

Le botulisme équin au Sénégal

Premier isolement de *Clostridium botulinum* type D

par J. CHAMBRON, J. L. MARTEL, P. M. DOUTRE (*)

RESUME

Après un bref rappel des cas de botulisme équin signalés au Sénégal, au cours des dernières années, les auteurs rapportent l'existence d'un nouveau foyer dans ce pays. Une souche de *Clostridium botulinum* type D a été isolée du foie d'un cheval sacrifié à la période agonique. Cette souche constitue le premier isolement pour l'Afrique de l'Ouest. Les méthodes d'isolement, les caractères du germe et de la toxine sont indiqués. A la question posée : pourquoi la maladie n'est-elle pas plus souvent rencontrée en Afrique ? Il est suggéré que certainement le manque d'observateurs « sensibilisés » à cette affection peut être tenu pour responsable des cas relatés.

La littérature traitant du botulisme équin en Afrique occidentale et centrale est pratiquement inexistante. Les seules observations effectuées datent des dernières années et elles n'intéressent que le Sénégal. En 1941, DISCHAMPS, à Saint-Louis, devant un cheval présentant des paralysies, pose la question, sans toutefois apporter de réponse absolument affirmative : « le botulisme du cheval existe-t-il au Sénégal ? » (6). Depuis cette date, les nombreux exemples rencontrés de l'affection lèvent toute incertitude.

Tout d'abord, au cours de l'enzootie qui a affecté à partir de 1959 le Ferlo et plus récemment le sud de la Mauritanie (N-O de Kaédi), les éleveurs signalent des cas de mortalité dus au botulisme chez les chevaux et chez les ânes. Toutefois, jamais lors des enquêtes menées par les agents du Laboratoire de Dakar, il n'a été trouvé d'équidés présentant des signes caractéristiques de la maladie. Néanmoins en 1965, des prélèvements recueillis

sur un âne exhumé permettent de mettre en évidence de la toxine C à partir du surnageant d'une culture mixte en bouillon VF d'un morceau d'anse intestinale (3, 8, 11).

En 1967 et 1968, en début de saison des pluies, au village de Dara, l'un de nous photographie deux chevaux atteints de parésie du train postérieur et d'une paralysie labio-glossopharyngée (Photo 1). Les animaux étant apparemment en voie de guérison, aucun prélèvement ne peut être rapporté.

En juillet 1968, au village de Taïba-Thiélène (département de MBacké), l'eau d'un puits souillé par un cadavre de chat provoque l'intoxication de bovins et de chevaux. Le surnageant d'une culture mixte, en bouillon VF, de quelques sédiments sableux présents dans un échantillon d'eau toxique se révèle contenir de la toxine botulique du type D. Malheureusement, la souche en cause ne peut être isolée. Le diagnostic fut confirmé par l'Institut Pasteur de Lille et par l'Anaérobic Bacteriology Laboratory, Communicable Disease Center (Atlanta, Georgia). Pour le professeur BEERENS, la souche perdait son pouvoir

(*) Institut d'Élevage et de Médecine vétérinaire des Pays tropicaux, Maisons-Alfort; Laboratoire national de l'Élevage et de Recherches vétérinaires, Dakar-Hann.



Photo 1. — Cheval atteint de botulisme avec paralysie de la langue et de la lèvre inférieure.

toxinoène dès le premier passage sur milieu artificiel solide (12, 13).

En décembre 1968, au village de Gadde Boffé, des ânes, des chevaux et des moutons succombent après avoir absorbé l'eau d'un puits également contaminé par un cadavre de chat. La culture de fragments desséchés de ce dernier permet de mettre en évidence l'existence de toxine botulique de type C (13).

En janvier 1969, nouvel exemple au village de Beytil-Moukhades où un cheval succombe avec de nombreux bovins et moutons. Un cadavre d'écureuil fouisseur (*Xerus erythropus*) est responsable de la pollution du puits de la communauté familiale propriétaire des animaux. La présence de toxine botulique de type C est encore une fois démontrée (13).

