

20000 558

# Le botulisme des ruminants et des équidés au Sénégal

## Caractères de la souche isolée de *Clostridium botulinum* et de sa toxine

par

M. P. DOUTRE et J. CHAMBRON  
(avec la collaboration technique de I. FAYE)

### RÉSUMÉ

*Clostridium botulinum* type C a été isolé du foie d'un bovin sacrifié à la période agonique alors qu'il présentait tous les symptômes de l'intoxication botulique aiguë telle qu'on peut la rencontrer dans le Ferlo chez les animaux en état d'aphosphorose. Les différents lots de toxine préparés à partir de la souche isolée par les méthodes de culture classique ont présenté une toxicité allant de 10.000 à 150.000 DMM/souris par ml. La culture du germe par dialyse en sac de cellophane a fourni une toxine titrant  $2,5 \times 10^6$  DMM/souris par ml.

Dans une publication précédente (\*), la double étiologie de l'affection animale observée au Sénégal, dans la région du Ferlo, et connue localement sous le nom de « Gniedo », a été mise en évidence. Brièvement, elle peut être représentée par le schéma suivant :

Carence minérale (hypophosphorose) → Ostéophagie → Botulisme.

L'importance reconnue au botulisme se voyait alors confirmée sur le plan bactériologique par l'obtention de deux résultats suffisamment démonstratifs mais incomplets :

— la révélation d'une toxine dans un filtrat de culture mixte effectuée à partir d'un fragment d'anse intestinale, avec perte de la toxicité dans les subcultures,

— la réussite d'une séro-neutralisation qualitative de cette toxine chez la souris en présence d'un mélange des antisérums des types C et D.

Dans le travail qui suit, nous nous proposons de rapporter les données nouvelles recueillies concernant le germe en cause, *Clostridium botulinum* et sa toxine.

### MATÉRIEL

Les prélèvements utilisés au laboratoire de Dakar ont été effectués au cours d'une tournée accomplie dans la région dite des « six forages » en mai 1965. Les zones de Lagbar, Tessekré, Yaré Lao et Dodji ont été visitées afin de récolter le matériel d'étude.

Ce dernier est constitué essentiellement par des fragments de foie, d'anse intestinale et de masse musculaire provenant : d'un mouton abattu sur notre demande, de sept bovins morts depuis moins de 48 heures ou sacrifiés à la période agonique et d'un âne déjà enterré et exhumé par les propriétaires. Ainsi, 14 prélèvements d'organes ont été rassemblés et mis immédiatement dans des flacons d'un litre. Un contai-

(\*) Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop., 1965, 3, 249-282.

ner isotherme, rempli de pains de glace, a permis d'assurer une conservation à basse température sur le terrain et lors du transport à Dakar.

### MISE EN ÉVIDENCE DE LA TOXINE BOTULIQUE DANS LES PRÉLÈVEMENTS

Pour chaque prélèvement, 60 g de matières solides sont triturées au mortier dans 60 ml d'eau distillée en présence de sable fin stérile. Chaque broyat est ensuite centrifugé à 3.000 tours/mn pendant 10 mn puis filtré sur filtre Seitz EKS I. La stérilité des filtrats recueillis est vérifiée par ensemencement d'un bouillon VF glucosé mis à l'étuve pendant 48 heures à 37 °C.

Chaque filtrat sert à inoculer un lot de 5 souris par voie intra péritonéale (0,20 ml).

#### Résultats.

Les souris inoculées avec 5 filtrats différents succombent en moins de deux jours après avoir présenté les symptômes typiques du botulisme chez cette espèce. Les souris inoculées avec les 9 autres ne manifestent aucune mortalité.

Le filtrat le plus toxique pour la souris s'avère provenir d'un foie de zébu sacrifié par les éleveurs sur notre instance (Yaré Lao).

Le tableau clinique qu'offrait cet animal avait tout particulièrement attiré notre attention (ptyalisme intense et paralysie de la langue). A la dilution limite du 1/80, le filtrat tue encore la souris.

Par la suite, au cours des travaux ultérieurs, nous avons uniquement utilisé comme matériel le prélèvement de foie à partir duquel avait été préparé ce filtrat.

### OBTENTION D'UNE TOXINE DE CULTURE MIXTE

#### Technique.

Un morceau de foie est trituré comme précédemment en eau distillée. Pour réduire le nombre des germes de contamination particulièrement important, nous nous sommes finale-

ment contentés de faire appel à la thermorésistance de la spore de *Clostridium botulinum*. Le broyat, recueilli dans un tube à essai, est chauffé 5 minutes à la température de 100 °C. Puis une partie de ce produit sert à ensemencer un ballon de 100 ml de bouillon pour anaérobies (Cooked Meat Medium Difco, B 267).

Après 6 jours de conservation à l'étuve à 37 °C, la culture mixte est centrifugée puis filtrée sur filtre Seitz EKS I.

La stérilité du filtrat est contrôlée par ensemencement d'un tube de bouillon VF glucosé avant inoculation de 5 souris par voie intrapéritonéale (0,20 ml).

#### Résultats.

Les 5 souris meurent en moins de 24 heures.

D'autres espèces animales reçoivent alors différentes quantités du même filtrat par des voies diverses :

Cobaye (1 ml par voie intrapéritonéale). L'animal présente une paralysie flasque généralisée (photo n° 1) et succombe dans les 24 heures.

Lapin (1 ml par voie intrapéritonéale). Le lapin meurt dans les 48 heures après avoir montré les symptômes de l'intoxication botulique (photo n° 2).

Pigeon [(0,25 ml par voie intramusculaire). Moins de 24 heures après l'inoculation, l'oiseau se paralyse, la tête pend et les membres antérieurs s'étendent (photo n° 3). La mort survient avant la fin du 2<sup>e</sup> jour.

Canard de Barbarie (1 ml par voie intramusculaire). Au bout de 3 jours, seuls les mouvements des ailes sont permis. Le canard demeure couché, les ailes à plat sur le sol (photo n° 4), mais ne succombe pas. Ce fait a déjà été rapporté par DADOT lors d'un foyer de botulisme apparu chez cette espèce dans le nord de la France (12).

Bovin (2 ml par voie sous-cutanée). Au bout de 5 jours, un ptyalisme intense se déclare et la langue paralysée sort de la bouche (photo nos 5 et 6), 48 heures plus tard la mort survient. Cette inoculation a permis de reproduire pour la première fois le botulisme expérimental chez le zébu au Sénégal.



