe* **20**, 74–78.
- Krüger, M., Skau, M., Shehata, A.A., Schrödl, W. (2013b).** Efficacy of *Clostridium botulinum*

- types C and D toxoid vaccination in Danish cows. *Anaerobe* **23**,1–5.
- Krüger, M., Shehata, A. A., Grosse-Herrenthey, A., Ständer, N. & Schrödl, W. (2014a).** Relationship between gastrointestinal dysbiosis and *Clostridium botulinum* in dairy cows. *Anaerobe* **27**, 100–105.
- Krüger, M., Neuhaus, J., Herrenthey, A. G., Gökce, M. M., Schrödl, W. & Shehata, A. A. (2014b).** Chronic botulism in a Saxony dairy farm: Sources, predisposing factors, development of the disease and treatment possibilities. *Anaerobe* **28**, 220–225.
- Lindström, M., Myllykoski, J. & Sivelä, S. (2010).** *Clostridium botulinum* in cattle and dairy products. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **50**, 281-304.
- Neuhaus, J., Schrödl, W., Shehata, A. A. & Krüger, M. (2015).** Detection of *Clostridium botulinum* in liquid manure and biogas plant wastes. *Folia Microbiol (Praha)* **60**, 451–456.
- Notermans, S., Breukink, H. J., Wensing, T. & Wagenaar, G. (1978).** [Incidence of *Clostridium botulinum* in the rumen contents and faeces of cattle fed brewers' grains naturally contaminated with *Clostridium botulinum* (author's transl)]. *Tijdschr Diergeneeskd* **103**, 1327–1333.
- Notermans, S., Kozaki, S. & van Schothorst, M. (1979).** Toxin production by *Clostridium botulinum* in grass. *Appl Environ Microbiol* **38**, 767–771.
- Notermans, S., Dufrenne, J. & Oosterom, J. (1981).** Persistence of *Clostridium botulinum* type B on a cattle farm after an outbreak of botulism. *Appl Environ Microbiol* **41**, 179–183.
- Ortolani E.L., Brito L.A., Mori C.S., Schalch U., Pacheco J., Baldacci L. (1997).** Botulism outbreak associated with poultry litter consumption in three Brazilian cattle herds. *Vet Hum Toxicol* **39**, 89-92.
- 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. *Vet Rec* **168**, 640.
- Pellett, S., Tepp, W. H., Scherf, J. M., Pier, C. L. & Johnson, E. A. (2015).** Activity of botulinum neurotoxin type D (strain 1873) in human neurons. *Toxicon* **101**, 63–69.
- Popoff (1989).** Revue sur l'épidémiologie du botulisme bovin en France et analyse de sa relation avec le botulisme aviaire. *Rev sci tech Off int Epiz*, **8**, 129-145.
- RIVM (2014).** Feitenrelaas rond de aspecten 'Gezondheid en Veiligheid' van biovergisting. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu briefrapport 2014-0162.
- Rasooly, R. & Do, P. M. (2010).** *Clostridium botulinum* Neurotoxin Type B Is Heat-Stable in Milk and Not Inactivated by Pasteurization. *J Agric Food Chem* **58**, 12557–12561.
- Rodgers, S., Peiris, P., Casadei, G. (2003).** Inhibition of nonproteolytic *Clostridium botulinum* with lactic acid bacteria and their bacteriocins at refrigeration temperatures. *J Food Prot* **66**, 674–678.
- Sahlström (2006).** Recycled Biowaste as a Source of Infection. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Yamamoto, Y., Nishikawa, A. & Oguma, K. (2015).** Genomics of *Clostridium botulinum* group III strains. *Res Microbiol* **166**, 318–325.
- SciCom (2006a).** Avis 33-2006 du Comité scientifique du 18 septembre 2006. *Clostridium botulinum* type D dans le miel (dossier SciCom 2006/38). Disponible en ligne : [http://www.afsca.be/comitescientifique/avis/2006/\\_documents/AVIS\\_33-2006\\_FR.pdf](http://www.afsca.be/comitescientifique/avis/2006/_documents/AVIS_33-2006_FR.pdf)
- SciCom (2006b).** Avis 45-2006 du Comité scientifique du 29 janvier 2007. Propositions d'options de mesures à prendre en cas de (suspicion de) botulisme dans une exploitation bovine laitière sur base d'une évaluation du risque pour la santé publique et animale (dossier SciCom 2006/54). Disponible en ligne : [http://www.afsca.be/comitescientifique/avis/2006/\\_documents/AVIS\\_45-2006\\_fr.pdf](http://www.afsca.be/comitescientifique/avis/2006/_documents/AVIS_45-2006_fr.pdf)
- SciCom (2015).** Avis 23-2015 du Comité scientifique du 20 novembre 2015. Méthodologie pour la vérification et la validation de paramètres alternatifs pour le traitement thermique de boues de centrifugeuses et de séparateurs issues de la transformation du lait (dossier SciCom