En juillet 1969, dans la région de Mbour, au village de Djilakh, un cheval meurt rapide-

ment après avoir présenté des signes de parésie, puis de paralysie des membres. Le botulisme est suspecté, sans plus, par les observateurs.

Fin juillet 1970, dans le même arrondissement, au village de Faloh, 2 moutons et 3 chevaux succombent après avoir montré des symptômes paralytiques. Cette dernière observation fait l'objet de la présente publication, les prélèvements recueillis ayant permis d'isoler pour la première fois une souche de *Clostridium botulinum* de type D au Sénégal (1).

(1) Depuis la rédaction de cette publication, un autre foyer de botulisme de type D a été observé (village de Thidja, Sine-Saloum), 4 chevaux ont succombé après avoir absorbé de la paille d'arachide souillée par un cadavre de chat. De la toxine botulique de type D a été mise en évidence dans le surnageant d'une culture en bouillon VF de fragments desséchés de peau et d'os (côtes) du chat retrouvé dans la paille d'arachide (septembre 1970).

A. COMMÉMORATIFS

Les moutons atteints présentent avant leur mort une paralysie totale des membres et une salivation intense. La température rectale est normale. A l'autopsie, l'agent du Service de l'Élevage déclare n'avoir remarqué aucune lésion, mis à part une légère congestion des muqueuses.

Quant aux trois chevaux, apparemment la symptomatologie est identique, muqueuse oculaire congestionnée, paralysie des membres, décubitus latéral, mouvements de pédalage, langue pendante à l'extérieur de la bouche, respiration difficile, température rectale à 37° 4. PREVOT signale que le botulisme équin de type D comporte un symptôme de plus que les paralysies habituelles : agitation, excitation nerveuse et musculaire (14). Deux chevaux ont succombé en 48 heures, le troisième est à l'agonie lorsque le propriétaire accepte de l'abattre. Des prélèvements de foie, à cœur de l'organe, sont recueillis.

Le diagnostic de botulisme étant fortement suspecté, une courte enquête tendant à déceler l'origine de la contamination n'aboutit à aucune conclusion pratique. Pollution d'un aliment ou de l'eau de boisson par un cadavre de chat ou d'un autre petit mammifère, nécrophagie, ostéophagie sont successivement examinées sans qu'une réponse satisfaisante soit obtenue. Le propriétaire accuse des fanes d'arachide; un échantillon de ce fourrage est rapporté au laboratoire. Consommé par un mouton, ce dernier ne présentera aucun symptôme particulier pouvant évoquer le botulisme.

B. BACTERIOLOGIE

a) Ensemencement et confirmation du diagnostic clinique

De petits cubes de foie sont ensemencés en bouillon viande-foie (VF) glucosé à 10 p. 1000. Après 4 jours de culture à 37°, le surnageant se révèle toxique pour 5 souris à la dilution du 1/10.000 (voie intrapéritonéale).

La dose minimale mortelle souris (DMM) de ce surnageant est calculée et une séro-neutralisation est effectuée immédiatement sur souris en utilisant les sérums antibotuliques de type fournis par l'Institut Pasteur de Paris.

Comme à l'ordinaire, 5 lots de 5 souris reçoivent par voie intrapéritonéale 0,20 ml du mélange toxine-antitoxine de chacun des types préalablement porté 45 minutes à 37°. Pour chaque type, une unité antitoxique (U.A.) est mise en présence d'environ 100 DMM de toxine.

En utilisant une quantité de surnageant correspondant à 100 DMM de toxine, aucun sérum anti ne neutralise. Mais en réduisant ce nombre, après quelques tâtonnements, les souris protégées par les sérums anti A, B, C et E succombent, seules survivent celles protégées par le sérum anti D. Ces difficultés seront expliquées lors de l'étude de la toxicité de la souche. Le diagnostic de botulisme de type D est établi. De plus, le germe étant présent dans le foie, on se trouve en présence d'une toxoinfection.

b) Isolement de la souche en cause

• Coloration

La simple coloration par la méthode de Gram des germes de la culture primaire fournit déjà, lorsque l'on possède une certaine habitude, une indication des plus utiles quant à la richesse en *Cl. botulinum*. En effet, *Cl. botulinum* lorsqu'il est sporulé (cas présent) se différencie assez nettement par sa morphologie des autres *Clostridium* contaminants (Photo 2). L'aspect en bâtonnet assez épais, à bouts arrondis, pourvu d'une spore plus ou moins déformante, subterminale, renseigne, avec une probabilité assez forte, sur la quantité relative présente du germe que l'on désire isoler.