Photo 1. — Cobaye paralysé ayant reçu 1 ml du filtrat de culture mixte



Photo 2. -Lapin paralysé ayant reçu 1 ml du filtrat de culture mixte

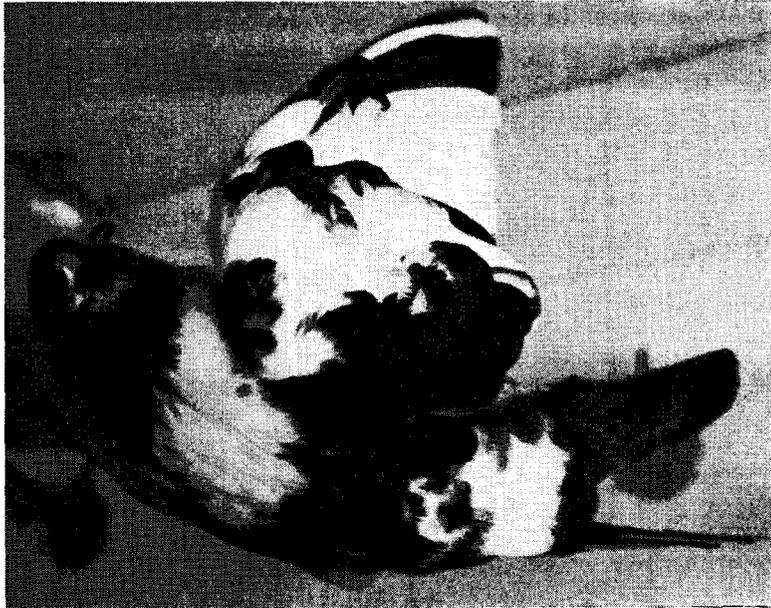


Photo 3. — Pigeon paralysé ayant reçu 0,25 ml du filtrat de culture mixte



Photo 4. — Canard de Barbarie ayant reçu 1 ml du filtrat de culture mixte



Photos 5 et 6. — Bouvillon ayant reçu 1 ml du filtrat de culture mixte. Symptômes présentés 5 jours après l'inoculation : paralysie des membres et de la langue, ptialisme.

## ISOLEMENT DE *CLOSTRIDIUM BOTULINUM*

Technique.

Les milieux suivants ont été utilisés :

Milieu liquide : Cooked Meat Medium Difco, B 267, réparti sous 1 cm d'huile de vaseline en tubes de 18.

Milieu solide : Brain Heart Infusion Agar Difco, B 418, réparti en tubes de 8/180 mm, sur une hauteur de 10 cm.

Nous avons eu recours comme méthode d'isolement à la technique classique des passages successifs dans des tubes de gélose profonde, maintenue à 50 °C, d'une pipette Pasteur préalablement introduite dans une culture en bouillon. En cas d'échec, nous nous réservions d'employer le procédé d'isolement, préconisé par BEERENS, sur boîtes de Pétri placées en état d'anaérobiose (4).

Une subculture de la culture mixte précédente constitue le matériel initial. Après 48 heures de mise à l'étuve à 37 °C, cette subculture contient outre le germe recherché, *Clostridium botulinum*, différents autres microbes anaérobies dont la spore a pu résister au traitement thermique. A ce stade, plusieurs séries de tubes de gélose profonde sont ensemencés suivant le processus décrit ci-dessus et mis à l'étuve.

48 heures plus tard, dans les tubes où l'isolement s'avère possible, des colonies différentes sont prélevées stérilement à la pipette, par aspiration après rupture de la paroi de verre, et repiquées en bouillon anaérobie.

Après 24 heures d'étuve, la pureté de ces dernières cultures en bouillon est vérifiée par examen direct et coloration au Gram. Les cultures pures sont alors gardées 5 jours de plus à l'étuve à 37 °C, afin de permettre l'obtention d'un filtrat stérile immédiatement inoculé à un lot de 5 souris. La filtration est précédée d'un repiquage en milieu liquide qui permet la conservation de la souche isolée.

Résultat.

A la suite d'un travail relativement long, nous avons ainsi obtenu le premier filtrat contenant la toxine botulique de culture pure et la souche de *Clostridium botulinum* responsable de sa production.

### CARACTÈRES DU *CLOSTRIDIUM* BOTULINUM ISOLÉ

#### A) Caractères morphologiques

La morphologie du germe est classique.

Dans les milieux nutritifs suffisants (Cooked Meat Medium Difco, B267, bouillon VF glucosé

à 2 p. 1.000), il se présente sous la forme de bâtonnets de 4 à 6  $\mu$  de long sur 0,9 à 1,2  $\mu$  de large, à bouts arrondis. Les éléments sont soit isolés, soit assemblés par deux ou en courtes chaînettes (photo n° 7). Dans les vieilles cultures, apparaissent des formes filamenteuses.

Dans les milieux liquides défavorables (A C Medium Difco, B 316 répondant à la composition suivante : pour 1.000 : extrait de viande 3 g, extrait de levure 3 g, extrait de malt 3 g, peptone 20 g, glucose 5 g, gélose 1 g, acide ascorbique 0,2 g, et le milieu à la cystéine constitué par : pour 1.000 : peptone tryptique 10 g, extrait de viande 3 g, glucose 2 g, chlorure de sodium 2 g, chlorhydrate de cystéine 0,5 g), le germe est plus gracile avec des formes incurvées et filamenteuses beaucoup plus abondantes (photo n° 8) ; repiqué ensuite en bouillon VF glucosé à 2 p. 1.000, il reprend sa morphologie habituelle.

Il retient difficilement la coloration de Gram. Bien que cilié, il semble immobile.

Les spores sont du type déformant et subterminal (photo n° 9). Elles se manifestent avant la 24<sup>e</sup> heure de culture dans un milieu de culture convenable. La sporulation est presque totale au bout de 6 jours dans le bouillon Cooked

Meat Medium Difco, B 267. Dans le bouillon VF glucosé à 2 p. 1.000, elle est loin d'être achevée au bout de ce temps. Enfin, elle est nulle en milieu A C Difco, B 316, et dans le bouillon à la cystéine décrit ci-dessus.

#### B) Toxinogénèse, typage

Afin de déterminer le type du *Clostridium botulinum* isolé et la toxicité de la toxine produite chez différentes espèces de laboratoire et chez les bovins, un lot de toxine a été préparé.

Une culture en bouillon VF glucosé à 10 p. 1.000 a été centrifugée (3.000 tours/mn pendant 20 minutes) après 6 jours de mise à l'étuve à 35 °C, puis filtrée sur filtre Seitz EKS I. La stérilité du filtrat a été contrôlée comme précédemment.

Les filtrats de culture du germe dans le milieu A C Difco, B 316, et dans le bouillon cystéiné se sont révélés totalement atoxiques pour la souris (0,20 ml par voie intrapéritonéale).

Le titre du lot de toxine ainsi obtenu en bouillon VF glucosé a été préalablement déterminé chez la souris (nombre de DMM/souris par ml, cf. chapitre : pouvoir toxique pour différentes espèces animales).