- 2015/01). Disponible en ligne : [http://www.afsca.be/comitescientifique/avis/2015/\\_documents/Avis23-2015\\_boue-lait\\_000.pdf](http://www.afsca.be/comitescientifique/avis/2015/_documents/Avis23-2015_boue-lait_000.pdf)
- SciCom (2017)**. Lignes directrices pour les avis du Comité scientifique. Disponible en ligne : <http://www.afsca.be/comitescientifique/publications/brochures/lignesdirectricesavis/>
- Seyboldt, C., Discher, S., Jordan, E., Neubauer, H., Jensen, K. C., Campe, A., Kreienbrock, L., Scheu, T., Wichern, A. & other authors. (2015)**. Occurrence of *Clostridium botulinum* neurotoxin in chronic disease of dairy cows. *Vet Microbiol* **177**, 398–402.
- Shehata, A.A., Schrödl, W., Neuhaus, J., Krüger, M. (2013)**. Antagonistic effect of different bacteria on *Clostridium botulinum* types A, B, C, D and E in vitro. *Vet Rec* **12**, 47.
- Siegel, L. S. & Metzger, J. F. (1979)**. Toxin production by *Clostridium botulinum* type A under various fermentation conditions. *Appl Environ Microbiol* **38**, 606–11.
- Souillard, R., Maréchal, C. L., Hollebecque, F., Rouxel, S., Barbé, A., Houard, E., Léon, D., Poëzevara, T., Fach, P. & other authors. (2015)**. Occurrence of *C. botulinum* in healthy cattle and their environment following poultry botulism outbreaks in mixed farms. *Vet Microbiol* **180**, 142–145.
- Souillard, R., Le Maréchal, C., Ballan, V., Rouxel, S., Léon, D., Balaine, L., Poëzevara, T., Houard, E., Robineau, B. & other authors. (2017)**. Investigation of a type C/D botulism outbreak in free-range laying hens in France. *Avian Pathol* **46**, 195–201.
- Sullivan, N.M., Mills, D.C., Riepmann, H.P., Arnon, S.S. (1988)**. Inhibition of growth of *Clostridium botulinum* by intestinal microflora isolated from healthy infants. *Microb Ecol Health Dis* **1**, 179–192.
- Sugii, S., Ohishi, I. & Sakaguchi, G. (1977)**. Correlation between oral toxicity and in vitro stability of *Clostridium botulinum* type A and B toxins of different molecular sizes. *Infect Immun* **16**, 910–4. American Society for Microbiology (ASM).
- Van Huffel, X., Cardoen, S., Vanholme, L., Imberechts, H., Dierick, K., Debevere, J. Daube, G. Herman, L., Deprez, P., Haesebrouck, F. (2008)**. (Verdenking van) botulisme bij melkvee: voedselveiligheidsaspecten en maatregelen. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, **78**, 81-89.
- Wachnicka, E., Stringer, S. C., Barker, G. C. & Peck, M. W. (2016)**. Systematic Assessment of Nonproteolytic *Clostridium botulinum* Spores for Heat Resistance. *Appl Environ Microbiol* **82**, 6019–29.
- WRAP (2015)**. An introduction to *Clostridium botulinum* and its presence in UK soils and soils amendments. Waste & Resources Action Programme, Banbury. Disponible en ligne : <http://www.wrap.org.uk/sites/files/wrap/The%20fate%20of%20C.bot%20in%20AD.pdf>

## Présentation du Comité scientifique de l'AFSCA

Le Comité scientifique est un organe consultatif de l'Agence fédérale belge pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire (AFSCA) qui rend des **avis scientifiques indépendants** en ce qui concerne l'évaluation et la gestion des risques dans la chaîne alimentaire, et ce sur demande de l'administrateur délégué de l'AFSCA, du ministre compétent pour la sécurité alimentaire ou de sa propre initiative. Le Comité scientifique est soutenu administrativement et scientifiquement par la Direction d'encadrement pour l'évaluation des risques de l'Agence alimentaire.