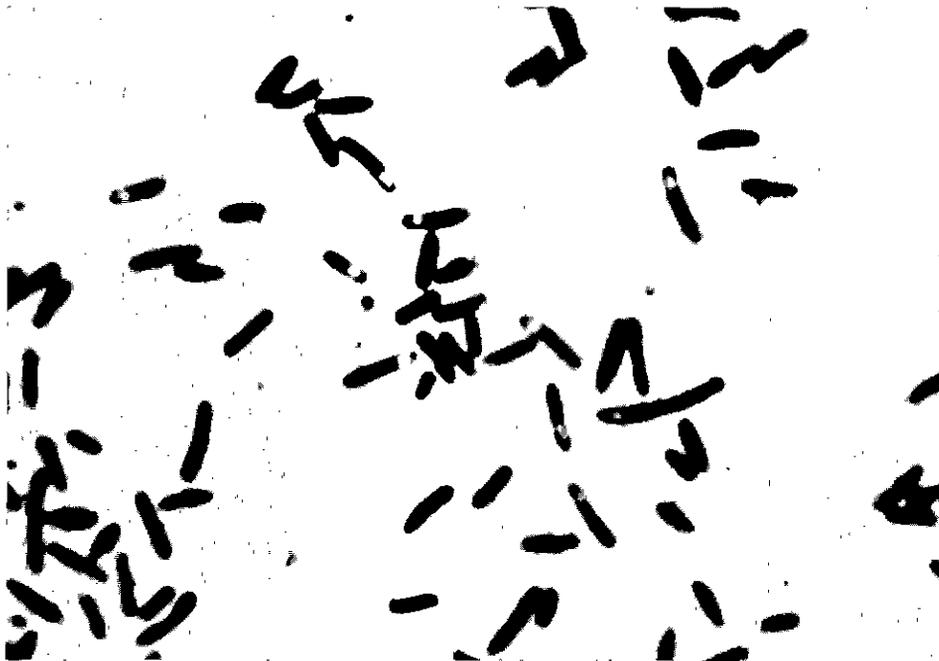
• Thermorésistance

Les germes contaminants thermosensibles sont éliminés en chauffant, pendant 10 minutes à 80° C, environ 2 ml de la culture primaire.

• Isolement

Pour procéder à l'isolement sur milieu solide, il est recommandé d'utiliser directement la primo-culture soumise à l'action de la chaleur (légèrement diluée en bouillon VF) et de ne pas procéder à des subcultures en milieu liquide (VF). En effet, au cours de subcultures :

— la richesse en spores botuliques risque fort de décroître, les contaminants ayant tendance à envahir la culture aux dépens des germes recherchés,

Photo 2. — *Clostridium botulinum* type D.

— la multiplication des passages peut aboutir à l'obtention, par dissociation, de mutants atoxigènes du type de *Cl. botulinum* en cause. Le phénomène a été étudié par C.E. DOLMAN pour les différents types (A, B, C, D, E, et F). Cet auteur décrit des colonies transparentes protéolytiques (type E) et des colonies opaques sporulantes (types A, B, E et F), obtenues par dissociation, devenues atoxigènes (7). A Dakar, le même phénomène a été observé avec le type C beta.

• Milieux utilisés

Deux milieux solides sont utilisés :

- la gélose cœur-cerveau (Brain Heart Infusion Agar, Difco B 418) répartie en tubes de 8/180 mm sur une hauteur de 12 cm.
- la gélose au sang viande-levure coulée en boîte de Pétri. L'anaérobiose est réalisée en utilisant un sachet de mélange réducteur (carbonate de potassium + pyrogallol + terre d'infusoires) (2).