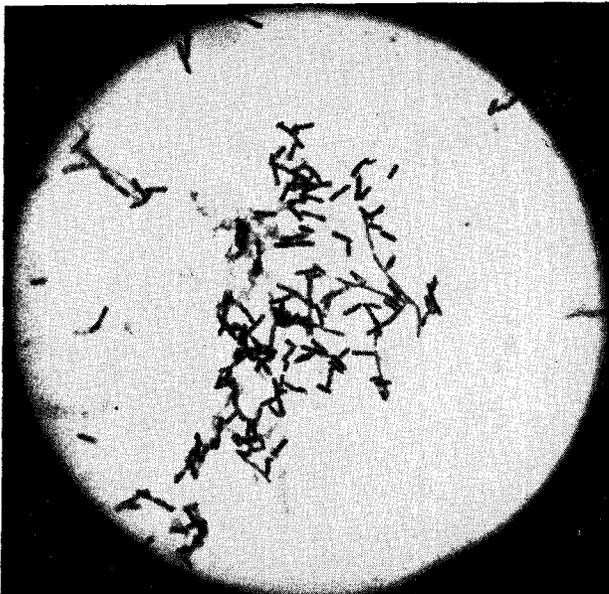


Photo 7. — Culture de *Cl. botulinum* C en bouillon VF glucosé au bout de 24 h

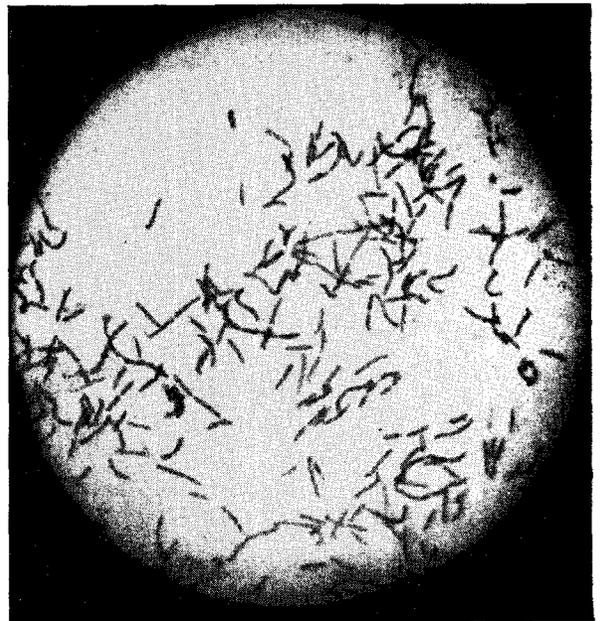


Photo 8. — Culture de *Cl. botulinum* C en milieu AC Difco B 316

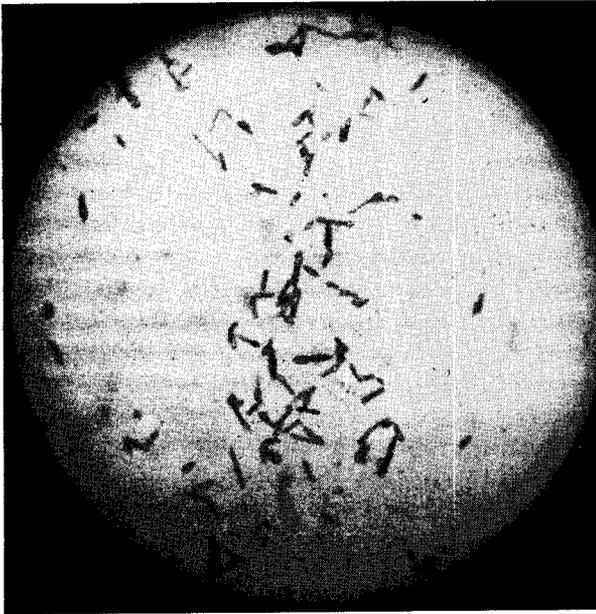


Photo 9. — Formes sporulées et spores de *Cl. botulinum* C en bouillon VF glucosé au bout de 4 jours de culture

Le typage a été effectué à l'aide des 5 antisérum A, B, C, D et E délivrés par l'Institut Pasteur de Paris.

5 lots de 5 souris ont reçu par voie intrapéritonéale 0,20 ml du mélange toxine-antitoxine de chacun des types préalablement porté 45 minutes à 37 °C. Pour chaque type, 1 unité antitoxique (U.A.) était mise en présence de 100 DMM/souris.

#### Résultats.

Seules les souris ayant reçu le mélange toxine-antitoxine C ont survécu. La totalité des souris appartenant aux 4 autres lots a succombé. Les souris inoculées avec le mélange toxine-antitoxine D sont mortes les dernières ; ce fait s'explique par la communauté antigénique partielle, bien connue, des types C et D.

Il est désormais possible d'affirmer que le type C de *Clostridium botulinum* est responsable des cas de botulisme observés dans le Ferlo. Toutefois, le type D peut très bien être isolé au cours de recherches ultérieures ; l'association des types C et D, constatée en Afrique du Sud, constitue une hypothèse qui justifie la poursuite des isolements (\*).

(\*) Cette souche a été identifiée comme appartenant au type C $\beta$ , par le Professeur R. PREVÔT, du service des anaérobies de l'Institut Pasteur de Paris, que nous remercions très vivement de cet examen.

### C) Cultures

Les caractères culturels observés de la souche isolée ont été les suivants :

Gélose profonde (glucosée à 2 p. 1.000) : colonies lenticulaires devenant irrégulières, production de gaz. Ce dernier caractère est en désaccord avec les données classiques (16).

Gélose profonde au sang : colonies lenticulaires devenant irrégulières, non hémolytiques.

Gélose profonde cœur-cerveau glucosée, Difco, B 418 : colonies lenticulaires devenant irrégulières. Légère production de gaz.

Bouillon ordinaire : trouble homogène puis apparition de flocons.

Bouillon VF glucosé à 2 p. 1.000 : culture dense floconneuse qui sédimente. Production de gaz. Odeur putride.

Bouillon cystéiné : léger flocon dans le fond du tube, la masse du milieu demeurant limpide.

Milieu de Rosenow : bonne culture qui sédimente, non-production de gaz, pas de décoloration.

Gélatine de Kohn : liquéfiée. Pour le type C $\beta$ , DOLMAN et MURAKAMI signalent au contraire que la gélatine n'est pas attaquée.

Lait : digéré.

Blanc d'œuf en bouillon VF : non attaqué.

Cerveau en bouillon VF : non attaqué.

Glucides : Nous avons étudié l'action de la souche isolée sur les glucides selon la méthode préconisée par H. BEERENS du service des anaérobies de l'Institut Pasteur de Lille.

Le milieu de base utilisé répond à la composition suivante :

Peptone tryptique	10	g
Chlorure de sodium	5	g
Extrait de viande	3	g
Extrait de levure	5	g
Chlorhydrate de cystéine	0,40	g
Agar en poudre	0,60	g
Eau du robinet	1.000	ml

A ce milieu de base est ajouté 1 p. 100 d'hydrate de carbone sous forme de solution stérilisée par filtration.

Après régénération, les différents sucres sont ensemencés à l'aide d'une culture de 24 heures en milieu de Rosenow. La quantité d'inoculum est importante, elle se situe entre 0,5 et 1 ml. Au bout de 48 heures, l'acidification est révélée

par adjonction dans chacun des tubes de quelques gouttes de l'indicateur universel de pH Prolabo.

