

SOMMAIRE

	PAGES
INTRODUCTION	1
RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE	3
1. Charbon bactérien	3
1.1.Historique.....	3
1.2.Définition	4
1.2.1.Taxonomie.....	4
1.2.2.Caractère bactériologique.....	5
1.2.3.Culture.....	5
1.2.4.Spore	6
1.3.Pouvoir pathogène.....	7
1.3.1.Virulence liée à la capsule.....	7
1.3.2.Toxicité liée à la toxine protéine.....	8
1.4.Les antigènes et l'immunité.....	8
1.4.1Antigène capsulaire.....	8
1.4.2Antigène somatique.....	8
1.4.3Antigène protéique	8
1.5.Induction d'immunité	9
1.6.Diagnostic bactériologique.....	9
1.7.Prophylaxie	10
2. Charbon symptomatique	12
2.1.Définition	12
2.2.Taxonomie.....	12
2.3. Caractère bactériologique.....	13
2.4Complexité étiologique	14
2.5Epidémiologie	15
2.5.1Epidémiologie descriptive.....	15
2.5.2Epidémiologie analytique.....	15
2.6Mode d'infection.....	17
2.6.1Voie endogène.....	17
2.6.2Voie exogènes	17

2.7Pathogénie	18
2.7.1La toxine.....	18
2.7.2Les corps bactériens	18
2.7.3La maladie naturelle	18
2.7.4Importance de la toxine dans le développement de la maladie	19
2.8Etude anatomo-clinique	19
2.8.1Symptômes	19
2.9Lésions anatomiques	20
2.10Diagnostic	21
2.10.1Epidémiologique	21
2.10.2Clinique	21
2.10.3Différentiel	21
2.10.4Biologique	22
2.11Traitement	22
2.12Prophylaxie	23
2.12.1Prophylaxie sanitaire	23
2.12.2Prophylaxie médicale	24
 Chapitre I : Matériels et méthodes	 25
1. Les caractéristiques du site d'étude	25
1.1Situation géographique.....	25
1.2Milieu physique : cadre physique et écologique	25
1.3Météorologie	26
1.4Milieu humain et social.....	26
1.5Situation socio-économique	26
1.5.1Infrastructure	26
1.6Marchés	27
1.7Elevage	27
2 Le laboratoire d'accueil	28
2.1.Généralités et historique de la recherche à l' IMVAVET	28
2.2.Monographie du vaccin BICHAR®.....	30
3. Type d'étude	32

4. Période et durée de l'étude	32
5. Population d'étude	32
8. Les paramètres à étudier	33
8.1.Mesure de la température de conditionnement	33
8.1.1.Matériels.....	33
8.1.2.Méthodologie	33
8.2.Titrage des spores de Bacillus anthracis souche 34F2	33
8.2.1.Matériels.....	33
8.2.2.Méthode	33
8.3.Mesure du pH.....	34
8.4.Test de stérilité et pureté du reste de vaccin	34
8.4.1.Matériels.....	34
8.4.2.Méthodes	35
8.5.Test d'épreuve (Clostridium chauvœi).....	35
8.5.1.Matériels.....	35
8.5.2.Méthodologie	35
8.6. Mode de collecte, de saisie et analyse des données	37
8.6.1. Documentation	37
8.6.2. Collecte des données	37
8.7. Enquête.....	38
8.8. Traitement des données.....	38
 Chapitre II : RESULTATS	 42
1. Parcours du vaccin depuis le centre de contrôle qualité jusqu'à l'inoculation aux bovins	42
1.1. Parcours des vaccins pendant la campagne de vaccination	42
1.2. Les valeurs de températures mesurées au cours du trajet des échantillons des vaccins	42
1.3. Titrage des spores de Bacillus anthracis souche 34F2.....	43
1.3.1.Mesure du pH.....	45
1.3.3.Test de stérilité et de pureté du vaccin non utilisé	47
1.3.4.Résultat d'épreuve.....	49
1.3.5.Etude des variables.....	51

1.3.6.Maladies prédominantes.....	52
I. DISCUSSION	53
1. Explication ou commentaire des résultats obtenus sur terrain.....	53
1.1Le parcours du vaccin depuis le centre de contrôle qualité jusqu'à l'inoculation aux bovins.....	53
1.2Les valeurs de températures mesurées au cours des trajets des échantillons des vaccins	53
1.3Titrage des spores de <i>Bacillus anthracis</i> souche 34F2	54
1.4Les variables pouvant influencer l'efficacité du vaccin.....	54
1.4.1Traitement antiparasitaire.....	54
1.4.2Méthode de castration	54
1.4.3Les maladies prédominantes	54
2. Comparaison entre divers résultats bibliographiques et résultats sur terrain	55
3. Validation statistique des principaux résultats.....	59
4. Identification des problèmes	59
II.Proposition de solution aux problèmes	60
CONCLUSION	62
ANNEXES	
BIBLIOGRAPHIE	

LISTE DES TABLEAUX

	Pages
Tableau I : Caractère de spores.....	7
Tableau II : Caractères bactériologiques de <i>Clostridium chauvoei</i>	13
Tableau III : Pouvoir antigénique de <i>Clostridium chauvoei</i> supporté par les toxines et les antigènes du corps bactérien.....	14
Tableau IV : Météorologies.....	26
Tableau V : Valeurs de chaque titre des antigènes dans le vaccin	30
Tableau VI : Etude des variables.....	39
Tableau VII : Tableau 2 x 2 études cas témoin.....	40
Tableau VIII : Les valeurs enregistrées.....	42
Tableau IX : Titrage antigénique des spores de <i>B. anthracis</i> dans le vaccin.....	43
Tableau X : pH des vaccins étudiés.....	45
Tableau XI : Caractère du germe <i>Bacillus anthracis</i>	48
Tableau XII : Nombre de vivant et mort pour chaque dilution.....	49
Tableau XIII : Résultat d'épreuve de <i>Clostridium chauvoei</i>	50
Tableau XIV : Les variables pouvant influencer l'efficacité de la vaccination.....	57

LISTE DES FIGURES

	Pages
Figure 1 : <i>Bacillus anthracis</i> via microscope optique.....	5
Figure 2 : Représentation sur sphère de corrélation de l'évolution du titre d'antigène 34F2, souche Sterne, en fonction de la durée, de la mode de conservation et du pH du vaccin, en tenant compte de la variation des températures du milieu ambiant.	46
Figure 3 : Résultat de la stérilité du vaccin	47
Figure 4 : Les maladies prédominantes dans les 6 communes.....	52