• Résultats

Les tentatives d'isolement en tubes de gélose profonde se sont soldées par un échec dû à un

envahissement par les germes contaminants.

Au contraire, l'isolement a pu être réussi à partir d'une gélose au sang VL coulée en boîte de Pétri. Sur ce milieu, *Cl. botulinum* offrait une mince culture en nappe finement givrée. Malheureusement de nombreux *Clostridium* se développent de la même façon et seuls la coloration (valeur de présomption) et le caractère toxique de la culture en VF du repiquage (valeur de certitude) permettent d'affirmer que l'on est bien en présence du germe recherché.

c) Caractères cultureux

En bouillon VF glucosé à 10 p. 1000, apparaît une culture dense floconneuse qui sédimente.

En gélose profonde cœur-cerveau (Difco B 418) se développent des colonies floconneuses, toxigènes, pouvant atteindre 1 mm 5 de diamètre à partir du 3^e tube (ensemencement de 10 tubes par dilution successive avec une pipette Pasteur), pas de production de gaz fragmentant la gélose.

En plaque de gélose au sang, la culture se présente sous forme d'un fin givre.

d) Caractères biochimiques de la souche isolée

L'action sur les sucres a été étudiée en utilisant le milieu de base viande-levure auquel 1 p. 100 de sucre est ajouté sous forme de solution stérilisée par filtration (2).

Les résultats obtenus sont reproduits dans le tableau qui suit par comparaison avec les caractères biochimiques de *Cl. botulinum* type C beta déjà plusieurs fois isolé au Sénégal (8, 9, 10).

TABLEAU N° I

	<i>Clostridium botulinum</i>	
	type C beta	type D
Amidon	-	a
Glucose	a	A
Glycerol	-	-
Lactose	-	A
Maltose	-	A
Mannite	-	-
Saccharose	-	A
Salicine	-	-
Indol	+	+ très lent
Gélatine (Kohn)	+	+ très lent
Lait	Coagulé, digéré	Coagulé, digéré

A = Acidification; a = Légère acidification.

Ce tableau met en évidence l'action du type D sur certains sucres, alors que le type C beta n'en fermente pratiquement aucun. En ce qui concerne le saccharose, la souche isolée à Dakar fermente ce sucre normalement, par contre DOLMAN note une légère acidification (7) et une souche de ce type, étudiée en 1965 par l'un de nous à l'Institut Pasteur de Lille, n'exerçait aucune action.

e) Caractères de la toxine

1° surnageant d'une culture en bouillon VF :

La DMM/souris du surnageant d'une culture en bouillon VF mise à l'étuve à 33° C pendant 6 jours est de 0,0001 ml.

La séroneutralisation avec cette toxine est rendue difficile car elle est accompagnée d'une substance toxique soluble, non antigénique, qui est un poison convulsivant (14).

Pour des raisons d'économie, les doses minimales mortelles pour les différentes espèces domestiques (ovins, bovins, équins) n'ont pu être évaluées. Une approximation avait été effectuée pour le type C beta (8).

2° Culture en sac de dialyse :

Cette méthode est couramment utilisée au Laboratoire de Dakar pour la production de la toxine C beta permettant la préparation de l'anatoxine correspondante.

A titre expérimental, un lot de toxine de type D a été préparé par ce procédé de culture.

La DMM/souris se situe au voisinage de 0,00001 ml. Cette valeur peut être augmentée si l'on provoque l'éclatement des corps bactériens en soumettant la récolte du sac de dialyse à des cycles congélation-décongélation.

Cette toxine plus pure que celle contenue dans le surnageant d'une culture en bouillon VF est facilement neutralisée par le sérum anti D.

C. DISCUSSION

L'existence au Sénégal du type D de *Cl. botulinum* à côté du type C beta se trouve donc confirmée. Déjà au Tchad, J. DEMARCHI et collab., en 1958, avaient mis en évidence la responsabilité du type D lors d'un cas de botulisme humain (5).