Résultats : Dans ces conditions, le glucose, l'amidon, le glycérol, le lactose, le maltose, le mannitol, le saccharose et la salicine ne sont pas fermentés.

Ces observations recourent les données de DOLMAN et MURAKAMI. Pour ces auteurs, *Clostridium botulinum* C<sub>β</sub> ne fermente aucun des sucres suivants : Maltose, saccharose, galactose, sorbitol, glycérol, dextrine, salicine, inositol, adonitol.

Le glucose et le fructose peuvent parfois être acidifiés avec une très légère production de gaz par certaines souches.

Le type C<sub>α</sub> fermente au contraire certains sucres : le glucose, le fructose, le maltose, le glycérol, la dextrine, l'inositol et le galactose. Ne sont pas attaqués par ce type le sorbitol, le saccharose, la salicine et l'adonitol.

On peut remarquer que la souche de *Clostridium botulinum* C<sub>β</sub> isolée offre la même action sur les sucres que *Clostridium histolyticum*. Toutefois le test à la gélatine décrit par H. BEERENS et J. GUILLAUME et le Colonel PONTE permet de différencier les deux germes. Le test consiste à ensemercer avec le germe étudié un tube de milieu de Rosenow régénéré auquel ont été ajoutés 3 ml de gélatine. Seul *Clostridium histolyticum* produit une importante quantité d'ammoniaque, par désamination, au cours de son développement.

#### D) Physiologie

Pouvoir réducteur faible, ne réduit ni le rouge neutre, ni la safranine.

#### E) Biochimie

Nitrates et sulfites non réduits.

### CARACTÈRES DE LA TOXINE

#### A) Résistance

La toxine C est détruite par un chauffage de 10 à 15 minutes à 100 °C. Diverses protéines atténuent ou inactivent la toxine botulique C (43). Les antitoxines non spécifiques et les sérums

normaux en particulier ont un pouvoir neutralisant assez marqué. L'action de l'ovalbumine est très nette, celle de la gélatine et du sérum chauffé est nulle.

JUDE, GIRARD et CARRAT (27) ont étudié l'action destructrice sur la toxine D du permanganate de potassium, de l'hypochlorite de soude, d'un dérivé organique de l'iode (Triglycine hydroperiodide) et d'un dérivé d'ammonium quaternaire (chlorure de duodécyl-amidométhylène-diméthyl-benzyl-ammonium). Nous nous proposons de rechercher prochainement l'effet de certaines substances antiseptiques sur la toxine C produite par la souche isolée au Sénégal.

Un premier lot expérimental d'anatoxine a été produit par action du formol à 8 p. 1.000 à 40 °C sur un filtrat de culture de 6 jours en bouillon VF. Le temps nécessaire à l'inactivation a été de 20 jours.

#### B) Pouvoir toxique pour différentes espèces animales

La toxicité de la souche isolée a été étudiée pour plusieurs toxines de culture obtenues de façons diverses. Les résultats sont rapportés dans l'ordre de déroulement de l'expérimentation.

1<sup>o</sup> Lot de toxine n<sup>o</sup> 1 : constitué par un filtrat de culture de 6 jours, en bouillon VF glucosé à 10 p. 1.000, en ballon de 250 ml.

Toxicité pour la souris : La DMM/souris se situe au voisinage de 0,000 1 ml, soit 10.000 DMM/ml pour des souris de 18-20 g inoculées par voie intrapéritonéale.

LAMANNA, JENSEN et BROSS (31) ont montré que le titre d'une solution de toxine botulique C ne varie pas en fonction du poids des souris inoculées. D'où il ressort que pour cette espèce, il est erroné d'exprimer la toxicité en ml de toxine par kg de poids vif.

Toxicité pour le cobaye (tableau I). La DMM/cobaye est voisine de 20 DMM/souris, soit 0,003 ml de toxine par kg de poids vif. Les cobayes utilisés ont été inoculés par voie intrapéritonéale.

Toxicité pour le lapin (tableau II). La DMM/lapin équivaut à environ 40 DMM/souris, ce qui correspond dans les essais effectués à 0,0026 ml de toxine par kg de poids vif. Les différentes

TABLEAU N°I

Titration de la toxine chez le cobaye (lot de toxine n°1)

Cobaye N°	Poids (kg)	Toxine pure (ml)	quantité toxine par kg poids vif (ml/kg)	Nombre DMM/souris	Résultats
1363	0,368	0,6	1,6304	6.000	mort en moins de 24 h.
1365	0,364	0,4	1,0989	4.000	mort en moins de 24 h.
773	0,316	0,2	0,6329	2.000	mort en moins de 24 h.
1364	0,377	0,1	0,2652	1.000	mort en 24 h.
1367	0,353	0,09	0,2549	900	mort en 36 h.
771	0,372	0,07	0,1881	700	mort en 26 h.
1368	0,339	0,05	0,1474	500	mort en 29 h.
774	0,342	0,04	0,1169	400	mort en 28 h.
775	0,349	0,03	0,0859	300	mort en 29 h.
1370	0,361	0,02	0,0554	200	mort en 36 h.
1369	0,439	0,0175	0,0398	175	mort en 48 h.
1362	0,466	0,0150	0,0322	150	mort en 48 h.
1361	0,507	0,0125	0,0246	125	mort en 48 h.
1366	0,514	0,0100	0,0195	100	mort en 50 h.
778	0,386	0,0075	0,0194	75	mort en 3 jours
777	0,310	0,0050	0,0161	50	mort en 3 jours
776	0,346	0,0040	0,0116	40	mort en 3 jours
772	0,416	0,0030	0,0072	30	mort en 3 jours
766	0,650	0,0020	0,0031	20	paralysé au bout de 6 jours mort le 8ème jour.
769	0,789	0,0010	0,0013	10	a survécu.

dilutions de toxine ont été injectées par voie intrapéritonéale.

Toxicité pour le zébu (tableau III). La DMM/zébu est voisine de 1.500 DMM/souris, soit environ 0,001 ml de toxine par kg de poids vif, inoculée par voie sous-cutanée. En dehors de l'abattement, le ptyalisme est le premier symptôme qui apparaît lors de l'inoculation d'une dose létale de toxine par voie sous-cutanée chez cette espèce animale (15). La plus grande sensibilité des bovins à la toxine botulique C est un fait bien connu (62).

2° Lot de toxine n° 2 : constitué par un filtrat de culture de 6 jours en bouillon VF glucosé à 10 p. 1.000, en erlenmeyer de 2 l.

Toxicité pour la souris : la DMM/souris est de 0,000 01 ml, soit 100.000 DMM/souris par ml, pour des souris inoculées dans les mêmes conditions que précédemment.

Toxicité pour le cobaye : 0,0003 ml/kg par voie intrapéritonéale.

Toxicité pour le lapin : 0,0002 ml/kg par voie intrapéritonéale.

Toxicité pour le zébu : 0,0001 ml/kg par voie sous-cutanée.