LISTE DES ABREVIATIONS, DES SIGLES ET DES SIGNES

DSV	: Direction des Services Vétérinaires
IMVAVET	: Institut Malgache des Vaccins Vétérinaires
FOFIFA	: Foibem-pirenena momba ny Fikarohana ampiharina amin'ny Fampandrosoana ny Fambolena
ADN	: L'acide désoxyribonucléique
USA	: United States of America
URSS	: Union des Républiques Socialistes Soviétiques
RFA	: République Fédérale d'Allemagne
DRZV	: Département de Recherche Zootechnique et Vétérinaire
GTZ	: Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit
OIE	: Office Internationale de l'Epizootie
ESSA	: Ecole Supérieur des Sciences Agronomiques
DESMV	: Département d'Enseignement des Sciences et de Médecine Vétérinaires
RGPH	: Recensement Général de la Population et de l'Habitat
BA	: <i>Bacillus anthracis</i>
DL ₅₀	: Dose Létale à 50%
%	: Pourcent
OR	: Odds ratio
IC	: Intervalle de Confiance
°C	: Degré Celsius
PA	: Antigène protecteur
LF	: LETHAL FACTOR
EF	: EDEMA FACTOR

LISTE DES ANNEXES

- ANNEXE 01** : Décrets rendant obligatoires la vaccination annuelle contre les maladies charbonneuses
- ANNEXE 02** : Arrêté fixant l'obligation du vaccin contre le charbon symptomatique
- ANNEXE 03** : Courbe de variation de la température
- ANNEXE 04** : Lésions observées lors de l'autopsie
- ANNEXE 05** : Les différentes étapes de la coloration de Gram
- ANNEXE 06** : Présentation du logiciel CORICO
- ANNEXE 07** : Extrait de carte routière (modifiée)
- ANNEXE 08** : Circonscription de Miandrivazo
- ANNEXE 09** : Limites du District
- ANNEXE 10** : Détermination du DL_{50}
- ANNEXE 11** : Fiche d'enquête

DEDICACES

INTRODUCTION

Les maladies charbonneuses englobent le terme de charbon bactérien et le charbon symptomatique. Le charbon bactérien est une maladie infectieuse et zoonose d'origine tellurique affectant les mammifères, principalement les herbivores, due à une bactérie: *Bacillus anthracis* (1). Tandis que le charbon symptomatique est une toxoinfection, inoculable, cosmopolite atteignant surtout les bovins et les ovins, parfois les porcs et les chevaux aussi. Il est dû à l'ingestion de spores de *Clostridium chauvoei* (bacille de Chauveau).

Les cadavres d'animaux morts du charbon bactérien sont aussi dangereux pour les animaux que pour l'homme. Le sang qui s'en écoule est en effet très infectieux. Lorsque les microbes du charbon contenus dans le sang sont exposés à l'air, ils forment une enveloppe protectrice épaisse et se transforment en spores. Ces dernières peuvent se conserver dans le sol pendant plusieurs années.

L'incidence économique engendrée par le charbon symptomatique est loin d'être négligeable pour les éleveurs. Selon le rapport du DSV en 2011, la prévalence nationale de la maladie est de l'ordre de 0,02% (soit 140 000 bovins) sur la base des rapports disponibles à la Direction de Services Vétérinaires. Le manque à gagner direct aux éleveurs est estimé alors à 100 000 000 Ar par an (2).

Ces deux pathologies peuvent être prévenues par vaccination et les vaccins existent à Madagascar. En effet, l'Institut Malgache de Vaccins Vétérinaire (IMVAVET), ex division vaccin du département de recherches zootechnique et vétérinaire (FOFIFA), a mis sur le marché depuis 1970 le vaccin bactérien BICHAR® formé par deux valences. Depuis ce temps, l'Etat Malagasy a rendu obligatoire la vaccination contre les maladies charbonneuses des bovins.

Cependant, malgré cette obligation étatique, des cas de charbon symptomatique persistent toujours à Madagascar (2). L'on se demande alors comment est la qualité du vaccin BICHAR® destiné à prévenir les maladies charbonneuses. Cette question concerne à la fois la qualité immunologique et la qualité bactériologique du BICHAR®. Sont-elles encore intactes dans le milieu réel d'utilisation du produit ?

La recherche des réponses à toutes ces questions nous pousse à choisir le thème de notre étude « **Evaluation sur terrain de la qualité du vaccin BICHAR®** ».

L'objectif principal de ce travail est de trouver les explications possibles à la persistance des maladies charbonneuses hormis leurs caractères distinctifs de maladies telluriques. Et les objectifs spécifiques consistent à évaluer l'influence de certains facteurs pouvant affecter les caractères bactériologiques et immunologiques, voire même les facteurs de l'échec vaccinal, sans oublier le dépistage d'éventuelles contaminations par les matériels utilisés lors de la vaccination.

La première partie de cet ouvrage comporte les revues bibliographiques des maladies charbonneuses. En deuxième partie les travaux de terrain comprenant les matériels, les méthodologies et les résultats suivis de discussions et de propositions pour terminer.

PREMIERE PARTIE : REVUES BIBLIOGRAPHIQUES

RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

1. Charbon bactérien

1.1. Historique

La maladie du Charbon, ou anthrax, « murrain », « woolsorter's disease », ou encore « sang de rate » est une maladie bien plus ancienne qu'on ne le pense (3).

La première mention faite à propos d'une infection apparentée à celle provoquée par *Bacillus anthracis* date de l'Antiquité, lorsque Moïse menaça les Egyptiens d'une 5^{ème} plaie envoyée par Dieu et qui devait décimer les troupeaux et les humains dans d'atroces mais rapides souffrances (4).

Du Moyen-Age au dix-huitième siècle, divers auteurs décrivent un étrange syndrome de mort subite ou de septicémie associée à des saignements divers, à une rate noire « comme du charbon », à une incoagulabilité marquée, et surtout parlent d'une étrange persistance de ces cas, en certains endroits bien précis, appelés très vite « champs maudits » (3, 4).

Les travailleurs de la laine « woolsorter » semblent être une cible privilégiée et, cette également, dans certaines fabriques bien précise (5).

Pasteur et Koch (1876) furent les premiers à identifier et isoler l'agent causal de la maladie, *Bacillus anthracis*, appelé aussi bactérie parce que « très proche d'une bactérie » (d'où le terme actuel de charbon bactérien, à ne pas confondre avec charbon bactérien, provoqué par *Clostridium chauvoei*), et réalisèrent la première vaccination contre le charbon bactérien lors d'une démonstration publique à Pouilly-le-Fort en 1881 (5, 6).