A première vue, il semble paradoxal, qu'en Afrique occidentale et centrale, seuls le Sénégal et la Mauritanie offrent des exemples de botulisme animal : cas dus à l'ostéophagie (Ferlo et sud-mauritanien) ou à la pollution de l'eau d'abreuvement (2). Dans les autres pays de la zone tropicale, les possibilités de contamination sont les mêmes : les fourrages, les greniers à mil ne sont pas plus abrités des rats et des souris, et un cadavre de rongeur peut toujours apporter le contagé redouté. Pareillement, les puits ne sont pas plus mal protégés au Sénégal

(2) Il a été montré dans une précédente publication comment le botulisme d'origine hydrique pouvait être considéré comme responsable de foyers primaires même au Ferlo (13).

qu'ailleurs, un chat peut toujours y être précipité, un écureuil fouisseur s'y noyer... Alors à quoi tient ce « monopole » sénégalais ?

Il est difficile d'apporter à cette question une réponse certaine, toutefois, il est fort probable que bien souvent le diagnostic échappe parce qu'en pays tropical, en présence de paralysies, l'observateur ne pense pas au botulisme. Au Sénégal, depuis l'enzootie de botulisme bovin (« Maladie des forages »), les agents du Service de l'Élevage sont « sensibilisés » à cette affec-

tion et ce fait suffit pour expliquer la relative fréquence des foyers déclarés.

L'intérêt que revêt l'affection est encore rehaussé si l'on a présent à l'esprit le danger que représente le type D pour l'homme. Dans les villages, l'eau du puits sert indifféremment aux habitants et à leurs animaux... A quoi doit-on l'inexistence de relations d'accidents botuliques humains, nettement caractérisés, même au Sénégal ?

SUMMARY

Equine botulism in Senegal. First isolation of *Clostridium botulinum* type D

After a brief recall of the various cases of botulism in horses observed in Senegal during the past years, the authors report a new outbreak of the disease in this country. A strain of *Clostridium botulinum* type D has been isolated from the liver of a slaughtered equine. This strain is the first one obtained in western Africa. Method of isolation, biochemical characteristics of the germ and the minimum lethal dose in mice of the toxin are indicated. In a short discussion the authors wonder why the disease has not been described in other parts of western Africa where identical conditions of contamination exist. They suggest that this situation is perhaps due to a lack of observers "sensitized" to the disease.

RESUMEN

El botulismo del caballo en Senegal. Primer aislamiento de *Clostridium botulinum* de tipo D

Después de una breve revocación de casos de botulismo del caballo señalados en Senegal durante los últimos años, los autores notan la existencia de un nuevo foco en este país. Se aisló una cepa de *Clostridium botulinum* de tipo D a partir del hígado de un caballo matado durante el periodo de la agonía. Dicha cepa constituye el primer aislamiento en África del Oeste. Se indican los métodos de aislamiento, el carácter del germen y de la toxina. A la pregunta hecha: ¿ por que no se encuentra más a menudo la enfermedad en África? se sugiere que ciertamente la falta de observadores interesándose con esta enfermedad es responsable de la ausencia de casos notados.

BIBLIOGRAPHIE

- BRUYERE (A.), DAVID (A.), « Paralyse labio-glosso-pharyngée et botulisme chez le cheval », *Rev. Méd. vét.*, 1951, **102** : 155-160.
- BUTTIAUX (R.), BEERENS (H.), TACQUET (A.), « Manuel de techniques bactériologiques », 2^e éd., Paris. Ed. Médicales Flammarion, 1966.
- CALVET (H.), PICART (P.), DOUTRE (M. P.) et CHAMBRON (J.), « Aphosphorose et botulisme au Sénégal », *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1965, **18** (3) : 249-82.
- DE FAGONDE (A. P.), « Botulismo animal », *Bull. Off. int. Epizoot.*, 1963, **59** : 1361-77.
- DEMARCHI (J.), MOURGUES (C.), ORIO (J.) et PREVOT (A. R.), « Existence de botulisme humain de type D », *Bull. Acad. Nat. Méd.*, Paris, 1958, **142** : 580-82.
- DISCHAMPS (A.), « Le botulisme du cheval existe-t-il au Sénégal? », *Bull. Servs Zootech. Epizoot. A.O.F.*, 1941, **4** (1) : 1-2.
- DOLMAN (C. E.), « Growth and metabolic activities of *Cl. botulinum* types. Botulism », Proceedings of a symposium, U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Cincinnati, dec. 1964, pp. 43-68.
- DOUTRE (M. P.), CHAMBRON (J.), « Le botulisme des ruminants et des équidés au Sénégal. Caractères de la souche isolée de *Clostridium botulinum* et de sa toxine », *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1966, **19** (4) : 495-510.
- DOUTRE (M. P.), « Première observation du botulisme C beta chez le porc au Sénégal », *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1967, **20** (2) : 351-53.