Le Comité scientifique est composé de 22 membres, nommés par arrêté royal sur base de leur expertise scientifique dans les domaines liés à la sécurité de la chaîne alimentaire. Lors de la préparation d'un avis, le Comité scientifique peut faire appel à des experts externes qui ne sont pas membres du Comité scientifique. Tout comme les membres du Comité scientifique, ceux-ci doivent être en mesure de travailler indépendamment et impartialement. Afin de garantir l'indépendance des avis, les conflits d'intérêts potentiels sont gérés en toute transparence.

Les avis sont basés sur une évaluation scientifique de la question. Ils expriment le point de vue du Comité scientifique qui est pris en consensus sur la base de l'évaluation des risques et des connaissances existantes sur le sujet.

Les avis du Comité scientifique peuvent contenir des **recommandations** pour la politique de contrôle de la chaîne alimentaire ou pour les parties concernées. Le suivi des recommandations pour la politique est la responsabilité des gestionnaires de risques.

Les questions relatives à un avis peuvent être adressées au secrétariat du Comité scientifique : [Secretariat.SciCom@afsca.be](mailto:Secretariat.SciCom@afsca.be)

## Membres du Comité scientifique

Le Comité scientifique est composé des membres suivants :

S. Bertrand, M. Buntinx, A. Clinquart, P. Delahaut, B. De Meulenaer, N. De Regge, S. De Saeger, J. Dewulf, L. De Zutter, M. Eeckhout, A. Geeraerd, L. Herman, P. Hoet, J. Mahillon, C. Saegerman, M.-L. Scippo, P. Spanoghe, N. Speybroeck, E. Thiry, T. van den Berg, F. Verheggen, P. Wattiau

## Conflits d'intérêts

Aucun conflit d'intérêt n'a été mentionné dans le chef des membres du Comité scientifique. Un conflit d'intérêts a été mentionné par P. Delfosse (LIST) et L. Delbrassinne (WIV-ISP). Dans les deux cas, le risque a été jugé haut et ces experts ont été considérés comme experts auditionnés par le groupe de travail. Pour L. Delbrassinne, cela ne concernait que la question spécifique relative au diagnostic.

## Remerciements

Le Comité scientifique remercie la Direction d'encadrement pour l'évaluation des risques et les membres du groupe de travail pour la préparation du projet d'avis ainsi que les deux *deep readers* (L. Herman et A. Clinquart) pour sa relecture.

## Composition du groupe de travail

Le groupe de travail était composé de :

Membres du Comité scientifique : J. Mahillon (rapporteur), A. Geeraerd, P. Wattiau

Experts externes : F. Haesebrouck (UGent), M. Heyndrickx (ILVO/UGent), K. Rabaey (UGent)

Experts auditionnés : L. Delbrassinne (WIV-ISP), P. Delfosse (Luxembourg Institute of Science and Technology, Luxembourg)

Gestionnaire du dossier : A. Mauroy

Les activités du groupe de travail ont été suivies par les membres de l'administration suivants (comme observateurs) : A. Generet (SPF Santé Publique et Santé de la Chaîne alimentaire), H. De Norre (SPF Santé Publique et Santé de la Chaîne alimentaire), J. Van Autreve (AFSCA)

## Cadre juridique

Loi du 4 février 2000 relative à la création de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, notamment l'article 8 ;

Arrêté royal du 19 mai 2000 relatif à la composition et au fonctionnement du Comité scientifique institué auprès de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire ;

Règlement d'ordre intérieur visé à l'article 3 de l'arrêté royal du 19 mai 2000 relatif à la composition et au fonctionnement du Comité scientifique institué auprès de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, approuvé par le Ministre le 9 juin 2011.