Davaine a approfondi les recherches sur *Bacillus anthracis*, nommé depuis le bacille de Davaine (7).

Une distinction importante de vocabulaire est à faire : Anthrax (de « anthracos » qui signifie « charbon » en grec) représente dans le contexte anglo-saxon toute la forme de la fièvre charbonneuse, tandis qu'en français, ce terme désigne avant tout la lésion cutanée (8). En 1938, drillés par la crainte d'une guerre bactériologique déjà envisagée à l'approche de la 2^{ème} guerre mondiale, de nombreux chercheurs firent avancer la science

de l'anthrax à grands pas, mettant en évidence ses facteurs de virulence et certaines de ses caractéristiques immunogènes (9).

Depuis cette date, l'effort ne se relâche pas, et *Bacillus anthracis* est une des bactéries les plus étudiées dans le monde (4).

La guerre du Golfe de 1990 a réanimé le concept de guerre bactériologique, et les tout derniers événements rendent cette idée plus réelle que jamais (3, 4).

Chez nous, la vaccination contre l'anthrax date de 1901 (1).

1.2.Définition

Le charbon bactérien est une maladie infectieuse aiguë, une maladie zoonotique majeure de répartition mondiale et à qui est dû à *Bacillus anthracis*. C'est un bacille Gram positif, sporulant, thermorésistant et survient dans le sol pendant des décennies (10 - 12). Chez les animaux, elle se présente généralement sous la forme d'une maladie aiguë, septicémique, évoluant rapidement vers la mort avec des symptômes généraux, circulatoires, digestifs et urinaires. Les lésions principales sont celles d'une septicémie hémorragique associée, en particulier, à une hypertrophie et un ramollissement de la rate et une modification de l'aspect du sang devenu noir et incoagulable (13 - 20).

1.2.1. Taxonomie

Le charbon bactérien connaît encore sous l'appellation de fièvre charbonneuse ou anthrax est dû au *Bacillus anthracis* (bactérie charbonneuse ou bacille de Davaine). C'est une bactérie qui appartient :

- A l'Embranchement des Schizomycètes ;
- Au Sous-embranchement des Eubacteries (Eubacteria);
- A la Classe des Sporulales ;
- A l'Ordre des Bacillales ;
- A la Famille des Bacillacées ;
- Au Genre *Bacillus* ;
- A l'espèce *Bacillus anthracis*.

Bacillus anthracis est apparenté à *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus thuringiensis* et à *Bacillus weihenstephanensis*. Ces six

espèces présentent de fortes similitudes génétiques (homologies ADN-ADN, homologies des séquences des ARNr 16S et 23S, homologies des séquences de l'espace intergénique ADNr 16S-ADNr 23S) et sont souvent réunies au sein d'un unique groupe appelé le "groupe *Bacillus cereus*". Quelques auteurs ont proposé de rassembler tous ces taxons au sein d'une unique espèce (*Bacillus cereus*) et de leur attribuer un statut de sous-espèce. Si de telles propositions étaient validées, il en résulterait des risques de confusion et des conséquences pratiques importantes car certaines espèces, comme *Bacillus anthracis* et *Bacillus cereus*, ont un intérêt médical et d'autres, comme *Bacillus thuringiensis*, ont une grande importance économique (21 - 26).

1.2.2. Caractère bactériologique

1.2.2.1. Morphologie

Bacillus anthracis est un bacille à Gram positif, aux extrémités carrées, de 1 à 1,2 μm de diamètre sur 3 à 5 μm de longueur, immobile, sporulé et capsulé. Dans les produits pathologiques, *Bacillus anthracis* se présente sous forme isolée ou en courtes chaînes. En culture, il forme fréquemment des chaînes plus longues qui leur confèrent un aspect en "tiges de bambou"(5).



Figure N° 1 : *Bacillus anthracis* via microscope optique (27)

1.2.3. Culture

Il est aéro-anaérobie. Incubé sous atmosphère normale, il pousse en 24 heures sur les milieux ordinaires, en donnant des colonies de 3 à 5 mm de diamètre qui ont un aspect R (rugueux), "en tête de méduse". Sur gélose au sang, le germe apparaît non hémolytique en 24 heures mais, en prolongeant l'incubation, il se développe une légère zone d'hémolyse incomplète. Après culture sur des géloses enrichies en sérum et/ou en bicarbonate et incubées à 37 °C sous une atmosphère contenant 5 p. cent de CO₂, le bacille synthétise sa capsule et donne des colonies qui ont un aspect lisse et brillant (27).

1.2.4. Spore

La spore, ovoïde et non déformante, occupe une position centrale. Elle survit dans le sol durant de longues périodes (la survie des spores est de l'ordre d'une centaine d'années mais, des spores dont l'âge a été estimé à 200 ans ont permis l'obtention de la forme végétative). La persistance dans le sol est favorisée par un pH neutre ou légèrement alcalin (pH compris entre 6 et 8,5). Cette résistance explique la persistance de la maladie dans certaines régions ("champs maudits") ou sa résurgence lorsque des spores enfouies remontent à la surface à la faveur de grands travaux (drainage, construction de routes, ...). La possibilité d'une germination suivie d'une multiplication de la forme végétative dans le sol ne peut être totalement exclue (théorie de Van Ness).

La sporulation nécessite une température comprise entre 15 et 42 °C, une atmosphère humide et la présence d'oxygène. Ce dernier impératif conduit à interdire l'autopsie des animaux morts de charbon (sauf dans des locaux spécialement équipés) et à obturer les orifices naturels des cadavres afin d'éviter l'exposition des bacilles à l'oxygène de l'air, la sporulation et la dissémination des spores. Par contre, en l'absence d'ouverture du cadavre, les germes de putréfaction provoquent une anaérobiose inhibant toute sporulation et conduisant à la mort des bactéries. Ainsi, expérimentalement, il n'est plus possible d'isoler *Bacillus anthracis* d'un cadavre 5 jours après la mort.