3° Lot de toxine n° 3 : constitué par un filtrat de culture de 6 jours en bouillon VF glucosé à 10 p. 1.000, auquel était ajouté du chlorhydrate de cystéine au taux de 0,5 g p. 1.000. La culture était effectuée en erlenmeyer de 100 ml.

TABLEAU N°II

Titration de la toxine chez le lapin (lot de toxine n° 1)

Lapin N°	Poids (kg)	Toxine pure (ml)	Quantité toxine par kg poids vif (ml/kg)	Nombre DMM/souris	Résultats
767	2,090	1,0	0,478	10.000	mort en moins de 24 h.
761	2,35	0,8	0,340	8.000	mort en moins de 24 h.
770	2,075	0,6	0,289	6.000	mort en moins de 24 h.
762	1,790	0,4	0,223	4.000	mort en moins de 24 h.
768	2,150	0,2	0,093	2.000	mort en moins de 24 h.
765	1,840	0,1	0,054	1.000	mort en moins de 24 h.
758	1,930	0,09	0,0466	900	mort en 27 h.
757	2,080	0,07	0,0336	700	mort en 27 h.
760	2,140	0,05	0,0233	500	mort en 25 h.
747	1,800	0,04	0,0222	400	mort en 29 h.
746	2,080	0,03	0,0144	300	mort en 40 h.
748	1,360	0,02	0,0147	200	mort en 40 h.
792	1,520	0,015	0,0098	150	mort en 4 jours
791	1,890	0,010	0,0053	100	mort en 4 jours
790	1,890	0,005	0,0026	50	mort en 7 jours
763	1,320	0,004	0,0030	40	mort en 5 jours
782	1,475	0,003	0,0020	30	a survécu
781	1,940	0,002	0,0010	20	a survécu
785	2,500	0,001	0,0004	10	a survécu

TABLEAU N°III

Titration de la toxine chez le zébu (lot de toxine n°1)

Zébu N°	Poids (kg)	Toxine pure (ml)	Quantité toxine par kg de poids (ml/kg)	Nombre DMM/souris	Résultats
759	131	2	0,0152	20.000	mort en 2 jours $\frac{1}{2}$
751	113	1,5	0,0132	15.000	mort en 3 jours $\frac{1}{2}$
752	141	1,0	0,0070	10.000	mort en 3 jours $\frac{1}{2}$
753	143	0,5	0,0034	5.000	mort en 6 jours
749	145	0,4	0,0027	4.000	mort en 7 jours
799	139	0,3	0,0021	3.000	ptyalisme 5 jours après mort en 21 jours
754	118	0,2	0,0016	2.000	mort au bout d'un mois
755	141	0,15	0,0010	1.500	mort au bout de 28 jours
756	126	0,10	0,0007	1.000	n'a présenté aucun symptôme

Toxicité pour la souris : La DMM/souris se situe au voisinage de 0,000 006 ml, soit environ 150.000 DMM/souris par ml, par voie intrapéritonéale.

Toxicité pour le cobaye : voisine de 0,000 1 ml/kg, par voie intrapéritonéale.

Toxicité pour le lapin : voisine de 0,000 09 ml/kg, par voie intrapéritonéale.

4<sup>o</sup> Lot de toxine n<sup>o</sup> 4 : Afin de réaliser la préparation prochaine d'une anatoxine destinée à vacciner les animaux du Ferlo, nous nous sommes efforcés d'obtenir une toxine de très haut titre en appliquant la technique des cultures en sac de cellophane mise au point par STERNE et WENTZEL (58) et reprise par différents auteurs (52, 65, 66).

Le milieu utilisé est du bouillon VF cystéiné (0,5 g p. 1.000) auquel est adjoint, après autoclavage, 10 p. 1.000 de glucose stérilisé par filtration. Le montage du dispositif de culture est réalisé dans un flacon de 5 litres (figure 1). Le tube de cellophane appartient à la marque Visking, SS de précision, n<sup>o</sup> 100, largeur à plat 130,7 mm (Viscosa) (\*).

L'autoclavage (30 mn à 120 °C) porte sur l'appareil rempli de milieu avec le sac de cellophane contenant du sérum physiologique jusqu'au 1/3 de sa hauteur.

La récolte de la toxine s'effectue 8 jours après l'ensemencement de l'intérieur du sac.

(\*) Etablissements SOPHYC, 4 rue du Dr Dumont, Levallois, Seine.

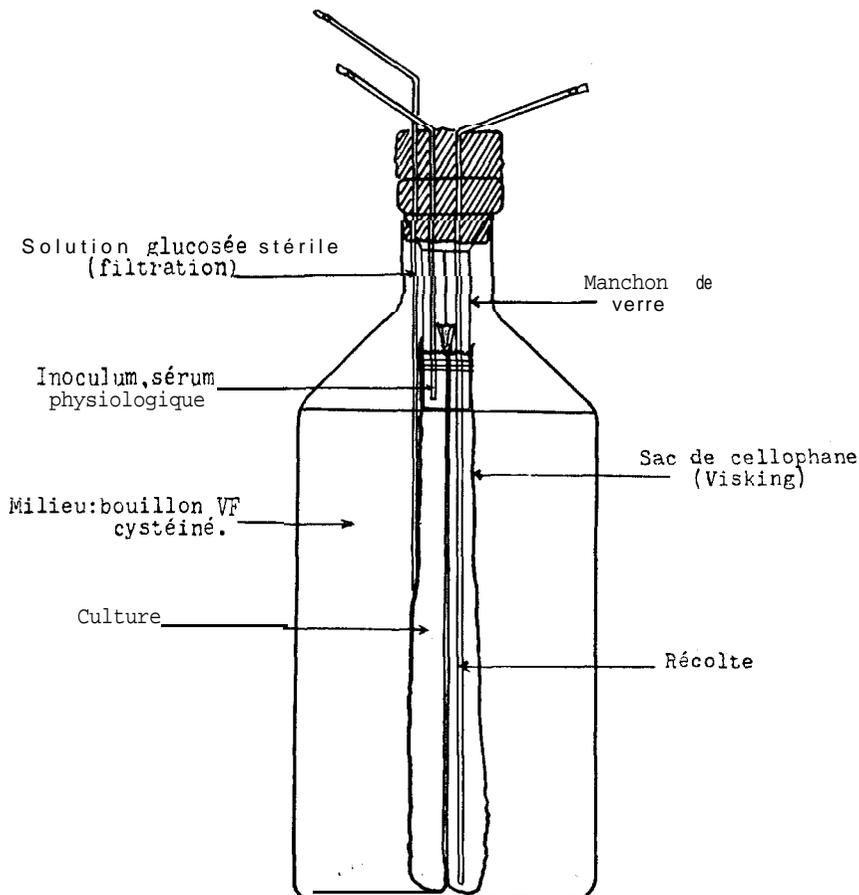


Figure I.- Culture de Clostridium botulinum type C en sac de cellophane.

Résultat.