## Disclaimer

Le Comité scientifique conserve à tout moment le droit de modifier cet avis si de nouvelles informations et données deviennent disponibles après la publication de cette version.

## Annexes

**Tableau I : Caractéristiques de survie, de croissance et de toxinogénèse des différents toxinotypes de *Clostridium botulinum*.**

(adapté de la fiche de description des dangers biologiques transmissibles par les aliments, disponible sur <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2010SA0234Fi.pdf>; données non disponibles pour *C. botulinum* toxinotype H).

	<i>C. botulinum</i> Groupe I Protéolytiques			<i>C. botulinum</i> Groupe II Non protéolytiques			<i>C. botulinum</i> Groupe III Non protéolytiques			<i>C. botulinum</i> Groupe IV Protéolytique		
<b>Toxines</b>	A, B, F			B, E, F			C, D			G		
<b>Croissance cellules végétatives</b>	Min.	Opt.	Max.	Min.	Opt.	Max.	Min.	Opt.	Max.	Min.	Opt.	Max.
Température (°C)	10	35-40	48	3	18-25	45	15	37-40		/	37	/
pH	4,6	/	9,0	5,0	7,0	9,0	5,1	6,1-6,3	9,0	4,6	7,0	/
<b>Température minimum (°C) pour la production de toxines</b>	10			3			15			/		
<b>Stabilité et inactivation des toxines</b>	Les toxines résistent à la congélation (activité de la toxine préformée dans l'aliment non réduite par la congélation). Détruites après 10 min à 100°C ou 30 min à 80°C.											
<b>Valeurs de D<sup>a</sup> pour les spores</b>	D <sub>121,1°C</sub> =0,21 min			D <sub>80°C</sub> =0,6-1,25 min <sup>b</sup>			D <sub>104°C</sub> =0,1-0,9 min <sup>b</sup>			D <sub>104°C</sub> =0,8-1,12 min <sup>b</sup>		

<sup>a</sup> Exprimé sous forme de temps de réduction décimale, durée nécessaire à la température mentionnée pour réduire la concentration en spores d'un logarithme de base 10 (90%).

<sup>b</sup> Variable selon les souches.

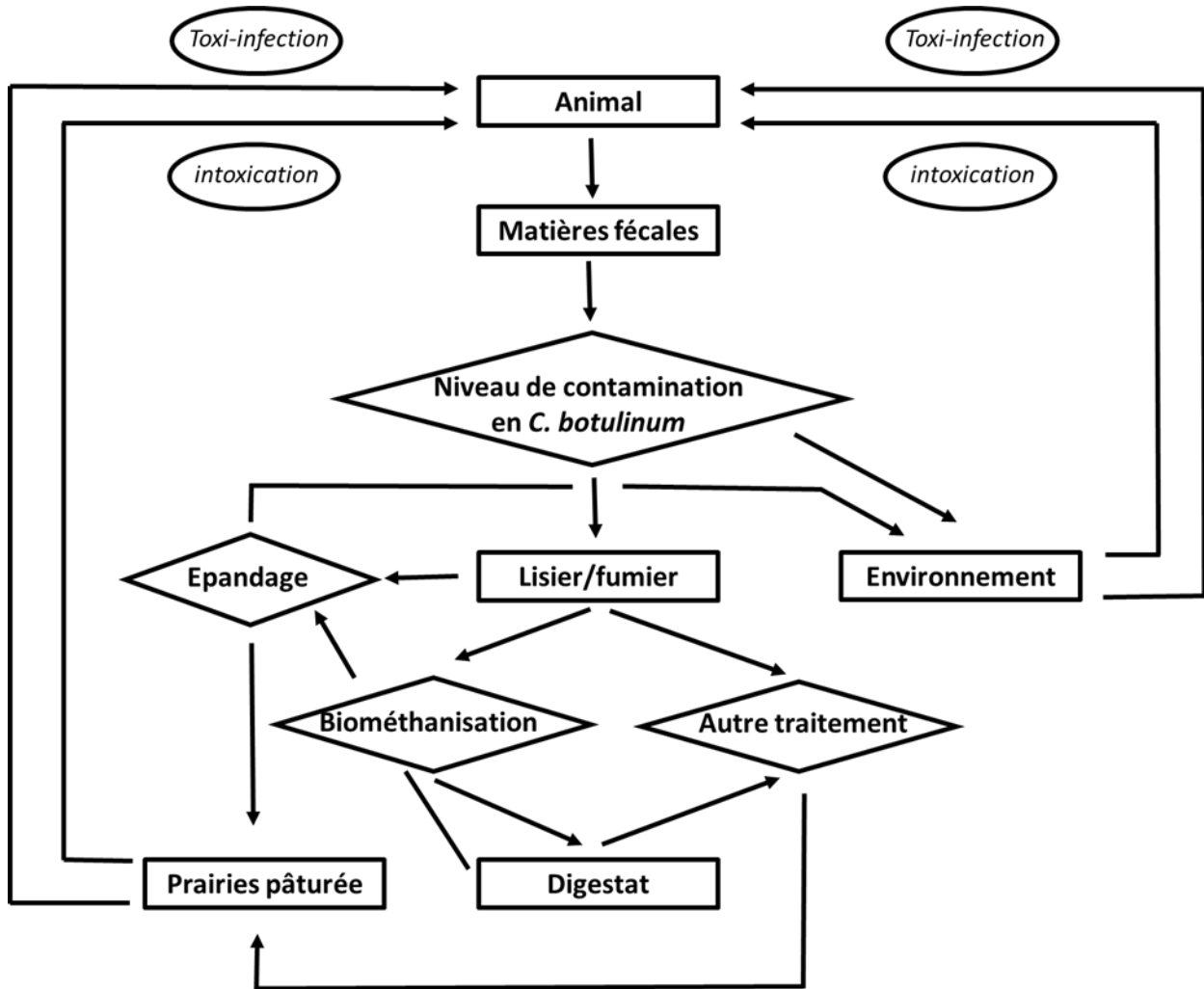
**Tableau II : Taux d'incidence des cas de botulisme bovin inférés des chiffres de notification à l'AFSCA et de ceux des échantillons positifs au diagnostic au Laboratoire National de Référence (Institut scientifique de Santé Publique).**