La résistance des spores à divers agents physiques ou chimiques est variable selon les souches, selon les circonstances de la sporulation et selon le milieu où les spores sont présentes. Globalement, on préconise pour la destruction des spores (tableau I)

Tableau I: Caractère de spores

Eléments	Température (°C)	Concentration (%)	Durée (heure)
La chaleur sèche	120-140		3
Chaleur humide	121		10
Formol		5	4
Glutaraldéhyde		2	2
Eau oxygénée		3	1
Acide peracétique		0,6	1

Source : (28)

Comme de nombreuses autres espèces du genre *Bacillus*, *Bacillus anthracis* possède une couche cristalline de surface (S layer). Cette structure, rarement présente chez les bactéries capsulées, semble située entre la paroi et la capsule. La couche cristalline représente 5 à 10 p. cent des protéines cellulaires et sa synthèse nécessite de l'énergie ce qui suggère qu'elle doit être importante pour la bactérie. In vitro, en l'absence de couche cristalline, le germe présente d'importantes altérations morphologiques et il est possible que cette structure soit indispensable pour la protection de *Bacillus anthracis* dans le sol, notamment vis-à-vis des chocs osmotiques. D'autres fonctions peuvent également être invoquées : structure permettant de solidariser la capsule et la paroi ou contrôle des échanges avec l'environnement.

1.3.Pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène de *Bacillus anthracis* repose principalement sur la virulence, liée à la présence d'une capsule et sur la synthèse de toxine (29 - 34)

1.3.1. Virulence liée à la capsule

La capsule, formée d'un polymère d'acide D-glutamique, caractérise les souches virulentes car elle s'oppose à la phagocytose. Elle est produite *in vivo* ou *in vitro*. La synthèse de la capsule est commandée par un plasmide de 60 méga-daltons (plasmide pX02) et les enzymes de synthèse sont codées par les gènes *cap* (*capB*, *capC*, *capA*).

1.3.2. Toxicité liée à la toxine protéine

La toxine protéique, codée par un plasmide de 110 méga-daltons (plasmide pX01), est formée de trois protéines: le facteur I ou oedématogène ou EF (Edema Factor) codé par le gène *le*/, le facteur II ou antigène protecteur ou PA (Protective Antigen) codé par le gène *pag* et le facteur III ou létal ou LF (Lethal Factor) codé par le gène *cya*. Chacun de ces facteurs, injectés séparément à un animal, est dépourvu d'activité (Fig. 6). Une activité toxique nécessite l'injection combinée des facteurs I et II ou l'injection simultanée des facteurs III et II (25, 27,34)

1.4. Les antigènes et l'immunité

Bacillus anthracis a trois types d'antigènes: capsulaire, somatique et protéique.

1.4.1 Antigène capsulaire

L'antigène capsulaire est un polypeptide, polymère d'acide - glutamique. Il joue un rôle important dans le pouvoir pathogène. Ce polypeptide intervient dans la virulence de la bactérie. Il empêche la phagocytose macrophagienne, neutralise le pouvoir bactéricide du sérum, rend incoagulable le sang et inhibe les défenses non spécifiques de l'organisme.

1.4.2 Antigène somatique

Il en existe deux de nature polysaccharidique (galactose, N-acétylglucosamine, N-acétylmannosamine) qui, mis en présence de sérum anti, font apparaître un précipité. Ce sont des antigènes, qui interviennent dans la réaction d'Ascoli.

1.4.3 Antigène protéique

C'est une toxine de nature protéique formée de trois facteurs, produite vers la quatrième heure de culture et détruite dès la septième heure par certaines enzymes bactériennes. Ce qui explique les difficultés de son obtention. Le facteur II de la toxine induit la formation d'anticorps neutralisants et joue un rôle Important dans l'immunité

anti-charbonneuse. Des communautés antigéniques de *Bacillus anthracis* et d'autres espèces du genre *Bacillus* telles que *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus megatorium* a été démontrées (29-34).

1.5.Induction d'immunité

Après guérison d'un animal infecté, une immunité solide s'installe. Elle est due à des anticorps protecteurs induits dans l'organisme par le facteur II PA (protective antigen) ou facteur vaccinant de la toxine. Les souches acapsulogènes de virulence modérée (en raison de l'absence de capsule), produisent de la toxine induisant l'immunité. Celle-ci est à la fois humorale par les anticorps neutralisants antitoxiques et cellulaire P:if la présence d'une hypersensibilité retardée, révélée par l'anthraxine (35).

1.6.Diagnostic bactériologique

Outre les diagnostics épidémiologiques, cliniques et nécrosiques (autopsies réalisées avec d'extrêmes précautions dans un local isolé et facile à désinfecter), il est souhaitable d'avoir recours à un diagnostic expérimental. Celui ci doit être effectué le plus rapidement possible (dans les 24 heures suivant la mort) car la présence d'un grand nombre de germes de putréfaction rend difficile, voire même impossible, l'isolement de *Bacillus anthracis*.

La simple coloration de Gram effectuée sur un frottis sanguin ou sur un décalque d'organe (foie ou rate par exemple) permet de visualiser de gros bacilles à Gram positif, souvent associés en courtes chaînettes. Cet examen direct nécessite un temps d'observation prolongé de l'ordre de 30 minutes avant de conclure à la négativité. Il existe un risque de confusion avec des clostridies souvent présentes dans le sang et les organes après la mort. La mise en évidence d'une capsule, à l'aide de colorations spéciales*, permet de différencier *Bacillus anthracis* des *Clostridium* sp.

L'isolement est réalisé sur des milieux usuels lorsque le prélèvement est vraisemblablement monomicrobien. En revanche lorsque le prélèvement est contaminé par d'autres germes, il convient de recourir à des milieux sélectifs comme le milieu PLET (Cf. infra). L'isolement par inoculation au cobaye est également possible. Elle consiste à déposer le prélèvement sur la peau préalablement scarifiée puis à isoler le germe à partir de l'animal inoculé. Cette technique expose à des risques de contamination importants et elle doit être réservée aux laboratoires possédant une animalerie très bien contrôlée.

L'identification du germe est facile et seul le diagnostic différentiel *Bacillus anthracis*/*Bacillus cereus* pose quelques problèmes. L'absence de mobilité, la présence d'une capsule (obtenue in vitro dans des conditions spéciales, Cf. supra), l'absence d'hémolyse en 24 heures.

L'inoculation par voie sous cutanée au cobaye d'une culture de 24 heures (0,3 à 0,5 mL d'une suspension de turbidité 0,5 de Mac Farland) permet d'apprécier le pouvoir pathogène. Une souche pathogène provoque la mort en 24 - 72 heures avec des lésions caractéristiques (œdème gélatineux, hématurie, épistaxis) et le germe peut être réisolé de nombreux tissus ou liquides biologiques (rate, foie, sang, liquide d'œdème). Cette inoculation expérimentale expose à des risques de contamination importants et elle doit être réservée aux laboratoires possédant une animalerie très bien contrôlée.