Dans ces conditions de culture du germe par dialyse, la toxine obtenue titre  $2,5 \times 10^6$  DMM/souris par ml.

### CLOSTRIDIUM BOTULINUM TYPE C ET BOTULISME HUMAIN

Nous tenons à aborder brièvement cette question, car il est d'usage courant dans le Ferlo que les éleveurs abattent les animaux atteints de la « maladie des forages » avant qu'ils ne succombent et que la viande soit consommée. Les coutumes alimentaires font que la viande de boeuf soit le plus souvent bouillie ; celle du mouton est parfois grillée. Dans ces conditions, la toxine relativement thermolabile est détruite.

Néanmoins, nous pensons utile d'attirer l'attention sur ce problème en rappelant que le botulisme humain de type C a déjà fait l'objet d'au moins trois descriptions. En 1953, un cas a été rapporté par MEYER et Coll. (33), la recherche de l'aliment causal fut confuse et demeura sans résultat.

Le second exemple date de 1955 et nous le devons à PREVOT (43) et Coll., deux personnes présentèrent un botulisme typique à la suite de l'ingestion d'un pâté de campagne et Clostridium botulinum type C fut isolé de cette charcuterie. Un autre foyer humain de type C a été signalé par FLEMING en Rhodésie ; également un pâté de préparation familiale était à l'origine de l'intoxication (\*).

(\*) H. BEERENS nous a rapporté qu'au Congrès de bactériologie, tenu à Moscou en 1966, Mme MATTWEEV avait signalé deux nouveaux cas d'épidémie de botulisme à type C chez l'homme en U. R. S. S.

Dans le premier cas, la consommation d'un poisson était à l'origine de l'infection. La souche fut isolée de l'intestin d'une personne ayant succombé à la maladie. Dans le second cas, une conserve familiale de concombres fut rendue responsable du botulisme de type C observé.

Au Sénégal, le botulisme humain a récemment fait l'objet d'une publication. REY et Coll. (49) rapportent qu'en 1964 six cas cliniques, dont trois mortels, ont été observés chez des Serers contaminés dans leurs villages d'origine, en milieu coutumier rural. L'épidémiologie de l'affection ne fut pas précisée et il semble à première vue difficile d'effectuer un rapprochement avec le botulisme bovin du Ferlo.

### CONCLUSION

Clostridium botulinum type C a été isolé du foie d'un bovin sacrifié à la période agonique alors qu'il présentait tous les symptômes de l'intoxication botulique aiguë telle qu'on peut la rencontrer dans le Ferlo chez les animaux en état d'aphosphorose. Les différents lots de toxine préparés à partir de la souche isolée par les méthodes de culture classiques ont présenté une toxicité allant de 10.000 à 150.000 DMM/souris par ml. La culture du germe par dialyse en sac de cellophane a fourni une toxine titrant  $2,5 \times 10^6$  DMM/souris par ml.

### REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier nos confrères CALVET (H.), REGNOULT (M.) et GRETILLAT (S.) pour le concours apporté dans la récolte des prélèvements sur le terrain et dans l'exécution des photographies que nous présentons.

Institut d'Élevage et de Médecine vétérinaire  
des Pays tropicaux. Maisons-Alfort

Laboratoire national de l'Élevage  
et de Recherches vétérinaires. Dakar-Hann

### S UMMARY

#### The Botulism of Ruminants and Horses in Senegal Characteristics of the Strain of Clostridium botulinum isolated and of its toxin

Clostridium botulinum type C has been isolated from the liver of a cattle which had been slaughtered at its last gasp when showing all the symptoms of an acute botulism intoxication such as it can be seen in the Ferlo in animals

suffering from a lack of phosphorus. The different batches of toxin prepared from the strain isolated by classical methods of culture, showed a toxicity ranging from 10.000 to 150.000 LD/mouse per ml. The culture of the germ by dialysis through cellophan membrane gave a toxin, the titer of which was  $2.5 \times 10^6$  LD/mouse per ml.

#### RESUMEN

El botulismo de los rumiantes y de los caballos en Senegal  
Caracteres de la cepa aislada de *Clostridium botulinum* y de su toxina

Se aisló *Clostridium botulinum* tipo C del hígado de un bovino matado durante su agonía cuando tenía todas las síntomas de la intoxicación aguda causada por el botulismo tal como se puede encontrarla en el Fero en los animales atacados por una carencia en fósforo. Los varios lotes de toxina preparados a partir de la cepa aislada mediante los métodos clásicos de cultivo mostraron una toxicidad llegando de 10.000 a 150.000 DMM/ratón por ml. El cultivo del germen por diálisis en SACO de celofan produjo una toxina cuyo título era  $2,5 \times 10^6$  DMM/ratón por ml.

#### BIBLIOGRAPHIE

1. ANDERSEN (A. A.). — Une méthode rapide de numération des spores de « *Clostridium botulinum* » sur boîte de Pétri. (A rapid plate method of counting spores of *Clostridium botulinum*). *J. Bact.*, 1951, **62**, 425-432.
2. BEER (J.). — Une nouvelle substance chimique inhibant le développement des bactéries. le PNPG/I. (Ein neuer, das Schwärmen von Bakterien hemmender chemischer Stoff, PNPG/I). *Zbl. Bakt.*, 1958, **171**, 195-201.
3. BEERENS (H.). — Amélioration des techniques d'étude et d'identification des bactéries anaérobies. *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1953-1954, **6**, 36-48.
4. BEERENS (H.) et CASTEL (M. M.). — Procédé simplifié de culture en surface des bactéries anaérobies. Comparaison avec la technique utilisant la culture en profondeur. *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1958-1959, **10**, 183-192.
5. BENNETTS (H.W.) et HALL (H. T. B.). — Le botulisme ovin et bovin en Australie occidentale : sa cause et sa prévention par l'immunisation. (Botulism of sheep and cattle in western Australia : its cause and its prevention by immunization). *Aust. vet. J.*, 1938, **14** (3), 105-118.
6. CALVET (H.) et PICART (P.). — Etude sur la maladie des forages. *Lob. nat. Rech. vét. Dakar, Rap. fonction.*, 1964.
7. CALVET (H.) et PICART (P.). — Aphosphorose et botulisme au Sénégal. 4<sup>e</sup> Journées médicales Dakar, 1965, à paraître.
8. CALVET (H.), PICART (P.), DOUTRE (M.) et CHAMBRON (J.). — Aphosphorose et botulisme au Sénégal. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1965, **3**, 249-282.
9. COBURN (N.). — Considérations sur les différentes fractions de la toxine botulique type C. (Concerning the nature of type C Botulinus toxin fractions). *Sci.*, 1942, **95**, 389.
10. COLLET (P.), BON (M.), RUBY et COURRIER. — Plusieurs cas de botulisme sur les grandes espèces animales. *Bull. Soc. Sci. vét. Lyon*, 1951, **53**, 139-146.
11. COLIN (F.) et BONIN (M.). — Un cas de botulisme bovin. *Bull. Soc. Sci. vét. Lyon*, 1958, **60**, 201-204.
12. DADOT (F.). — Botulisme du canard. *Rec. Méd. vét. Ecole Alfort*, 1945, **121**, 177-181.
13. DONETS (Y. I.). — Etude des propriétés infectieuses de l'agent causal du botulisme de type C. (The study of infectious properties