	Année							Référence
	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	
Nombre de bovins en Belgique	2509540	2471600	2438180	2441320	2477240	2503260	2501350	Eurostat
Nombre de troupeaux de bovins en Belgique	37000	35062	32856	31680	30354	29468	28486	Requête dans la banque de données de l'AFSCA
Cas de botulisme bovin notifiés à l'AFSCA (# d'animaux)	13	11	10	34	50	33	105	Données AFSCA
Cas de botulisme bovin notifiés à l'AFSCA (# de foyers = # de troupeaux infectés)	4	1	2	7	2	8	5	Données AFSCA
Echantillons positifs soumis pour diagnostic de botulisme bovin à l'ISP (LNR) <sup>a</sup>	20	20	24	25	11	18	5	Trends and Source 2012-2013
Taux d'incidence de botulisme / bovin (sur base des notifications de l'AFSCA)	5,1802 $\times 10^{-6}$	4,4506 $\times 10^{-6}$	4,1014 $\times 10^{-6}$	1,3927 $\times 10^{-5}$	2,0184 $\times 10^{-5}$	1,3183 $\times 10^{-5}$	4,1977 $\times 10^{-5}$	
Taux d'incidence de botulisme / bovin (sur base des échantillons positifs de l'ISP)	7,9696 $\times 10^{-6}$	8,0919 $\times 10^{-6}$	9,8434 $\times 10^{-6}$	1,0240 $\times 10^{-5}$	4,4404 $\times 10^{-5}$	7,1906 $\times 10^{-5}$	1,9989 $\times 10^{-5}$	
Taux d'incidence de botulisme / troupeau de bovin	1,0811 $\times 10^{-4}$	2,8521 $\times 10^{-5}$	6,0872 $\times 10^{-5}$	2,2096 $\times 10^{-4}$	6,5889 $\times 10^{-5}$	2,7148 $\times 10^{-4}$	1,7552 $\times 10^{-4}$	