. Le diagnostic allergique (Anthrax Skin test) qui met en évidence une réaction locale d'hypersensibilité, est peu onéreux et permet un diagnostic précoce. Ce test, utilisé dans les pays de l'Est depuis 1957, permet d'évaluer la protection conférée chez l'homme par un vaccin vivant atténué (38).

1.7.Prophylaxie

La prophylaxie sanitaire ne permet que difficilement l'éradication de ce germe tellurique et sporulé. Elle a simplement pour but :

- D'assurer une décontamination d'aires limitées.
- De limiter la contamination du milieu extérieur (interdiction d'autopsier en "plein champ" les animaux suspects, destruction des cadavres par incinération ou enfouissement dans une fosse d'au moins 2 mètres de profondeur et contenant de la chaux vive).
- De prévenir la contamination de l'homme par l'information des professionnels exposés et par le traitement préventif des sous produits animaux tels que la laine, le mohair ou les poudres d'os.

La vaccination est couramment pratiquée chez les animaux et plus rarement chez l'homme.

. Le vaccin Sterne est un vaccin vivant constitué d'une suspension de spores produites par une souche (souvent la souche 34F2), ayant perdu le plasmide pXO2 et donc non capsulée. Le vaccin Sterne, adjuvé à la saponine, est mondialement utilisé chez l'animal. La germination des spores contenues dans le vaccin engendre des bacilles non

capsulés, facilement phagocytés mais pouvant produire de petites quantités de toxine suscitant l'apparition d'anticorps neutralisants. Administré à un animal affaibli, ce vaccin peut donner naissance à un charbon vaccinal. En URSS un vaccin de type Sterne, administré par scarification au niveau de l'épaule, a été utilisé chez l'homme. Des études sont en cours pour développer des vaccins utilisables par voie orale ce qui faciliterait la vaccination de la faune sauvage surtout celle des grands herbivores africains (hippopotames, buffles, éléphants,...)

. Les vaccins acellulaires, constitués de fractions purifiées, ont été développés pour un usage chez l'homme. Ces vaccins sont fabriqués au Royaume Uni (filtrat de culture précipité à l'alun d'une souche 34F2 cultivée dans des conditions favorisant la production de l'antigène protecteur) et aux USA (filtrat de culture adsorbé sur hydroxyde d'alumine d'une souche non capsulée dérivée de la souche V770 produisant l'antigène protecteur mais peu de facteur létal et œdémateux). L'emploi de ces vaccins est réservé aux professionnels exposés et aux militaires (le département de la défense des USA envisage la vaccination de plus de deux millions de militaires). Le protocole de vaccination est très lourd (6 injections durant les 18 premiers mois puis un rappel tous les 6 mois) et l'efficacité est inférieure à celle conférée par un vaccin vivant (36 - 38).

L'antibioprophylaxie peut être utilisée, chez l'homme et chez l'animal non vacciné, lorsque les risques de contamination sont réels. Chez l'animal, l'antibiotique le plus utilisé est la pénicilline G. Chez l'homme on utilise généralement la ciprofloxacine ou la doxycycline. En cas de contre-indications à ces molécules, la pénicilline ou l'amoxicilline sont une alternative.

2. Charbon symptomatique

2.1.Définition

Le charbon symptomatique est une maladie infectieuse aiguë très fébrile et non contagieuse directement des bovins et des moutons. En tant que maladie des pâturages, le charbon symptomatique apparaît principalement durant les mois d'été. La maladie est causée par une *Clostridium chauvoei*, bâtonnet, Gram-positif, anaérobie strict, formant des endospores. Il produit une alphatoxine nécrosante. Les spores ont une forte ténacité et peuvent contaminer le sol et les aliments pendant des années. L'agent infectieux provoque une infection locale aigue résultant d'un empoisonnement du sang conduisant rapidement à la mort. C'est une maladie propre aux bovins, mais elle a été rapportée chez le mouton (39).

Le charbon se traduit par une inflammation gangréneuse, oedemateuse et emphysémateuse des muscles entraînant une toxémie grave. La manifestation se fait souvent chez les troupeaux non vaccinés, sous forme d'épizooties majeures qui peuvent être évitées grâce à la vaccination préventive. Des cas enzooties peuvent se manifester dans des effectifs vaccinés. Lorsque la maladie se déclare, il est courant qu'elle atteigne plusieurs sujets en l'espace de quelques jours (40). Le terme « black leg » est bien approprié pour designer la maladie a cause de sa localisation préférentielle sur une patte et le muscle affecté qui devient noirâtre (41).

2.2.Taxonomie

Le charbon symptomatique est connu encore sous l'appellation de « black leg » est du au *Clostridium chauvoei*. C'est une bactérie qui appartient (41):

- AU règne de Bacteria
- A la division de *Firmicutes*
- A la classe de *Clostridia*
- A l'ordre de *Clostridiales*
- A la famille de *Clostridiaceae*
- Au genre de *Clostridium*
- A l'espèce de *Clostridium chauvoei*

- Autres espèces : *Clostridium septicum*, *haemolyticum*, *histolyticum*, *sordellii* qui sont bien présentes au Vakinakaratra (42).

2.3 . Caractère bactériologique

Clostridium chauvæi est un germe tellurique, responsable du vrai charbon symptomatique. Il est anaérobie stricte et capable de sporuler. Cette sporulation aura lieu lorsque les conditions de survie de la forme végétative sont mises en cause. Ces spores sont très résistantes aux conditions de l'environnement et aux désinfectants, elle persiste dans le sol plusieurs années (41).

Il est à l'origine d'une réponse humorale chez l'animal, forte pathogène et produit un alpha toxine hémolytique et nécrosant.

