

**Laboratoire Ploufragan-  
Plouzané-Niort**

A l'attention des laboratoires vétérinaires

Ploufragan, le 19 avril 2022

**Unité Hygiène et Qualité des  
Produits Avicoles et Porcins**

**Objet : Appel à manifestation d'intérêt pour le transfert de la  
méthode de détection de *C. botulinum* par PCR en temps réel dans  
le cadre du diagnostic de botulisme bovin et aviaire**

**Dossier suivi par :**

Caroline Le Maréchal

**Ligne directe :**

02 96 01 85 33

**E- mail :**

Caroline.lemarechal@anses.fr

**N. Réf. ./**

**V. Réf. ./**

Cet appel à manifestation d'intérêt vise le transfert de la méthode de détection de *C. botulinum* par PCR en temps réel dans le cadre du diagnostic de botulisme aviaire et de botulisme bovin vers les laboratoires vétérinaires qui souhaiteraient mettre en œuvre ces analyses. Ce transfert est organisé par le Laboratoire National de Référence (LNR) pour le botulisme aviaire sur la base du volontariat des laboratoires intéressés par la mise en place de cette méthode. La formation se déroulera en deux parties : une partie théorique et une partie pratique.

La liste des équipements nécessaires à la mise en œuvre de la méthode qui a été développée et validée par le LNR selon la norme NF U 47-600-2 est jointe à ce courrier. Les modes opératoires sont disponibles sur demande auprès du LNR botulisme aviaire.

Afin d'assurer sa mission de surveillance du botulisme animal sur le territoire et de détecter de manière précoce d'éventuelles émergences, il sera demandé aux laboratoires qui effectueront ces analyses de transmettre les résultats de détection obtenus au LNR botulisme aviaire ainsi que sur demande du LNR de transmettre le matériel biologique qui se révélerait nécessaire dans le cadre d'investigations complémentaires.

Nous rappelons que *C. botulinum* et la toxine botulique font partie de la liste des micro-organismes et toxines hautement pathogènes (« MOT », tels que définis dans l'arrêté du 30 avril 2012 modifié fixant la liste des micro-organismes et toxines prévue à l'article L. 5139-1 du Code de la Santé Publique) et que seules « les opérations autres que la cession, l'importation et l'exportation réalisées par les



établissements recevant des échantillons biologiques aux seules fins d'analyse de biologie médicale ou vétérinaire » font l'objet d'une dispense d'autorisation dans le cadre de cette réglementation. Par ailleurs, il est rappelé que « cette dispense vaut seulement pour les échantillons biologiques conservés moins de trente jours au sein de ces établissements, sauf décision contraire du ministre chargé de la santé, du juge administratif ou du juge judiciaire de diagnostic vétérinaire » (article R5139-2 du code de la santé publique). Le transfert de méthode ne s'appliquera donc que dans le cadre de la réalisation du diagnostic du botulisme animal à partir de l'analyse d'échantillons prélevés sur des animaux. Toute autre opération (détention de *C. botulinum*, analyse d'échantillons autres que ceux de biologie vétérinaire) nécessite de détenir une autorisation.

Si vous êtes intéressés par cet AMI, je vous prie de nous en informer par courriel ([caroline.lemarechal@anses.fr](mailto:caroline.lemarechal@anses.fr)), pour le 31 mai 2022 au plus tard.

Caroline Le Maréchal  
Responsable du LNR botulisme aviaire

## Contexte de transfert de la méthode de détection de *C. botulinum* par PCR en temps réel pour le diagnostic du botulisme aviaire et du botulisme bovin et cahier des charges

### Contexte

Le botulisme animal est une affection nerveuse due à l'action de la toxine botulique, principalement produite par la bactérie *Clostridium botulinum*. Le botulisme touche de nombreuses espèces animales mais ce sont essentiellement les espèces d'oiseaux domestiques et sauvages et les bovins qui sont concernés en France.

Cette maladie était classée en danger sanitaire de première catégorie pour toutes les espèces sensibles selon l'arrêté ministériel du 29 juillet 2013, et donc à prophylaxie et à déclaration obligatoires gérées par l'État. L'entrée en application de la « Loi de Santé Animale » le 21 avril 2021 (Règlement UE N° 429/2016) a modifié cette catégorisation, le botulisme ne faisant pas partie des maladies animales listées dans ce texte. La catégorisation du botulisme animal parmi les maladies d'intérêt nationale est actuellement en cours de réflexion.

Des épisodes de botulisme animal étant confirmés régulièrement à l'échelle du territoire national, il y a un besoin sur le terrain de laboratoires vétérinaires qui soient en capacité de réaliser rapidement les analyses nécessaires au diagnostic de première intention qui consiste à détecter la présence *Clostridium botulinum* dans les prélèvements réalisés sur les animaux symptomatiques dans l'optique de confirmer le diagnostic établi sur la base de l'observation des signes cliniques.

### Cahier des charges

La méthode développée et validée par le LNR botulisme aviaire nécessite de disposer de certains équipements indispensables à la mise en œuvre de la méthode :

- Balance de pesée (allant de 1 g à 500 g, précision 0,1 g),
- Equipement permettant d'homogénéiser les échantillons à l'issue de la prise d'essai (broyeur homogénéisateur),
- Equipement permettant l'incubation des échantillons en conditions anaérobies à 37°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) (station anaérobie, jarre et enceinte ventilée)
- Equipement permettant de réaliser des incubations à 37°C, 56°C, 80°C, 95°C pour les étapes d'extraction d'ADN (bain-Marie, bloc chauffant),
- Au moins un poste de sécurité microbiologique (PSM),
- Centrifugeuse
- Thermocycleur pour réaliser des PCR temps réel avec un EMT de 1°C.
- Congélateur ( $< -16^\circ\text{C}$ )
- Réfrigérateur ( $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ )



### Principe général de la méthode

La méthode consiste en une étape de mise en enrichissement de l'échantillon à analyser par une dilution au dixième de celui-ci dans un bouillon non sélectif, suivie d'une étape d'incubation en conditions anaérobies à 37°C puis d'une extraction d'ADN pour finir par la détection des gènes codant pour les toxines botuliques par une PCR en temps réel. Cette méthode fait donc appel à la fois à de la microbiologie et de la biologie moléculaire. Le mode opératoire détaillé est disponible auprès du LNR botulisme aviaire sur demande.