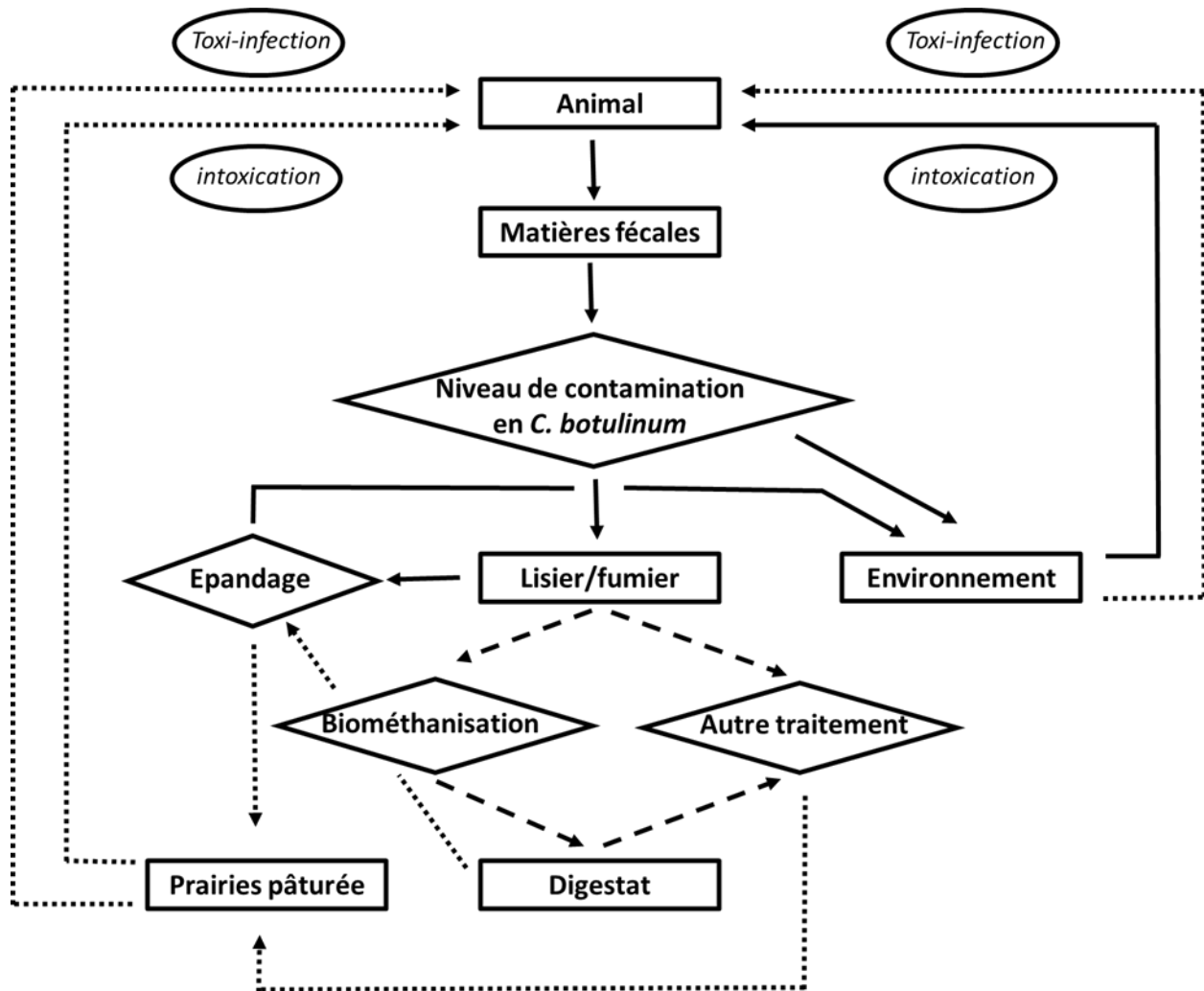
<sup>a</sup> différents échantillons peuvent provenir d'un seul animal



Figure 1 : Modèle de voie du risque pour du fumier de bovins contaminé par *Clostridium botulinum* pouvant éventuellement subir un processus de biométhanisation.



**Figure 2 : Identification dans le modèle (Fig. 1) des voies de contamination les plus importantes sur base des lignes de preuves.**



Flèches en trait plein : voies de contamination identifiées comme les plus probables  
 Flèches en traits espacés : voies de contamination identifiées comme intermédiaires  
 Flèches en pointillés : voies de contamination identifiées comme les moins probables