Tableau II : caractères bactériologiques de *Clostridium chauvæi*

Caractères morphologiques	Caractères cultureux
Bâtonnet à bouts arrondis	Anaérobie strict
Dimension : 3,8µ x 0,6 à 0,8 µ	
En chaînette	Colonies punctiformes lenticulaires en 24 heures
Mobile par ciliature pérित्रиче	
Spores ovoïdes déformantes	
Centrales et ou subterminales	Se cultive sur milieux enrichis au sang, au sérum
Gram positif	Gazogène non fétide

Source : (43)

Tableau III : Pouvoir antigénique de *Clostridium chauvoei* supporté par les toxines et les antigènes du corps bactérien

Toxines et enzymes	Antigènes
- Exotoxine protéique létale et antigénique composée par 4 facteurs :	- 2 antigènes somatiques O (thermostable)
Facteurs α : léthal, nécrosant, hémolytique, responsable des toxicités du filtrat, des cultures et des lésions de nécrose hémorragique.	- 1 antigène flagellaire H (thermostable)
Facteurs β : désoxyribonucléase sur les leucocytes	
Facteurs γ : hyaluronidase	
Facteurs δ : hémolysine	

Source : (43)

2.4 Complexité étiologique

Lors de la maladie, il y a encore la participation des autres clostridies et ceci implique la complexité étiologique et même la complication du diagnostic clinique du vrai et du faux charbon symptomatique. La difficulté se repose sur la différenciation entre le vrai charbon symptomatique et l'œdème malin surtout dans les pays tropicaux (44). Des infections mixtes à *Clostridium chauvoei* et *Clostridium septicum* ne sont pas rares (45) mais le rôle de *Clostridium septicum* dans la maladie reste encore discuté par les auteurs (46-49).

La participation d'autres clostridies, tels que *Clostridium septicum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sordellii* et *Clostridium oedematiens*, *Clostridium fallax*, *Clostridium histolyticum* dans la maladie (50). Ces germes sont

isolés dans la tumeur charbonneuse. Cependant le rôle prépondérant de *Clostridium chauvoei* a été rapporté par des auteurs dont Cygan en 1980. Il révèle que sur 60 cas de charbon symptomatique, 50 cas sont dus à l'agent du vrai charbon symptomatique (*Clostridium chauvoei* seul), 6 cas dus à la coexistence de *Clostridium chauvoei* et *Clostridium novyi* et 4 cas dus à *Clostridium chauvoei* et *Clostridium septicum*.

Les premiers cas de charbon symptomatique à Madagascar sont dus à *Clostridium chauvoei* (1, 2, 42, 51).

2.5 Épidémiologie

2.5.1 Épidémiologie descriptive

2.5.1.1 Espèces affectées

Les ruminants sont les cibles principales mais surtout les bovins âgés de moins de 2 ans, accessoirement chez le mouton. La maladie apparaît surtout chez des animaux plétoriques. Mais elle a été signalée chez le mouton (48).

2.5.1.2 Formes d'évolution possibles

Le charbon symptomatique apparaît sous trois formes possibles dont sporadique quand il sévit sur un cheptel immunisé, épizootique lorsque la maladie touche pour la première fois un cheptel non vacciné et enzootique si la forme habituelle rencontrée en élevage extensif ou dans des ranches surchargés (51). C'est le résultat des actions simultanées de champs maudits, de saison pluvieuse et de sujet vulnérable. A Madagascar, cette forme occasionne encore la majorité des pertes dans le sud, l'Ouest et le Moyen Ouest (42).

2.5.2 Épidémiologie analytique

2.5.2.1 Sources de contamination

C'est une maladie de pâturage et d'apparition saisonnière. La contamination se fait à partir des fourrages souillés ou à partir des microlésions intestinales. Ces sources sont :

- Le sol hébergeant les spores
- Les végétaux et les pâturages souillés
- Les matières fécales
- Les cadavres ouverts des animaux morts de la maladie qui dissémine les spores dans le sol et dans l'environnement (1).

La cause de la dispersion rapide du charbon sur tout le territoire de Madagascar se faisait à partir des matières fécales et les déchets de cadavres véhiculés par les rapaces, les chiens et même l'homme (52).

2.5.2.2 Réceptivité et sensibilité

2.5.2.2.1 Facteurs intrinsèques

2.5.2.2.1.1 Espèces

Ce sont principalement les ruminants et plus particulièrement les bovins dont 20% sont porteurs sains. Ce portage se localise surtout sur la rate, le foie et dans le tube digestif (53). A Madagascar, on constate que seule l'espèce bovine est affectée par la maladie (42).

2.5.2.2.1.2 Individu

Ce sont les sujets les plus gras et plus beaux qui succombent en premier. Leur nature vorace et la concentration plus élevées de glycogène dans leur muscle favorisent l'absorption d'un plus grand nombre de spores et leurs multiplications (18). Le rationnement riche en protéine favorise la sensibilité de l'animal au charbon symptomatique (54).

2.5.2.2.1.3 Age

Les sujets âgés de 6 mois à 4 ans sont les plus réceptifs (41). Cependant une différence de réceptivité semble exister avec l'âge (55). Pendant une enzootie en Sardaigne, Contini et al dénombrent :

- 15% des malades âgés de mois de 4 mois
- 57% de 6mois à 4 ans

- 28% pour les plus de 4 ans

2.5.2.2.2 Facteurs extrinsèques

2.5.2.2.2.1 Saison

La saison des pluies favorise l'explosion de la maladie. La maladie sévit plus volontiers au cours des mois chauds de l'année (41).

2.5.2.2.3 Maladies intercurrentes

Le polyparasitisme (fasciolose, strongyloses, ascaridoses) diminue la résistance des animaux et favorise le développement de la maladie (42).

2.5.2.2.4 Condition d'élevage

La maladie semble plus fréquente dans les effectifs qui ont une croissance rapide sous l'effet d'une alimentation poussée (41).

2.6 Mode d'infection

Le charbon symptomatique n'est pas une maladie transmissible. Elle se transmet par la voie directe.

2.6.1 Voie endogène

C'est le franchissement des germes de la muqueuse digestive : *Clostridium chauvoei* fait partie de la flore commensale de l'intestin (41).

Pour les anglosaxons, le vrai charbon symptomatique s'obtient à partir de la voie endogène et l'ingestion par voie buccale.

2.6.2 Voie exogènes

-Voie buccale, lors de l'ingestion des aliments souillés par les spores. Dans le contexte malgache, la voie digestive constitue la porte d'entrée la plus importante (42).

-Voies cutanéomuqueuse : par la rupture de la barrière cutanéomuqueuse à travers les plaies de parturition, de castration, extrémités des membres des animaux éprouvés par de longue distance (51).

- Piqûres ou traumatismes accidentels

2.7 Pathogénie

Le complexe de la pathogénie du charbon symptomatique est constitué de trois paramètres : les corps bactérien, la toxine et les facteurs favorisants.

2.7.1 La toxine

Elle est complexe (56). C'est une exotoxine de nature protéique, soluble, thermolabile, habituellement libérée dans l'hôte pendant la multiplication du germe. Elle diffuse facilement du site d'infection vers les tissus ou cellule cible. Elle possède des activités hémolytiques et nécrosantes.