- of the C type causative agent of botulism). *J. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, 1961, 6, 104-110.
14. DUBOVSKY (B. J.) et MEYER (K. F.). — Une étude expérimentale des méthodes disponibles pour l'enrichissement, la mise en évidence et l'isolement de *B. botulinus* dans des prélèvements de sols ou de produits en dérivant, dans des aliments suspects et dans du matériel clinique ou nécropsique. (An experimental study of the methods available for the enrichment, demonstration and isolation of *B. botulinus* in specimens of soil and its products, in suspected food, in clinical and in necropsy material). *J. infect. Dis.*, 1922, 31, 501-540.
  15. EMMELIN (N.). — Hypersensibilité des glandes salivaires à la toxine botulique. (Super-sensitivity of salivary gland caused by botulinum toxin). *J. Physiol.*, 1961, 156, 121-127.
  16. FAGONDE (A. P.). — Le botulisme animal. (Botulismo animal). *Bull. Off. int. Epiz.*, 1963, 59, 1361-77.
  17. FILMER (J. F.) et KULL (K. E.). — Le botulisme chez les animaux domestiques de l'Australie occidentale. (Botulism in domestic animals in Western Australia). *Aust. vet. J.*, 1937, 13, 170-172.
  18. GALLUP (D. M.) et GERHARDT (P.). — Cultures concentrées de bactéries obtenues en tubes de dialyse et dans des fermentateurs. (Concentrated culture of bacteria in dialysis flask and fermentor systems). *Bacteriol. Proc.*, 1962, 52.
  19. GRAHAM (R.) et SCHARZE (H.). — Le botulisme des bovins. (Botulism in cattle). *J. Bact.*, 1921, 4, 1-21.
  20. GUILLAUMIE (M.) et KREGUER (A.). — Contribution à l'étude des hémolysines bactériennes. Propriétés des toxines botuliniques des types C et D. C-R. Soc. Biol., 1951, 145, 179-182.
  21. HELLER (H. H.). — Principes concernant l'isolement des germes anaérobies. (Principles concerning the isolation of anaerobes). *J. Bact.*, 1921, 6, 445-470.
  22. HELSON (V. A.), STEVENSON (J.W.) et REED (G. B.). — Quantité de toxine botulique obtenue dans des milieux concentrés. (Yield of botulinum toxin in concentrated media). *Con. J. of Res.*, 1947, 25, 25-31.
  3. HENNING (M. W.). — Les maladies animales en Afrique du Sud. (Animal diseases in South Africa). 2nd edit., Central news agency South Africa, 1949.
  4. HERNANZ (M.). — Le botulisme des équidés en Espagne. (El botulismo de los equidos en Espana). *Trab. Inst. Biol. anim.*, 1942, 7, 326-344.
  5. HERNANZ (M.). — Le botulisme chez les animaux domestiques. (El botulismo en los animales domesticos). *Trab. Inst. Biol. anim.*, 1942, 7, 511-539.
  6. JANSEN (B. C.). — L'importance des microbes anaérobies comme agents de maladies animales en Afrique du Sud. (The importance of anaerobes in the causation of animal diseases in the Republic of South Africa). *Bull. Off. int. Epiz.*, 1963, 59, 1333-50.
  7. JUDE (A.), GIRARD (P.) et CARRAT (P.). — Action destructrice in vivo de certains agents chimiques sur les toxines botulique et tétanique. C-R. Soc. Biol., 1949, 143, 318-319.
  8. KATITCH (R.), CVETKOVITCH (L.), DJOUKITCH (B.), VOUKITCHEVITCH (Z.) et TOMANOVITCH (B.). — Possibilité d'infection par *Cl. botulinum* C beta. Lésions provoquées par *Ascoris suum*. *Rec. Méd. vét.*, 1965, 141, 433-439.
  9. KATITCH (R. V.). — Les maladies des animaux domestiques causées par les microbes anaérobies. Vigot, 1965.
  3. McKEE (M. T.), BELL (J. F.) et HOYER (B. H.). — Culture de *Clostridium botulinum* type C à pH contrôlé. (Culture of *Clostridium botulinum* type C with controlled pH). *J. Bact.*, 1958, 75, 135-142.
  1. LAMANNA (C.), JENSEN (W. I.) et BROSS (I. D. J.). — Rôle du poids dans la réponse de la souris aux toxines botuliniques. (Body weight as a factor in the response of mice to botulinical toxins). *Amer. J. Hyg.*, 1955, 62, 21-28.
  2. LEWIS (K. N.) et HILL (E. V.). — Milieu pratique et mesures de contrôle pour la production de cultures de haute toxicité de *Clostridium botulinum* type A. (Practical media and control measures for producing highly toxic cultures of *Clostridium botulinum* type A). *J. Bact.*, 1947, 53, 213-230.