10. DOUTRE (M. P.), « Botulisme de type C chez une tourterelle (*Streptopelia roseogrisea*) du Ferlo (Sénégal) », *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1967, **20** (4) : 601-04.
11. DOUTRE (M. P.), « Le botulisme animal au Sénégal », *Bull. Off. int. Epizoot.*, 1967, **67** (11-12) : 1497-1515.
12. DOUTRE (M. P.), « Première observation de botulisme animal de type D au Sénégal », *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1969, **22** (1) : 25-27.
13. DOUTRE (M. P.), « Fréquence au Sénégal du botulisme animal d'origine hydrique », *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1969, **22** (1) : 29-31.
14. DUMAS (J.), « Précis de bactériologie médicale », Paris, Flammarion, 1951 (mises à jour p. 705 c : travaux de PREVOT et BRYGOO).
15. HARE (F.), « Botulism and encephalomyelitis in horses », *J. Amer. vet. Med. Assoc.*, 1940, **96** : 101-02.
16. JACQUET (J.), PREVOT (A. R.), « Recherches sur le botulisme équin expérimental », *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **81** : 334-37.
17. JACQUET (J.), PREVOT (A. R.), « Le botulisme expérimental du cheval provoqué par la toxine D. Evolution et essai de sérothérapie », *Bull. Acad. vét. France*, 1952, **25** : 246-53.
18. JACQUET (J.), PREVOT (A. R.), « Le botulisme expérimental du cheval provoqué par la toxine D. Symptômes, pathogénie, diagnostic, lésions », *Bull. Acad. vét. France*, 1953, **26** : 135-40.
19. JACQUET (J.), « Sur le botulisme équin et notamment le botulisme expérimental provoqué à l'aide de la toxine », *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 1955, **42** : 473-81.
20. LAPCEVIC (E.), « L'intoxication des chevaux par le botulisme », *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 1954, **42** : 507-13.
21. LE METAYER (E.), NICOL (L.), GIRARD (O.) et collab., « Recherches sur le botulisme expérimental chez le cheval. Discussion », *Bull. Acad. vét. France*, 1953, **26** : 391-99.
22. MÜLLER (J.), « Equine and bovine botulism in Denmark », *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 1963, **59** (9-10) : 1379-90.
23. PREVOT (A. R.), ROSSI (P.), « Recherches sur trois souches de *Clostridium botulinum D* », *Bull. Acad. vét. France*, 1948, **21** : 386-89.
24. PREVOT (A. R.), BRYGOO (E. R.), « Etude de la première souche française de *Clostridium botulinum D* », *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **78** : 274-76.
25. PREVOT (A. R.), HUET (M.), TARDIEUX (P.), « Etude de vingt-cinq foyers récents de botulisme animal », *Bull. Acad. vét. France*, 1950, **23** : 481-87.
26. PREVOT (A. R.), SILLIOC (R.) et GAY (H.), « Etude d'un foyer de botulisme équin de type C », *Rec. Méd. vét.*, 1954, **130** : 353-55.
27. VERGE (J.), POGGIOLI (C.), « Un foyer de botulisme équin dans l'Oise. Discussion », *Bull. Acad. vét. France*, 1951, **24** : 509-17.
28. WILLEMS (R.), « Le botulisme du cheval », *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 1954, **42** : 482-95.