2.7.2 Les corps bactériens

Ils se présentent sous forme végétative sécrétant immédiatement de la toxine dans les muscles et développe la maladie. Soit sous forme sporulé et attendre que les conditions de germination soient réunis.

2.7.3 La maladie naturelle

Le développement de l'infection naturelle est conditionné par la synergie de ces trois paramètres. Mais il y a encore la pénétration des spores. Après la pénétration, les spores gagnent le sang pour arriver aux muscles. Après ce trajet sanguin, un certain nombre de spores sont détruits par la phagocytose et les autres qui s'en échappent se logent dans les divers organes, dans le tube digestif et dans les masses musculaires. La germination n'a lieu que s'il y a un traumatisme ou à la faveur d'une anaérobiose. Après la germination, la sécrétion de toxine commence mais il reste encore à l'abri de la phagocytose. Cela est dû à l'action chimiotactique négative (facteur β) de la toxine sur les leucocytes. La sécrétion de la toxine continue, détruit les tissus avoisinants et se répand dans tout l'organisme. L'activité hémolytique de la toxine entraîne une hémolyse des globules rouges qui va provoquer la diminution de l'oxygène dans les tissus musculaires et favorise ainsi la germination des autres spores (56). L'activité nécrosante est à l'origine de la destruction des muscles aboutissant à la formation d'une tumeur gangréneuse circonscrite, dominée par une réaction inflammatoire suraiguë. A ce stade, la tumeur constitue une énorme culture élaborant une grande quantité de toxine (58). La

maladie de développe sous forme d'une infection grandissante. Cela est dû à la production de la toxine à travers ses composantes histolytiques et nécrosante (43).

2.7.4 Importance de la toxine dans le développement de la maladie

Minieth en 1948 décrit le rôle primordial de la toxine dans le mécanisme d'apparition de l'infection. La maladie peut être reproduite avec la toxine seule (59). La culture filtrée tue les animaux d'expérience à un degré moindre que la culture totale. L'administration en intraveineuse de la toxine provoque la mort de l'animal, la voie intramusculaire provoque un œdème hémorragique à l'origine de la mort (60).

2.8 Etude anatomo-clinique

2.8.1 Symptômes

Une période d'incubation de 2 à 3 jours précède l'apparition des symptômes. Les bovins atteints présentent des troubles sévères de l'état général et une forte fièvre qui peut aller jusqu'à 45°C. Localement, on remarque au début des enflures chaudes et douloureuses avec formation de gaz, situées principalement dans les parties des membres et du tronc recouvertes de muscles épais. Par la suite, les enflures deviennent vite froides et insensibles. Lorsqu'on touche ces enflures, on entend un crépitement.

2.8.1.1 Forme suraiguë

Souvent on parle de mort subite. Cette forme s'observe chez les sujets immunologiquement vierges lors des épizooties. La mort survient 12 à 24 heures que les symptômes n'ont pas le temps de se développer. Cette forme a été fréquemment observée lors des premiers cas de charbon symptomatique à Madagascar (52).

2.8.1.2 Forme aiguë

C'est la forme la plus fréquente. En plus de l'altération de l'état général, l'anorexie et l'arrêt de la rumination. L'animal boite fortement à cause de la tuméfaction musculaire qui est crépitant à la palpation. Cette tumeur apparaît dans la région proximale de membres, antérieurs le plus souvent, postérieurs parfois. Au début, la tuméfaction musculaire est chaude, douloureuse puis elle devient froide et indolore.

Souvent, cette tuméfaction est accompagnée d'un œdème et un emphysème sous cutané. La peau devient alors craquelée et la mort survient en 1 à 4 jours suivant l'apparition des signes cliniques en absence de traitement.

2.8.1.3 Forme fruste ou bénigne

Cette forme existe chez les sujets vaccinés de plus de 4 ans. L'animal présente une fièvre, une apathie, une dépression. Quelquefois une boiterie légère mais le retour à la guérison est possible même en absence de traitement. L'animal devient alors réceptif aux formes aiguë et suraiguë.

2.9 Lésions anatomiques

Les cadavres d'animaux morts de blackleg ne doivent pas être disséqués sur le terrain car cela libèrerait des bactéries dans l'environnement avec un risque de contamination d'autres élevages. Il ne faut donc pas déplacer tout animal mort au champ. L'autopsie et les prélèvements doivent être fait dans un trou où le cadavre sera incinéré et enfoui après (53, 60).

La putréfaction du cadavre est précoce. Les changements post-mortem peuvent alors être masqués par une formation de gaz, encore plus si l'examen du cadavre est retardé de quelques heures. Il faut donc réaliser l'autopsie le plus rapidement possible. Chez les bovins, des gaz sont souvent détectables sous la peau. La région concernée est alors enflée et crépitante, avec une plaie par laquelle s'écoulent les liquides mousseux. En cas de plaie au niveau d'un membre, le membre atteint reste tendu et raide. L'accumulation rapide de gaz sous la peau et dans la cavité abdominale donne au cadavre une apparence ballonnée avec les membres écartés et en l'air (60). Il peut y avoir des écoulements mousseux et sanguinolents venant de la bouche, des naseaux et de l'anus. Les muqueuses sont souvent hémorragiques. Si la peau autour de l'aire affectée est mobile, il peut y avoir un excès de fluide sanguinolent mousseux et le muscle concerné apparaît sombre et sec. Les lésions musculaires sont en général sèches et nécrotiques et entourées par une aire d'intense congestion (61). Une odeur rance caractéristique se dégage du cadavre (60). Une congestion et une exsudation généralisée avec un épanchement abdominal sont présentes. Une dégénérescence du foie et des

reins qui apparaissent pâles et friables est présente. La rate est parfois engorgée de sang et une adénite est notée dans quelques cas (62).

Il existe des cas sporadiques de charbon symptomatique affectant le cœur (aussi appelé blackleg myocardique). Il n'y a alors pas de signe extérieur d'évidence de maladie. Il semblerait que la fréquence de ces cas augmente à l'heure actuelle. Les lésions des muscles squelettiques sont des hémorragies disséminées. Les lésions les plus notables sont une pleurésie et une péricardite fibrineuse à sérofibrineuse. Une ou plusieurs zones irrégulières, de couleur rouge sombre, d'aspect sec et granuleux ainsi que des pétéchies et des ecchymoses peuvent être retrouvés sur le cœur (62). Un œdème pulmonaire est souvent présent.

Les lésions sont similaires chez les ovins. Toutefois, chez cette espèce, les lésions musculaires sont plus localisées et l'œdème sous-cutané n'est pas marqué. Des gaz sont présents dans les muscles affectés mais en moins grande quantité (60).