33. MEYER (K. F.), EDDIE (B.), YORK (G. K.), COLLIER (C. P.) et TOWNSEND (C. T.). — Clostridium *botulinum* type C et le botulisme humain. (Clostridium *botulinum* type C and human botulism). *V<sup>e</sup> Congrès int. Micr.*, 1353, vol. 2, sez VIII-XVI, 276.
34. MOINE (G. G.). — Du danger des cadavres en putréfaction au sein des denrées alimentaires. *Rev. Path. comp.*, 1950, 50, 411-413.
35. MULLER (J.). — Botulisme du type C chez l'homme et les animaux. Incidence chez les bovins et les équidés. (Type C botulism in man and animals. Incidence in cattle and horses). *Medlemsbl. danske Dryloegeforen*, 1961, 44, 547-57.
36. MULLER (J.). — Botulisme équin et bovin au Danemark. (Equine and bovine botulism in Denmark). *Bull. Off. int. Epiz.*, 1963, 59, 1379-90.
37. PIGOURY (L.), MICHEL (C.) et CHABAS-SOL (C.). — Rôle de l'eau dans l'étiologie du botulisme animal. Méthode de recherche de la toxine botulique C dans l'eau. *Rev. Cps Santé Armées*, 1962, 3, 649.
38. POLSON (A.) et STERNE (M.). — Production de toxines botuliques de haut titre et d'anatoxines. (Production of potent botulinum toxins and formol toxoids). *Nature*, 1946, 158, 238-239.
39. PREVOT (A. R.). — Techniques pour le diagnostic des bactéries anaérobies. Coll. « Techniques de base », 119 p., Edit. de la Tourelle, Saint-Mandé.
40. PREVOT (A. R.), HUET (M.) et TARDIEUX (P.). — Etude de vingt-cinq foyers récents de botulisme animal. *Bull. Acad. vét. France*, 1950, 23, 481-487.
41. PREVOT (A. R.), SILLIOC (R.) et QUENTIN (M.). — Existence en France du botulisme bovin de type C. *Bull. Acad. vét. France*, 1953, 26, 73-78.
42. PREVOT (A. R.), SILLIOC (R.) et GAY (H.). — Etude d'un foyer de botulisme équin de type C. *Rec. Méd. vét. Ecole Alfort*, 1954, 130, 353-355.
43. PREVOT (A. R.). — Biologie des maladies dues aux anaérobies. 572 p., Edit. médicales Flammarion, Paris, 1955.
44. PREVOT (A. R.), SILLIOC (R.) et PROUTE (J.). — Etude d'un foyer de botulisme bovin dû à *Cl. botulinum* C. *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, 88, 513-515.
45. PREVOT (A. R.), TERRASSE (J.), DAUMAIL (J.), CAVAROC (M.), RIOL (J.) et SILLIOC (R.). — Existence en France du botulisme humain de type C. *Bull. Acad. nat. Méd. Paris*, 1955, 139, 355-358.
46. PREVOT (A. R.). — Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies. *Monographie Inst. Pasteur, Masson*, 1957.
47. PREVOT (A. R.). — A propos de la toxinotypie botulique. *Bull. Ass. Dipl. Microbiol., Nancy*, 1959, 74, 2-7.
48. REED (G. B.) et ORR (J. H.). — Identification rapide des germes anaérobies des gangrènes gazeuses (Rapid identification of gas gangrene anaerobes). *War Med.*, 1941, 1, 493-510.
49. REY (M.), DIOP MAR (I.), BAYLET (R.), ARMENGAUD (M.), MICHEL (R.), BONNARDOT (R.) et SOW (M.). — Du botulisme en pays Serer, à propos de six cas hospitalisés. *Bull. Soc. Méd. Afr. noire*, 1964, 9, 34-44.
50. SANCHEZ BOTUA (C.). — Epizootologie du botulisme des équidés en Espagne. Enquête sur la contamination des aliments (Epizootologia del botulismo de los equidos en Espana. Investigaciones sobre la contaminación de los alimentos). *Trab. Inst. Biol. anim.*, 1942, 7, 223-288.
51. SARTORY (R.), MEYER (J.), MALGRAS (J.) et SUPPIGER (H.). — Recherche et dosage des principaux facteurs de croissance dans le milieu VF pour bactéries anaérobies. *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, 89, 358-368.
52. SCHNEIDER (M. D.), GRECZ (N.) et ANELLIS (A.). — Sporulation de Clostridium *botulinum* type A, B et E, de Clostridium *perfringens* et de l'anaérobie putréfiant 3679 en sacs de dialyse (Sporulation of Clostridium *botulinum* types A, B et E, Clostridium *perfringens* and putrefactive anaerobes 3679 in dialysis sacs). *J. Bact.*, 1963, 85, 126-133.
53. SCOTT MILLAR (J. W.). — Le botulisme en Afrique du Sud (Botulism in South Africa). *South Afr. Med. J.*, 1964, 38, 310-315.

54. SEDDON (H. R.). — Les maladies des animaux domestiques en Australie (*Diseases of domestic animals in Australia*). *Commonwealth of Australia, Depart. of Health*, 1953
55. SEERGEEVA (T. I.). — Recherche des toxines botuliques et des germes de type B et C chez les malades et dans les cadavre: (*Detection of botulism toxins and microbes of the B and C types in the organism of sick man, animals and in corpses*). *J. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, 1963, 7, 77-82.
56. SHOOP (G.). — Mise en évidence de *Clostridium bofolinum* type C chez les bovins (*Demonstration of Clostridium bofolinum type C in cattle*). *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 1961, 68, 71-72.
57. SIMMONS (G. C.) et TAMMEMAGI (L.). — *Clostridium bofolinum* type D, agent responsable du botulisme bovin (*Clostridium bofolinum type D as a cause of bovine botulism in Queensland*). *Austral. vét. J.*, 1964, 40, 123-127.
58. STERNE (M.) et WENTZEL (L. M.). — Une nouvelle méthode de production importante d'anatoxine botulique de titre élevé des types C et D (*A new method for the large-scale production of high-titre botulinum formol-toxoid types C and D*). *J. Immunol.*, 1950, 65, 175-183.
59. STERNE (M.) et THOMSON (A.). — Isolement et identification de « *Clostridia* » dans les maladies animales (*The isolation and identification of « Clostridia » from pathological conditions of animals*). *Bull. Off. int. Epiz.*, 1963, 59, 1487-98.
60. STEVENSON (J. W.), HÉLSON (V. A.) et REED (G. B.). — Un milieu à base de digestat de caséine pour la production de toxine par les germes du groupe des *Clostridium* (*A casein digest medium for toxin production by Clostridium*). *Con. J. of Res.*, 1947, 25, 9-13.
61. STEVENSON (J. W.), HELSON (V. A.) et REED (G. B.). — Préparation des toxines des *Clostridium parobotulinum* (*Preparation of Clostridium parobotulinum toxins*). *Can J. of Res.*, 1947, 25, 14-24.
62. THEILER (H.), VILJOEN (P. R.), GREEN (H. H.), DU TOIT (P. J.), MEIER (H.) et ROBINSON (E. M.). — Le Lamsiekte (*parabotulisme*) des bovins en Afrique du Sud (*Lamsiekte (parabotulism) in cattle in South Africa*). *12th Ann. Rep. Director vet. Res. South Afr.*, 1927, 12, 821-1961.
63. VERGE (J.) et GORET (P.). — Sur la pathogénie du botulisme. *Bull. Soc. Sci. vét. Lyon*, 1947, 49, 92-95.
64. VERGE (J.) et POGGIOLI (Ch.). — *Bull. Acad. vét. France*, 1951, 24, 509-517.  
BRUYERE (A.) et DAVID (A.). — Paralyse labio-glosso-pharyngée et botulisme chez le cheval. *Rev. Méd. vét.*, 1951, 102, 155-160.
65. VINET (G.) et FREDETTE (V.). — Appareil pour la culture des bactéries en tubes de cellophane. (*Apparatus for the culture of bacteria in cellophane tubes*). *Science*, 1951, 114, 549-550.
66. VINET (G.) et RAYNAUD (M.). — Production et purification de la toxine botulique type C. *Rev. Can Biol.*, 1963, 22(1), 119-120.
67. VIRAT (B.), VALLEE (A.) et KREGUER (A.). — A propos du botulisme du mouton ; première souche ovine isolée en France. *Bull. Acad. vét. France*, 29, 425-426.
68. WENTZEL (L. M.) et STERNE (M.). — Une membrane dialysante simple à double surface (*A simple double-surface dialysing membrane*). *Science*, 1949, 110, 259.
69. WENTZEL (L. M.), STERNE (M.) et POLSON (A.). — La haute toxicité de la toxine botulique type D purifiée (*High toxicity of pure botulinum type D toxin*). *Nature*, 1950, 166, 739-740.