Lors d'œdème malin, les lésions musculaires sont plus prononcées que lors du charbon symptomatique (63).

2.10Diagnostic

2.10.1 Epidémiologique

Les éléments de diagnostic sont constitués de l'atteinte simultanée de plusieurs animaux âgés de 6 mois à 4 ans, de la survenue d'un mort brutale des animaux atteints et de l'explosion de cas ou de suspicion pendant la saison favorable à la germination de spores.

2.10.2 Clinique

L'hyperthermie, l'altération profonde de l'état général, le mort subite, l'apparition de tumeur crépitante accompagnée de boiterie permettent de reconnaître la maladie. Les éleveurs eux-mêmes sont capables de poser la suspicion (53, 60).

2.10.3 Différentiel

Le charbon symptomatique doit être distingué :

- Du charbon bactérien ou anthrax qui est dû à *Bacillus anthracis*

- Des autres clostridioses dont l'œdème malin
- De septicémie hémorragique des bovins qui se présente par des manifestations congestivi-hémorragique de toutes les muqueuses, accompagné de l'œdème du pharynx et tuméfaction des ganglions de l'auge.
- D'autres maladies comme la cowdriose qui est due à *Cowdria ruminatium*.

2.10.4 Biologique

Les prélèvements peuvent être des os longs, des morceaux de viande, du sang frais ou sang du cœur. La ponction à l'aiguille des tuméfactions constitue aussi un prélèvement essentiel (60).

La mise en évidence des caractères morphologiques par un examen bactérioscopique des calques d'organes et du sang du cœur, des caractères culturels et biochimiques des germes mais pour plus de précision, le serotypage de l'espèce clostridienne en cause peut être effectué à partir des alcools et les acide gras volatils par chromatographie en phase gazeuse (47).

Le recours à l'immunofluorescence permet de distinguer l'œdème malin et le vrai charbon symptomatique. Le seul support de différenciation possible entre le *Clostridium chauvoei* et le *Clostridium septicum* repose sur les antigènes somatiques en utilisant des anticorps spécifiques conjugués à la fluorescéine (65).

2.11 Traitement

Le traitement des formes aiguës est efficace. Dans les formes suraiguës, la rapidité avec laquelle le charbon symptomatique tue rend les traitements individuels souvent utopiques et inutiles. Les animaux traités tôt avec des antibiotiques et un débridement chirurgical de la tumeur musculaire peuvent survivre bien qu'ils souffrent d'une déformation permanente due à une destruction partielle ou complète des muscles (39A2E) dans les traitements tardifs.

En ce qui concerne l'œdème malin, les animaux affectés doivent être soignés très rapidement étant donné le caractère aigu de la maladie. Le traitement spécifique requiert l'administration de pénicilline ou d'un antibiotique large spectre par voie systémique. Il est possible dans quelques cas, de faire une injection de pénicilline directement dans la plaie et autour de celle-ci. L'administration d'anti-inflammatoires

non stéroïdiens et une fluidothérapie sont également fortement conseillées. Un traitement local de la plaie d'inoculation peut être entrepris en réalisant une incision chirurgicale pour permettre son drainage (60).

2.12 Prophylaxie

2.12.1 Prophylaxie sanitaire

Les mesures consistent à conjuguer des actions en vue d'empêcher la dissémination du germe et la contamination des animaux par :

- Isolement des malades
- Désinfection du matériel contaminé
- Destruction ou enfouissement profond des cadavres
- Eviter la formation des champs maudits en interdisant l'ouverture des cadavres suspects de charbon symptomatique.
- Identification des champs maudits et des zones d'enzooties permanentes en vue de les fermer aux animaux.

2.12.2 Prophylaxie médicale

Le seul moyen de contrôler le charbon symptomatique et l'oedème malin est la vaccination.

Chez les bovins, les veaux doivent recevoir deux doses de vaccin entre 3 et 6 mois. Deux injections à 1 mois d'intervalle sont essentielles pour apporter une meilleure protection. De plus, un rappel de vaccin à 12 mois est fortement recommandé (61).

Attendre l'apparition de la maladie avant de vacciner est imprudent car l'effet de la vaccination (induction d'une immunité suffisante) prend 10 à 14 jours. Si des animaux sont achetés dans une aire touchée par le charbon symptomatique, il est prudent de vacciner tous les nouveaux animaux achetés.

Chez les ovins, les agnelles doivent être vaccinées deux fois de suite, la dernière vaccination étant effectuée environ 1 mois avant l'agnelage et avec un aussi de vacciner les jeunes agneaux avant qu'ils n'aillent pâturer pour la première fois.

Chez les bovins comme chez les ovins, il est préférable d'utiliser un vaccin combiné contenant au moins *Cl. Chauvoei*, *Cl. Septicum* et *Cl. Novyi* (60). En ce qui

concerne l'oedème malin, la vaccination avec des vaccins multivalents doit normalement empêcher la survenue de la maladie.

De plus, il est très important de bien détruire les carcasses d'animaux morts de charbon symptomatique en les brûlant notamment. Pour ce qui est de l'oedème malin, l'hygiène lors d'agnelage ou lors de castration est essentielle chez les ovins.

DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX DE TERRAIN

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES

Chapitre I : Matériels et méthodes

1. Les caractéristiques du site d'étude

1.1 Situation géographique

Le district de Miandrivazo est l'un des cinq districts (plus Morondava, Mahabo, Manja, Belo et Tsiribihina) de la région Menabe. La superficie de Miandrivazo est de 12 196 km². Le district est délimité :

Au Nord par le district de Morafenobe,

- Au Nord-Est par les districts de Tsiroanomandidy et de Soavinandriana
- A l'Ouest par les districts d'Antsalova et de Belo-sur-Tsiribihina
- Au Sud-Est par les districts d'Ambositra et d'Ambatofinandrahana
- A l'Est par le district de Betafo.

Le choix de cette zone est justifié par le climat, l'un des plus chauds de l'île et les conditions de vaccination très difficile (aucune desserte régulière des communes, tout déplacement se fait à pied.)

Les facteurs de détérioration du vaccin sont donc réels.

1.2 Milieu physique : cadre physique et écologique

Le relief du district est accidenté à l'Ouest par le plateau de Bemaraha ; à l'Est par le plateau de Bongolava ; au centre par la plaine de Betsiriry.

Le district est riche en réseau hydrographique. A part les 10 lacs environnants ; on rencontre au Nord le fleuve Manambolo ; au Centre vers le Sud, les fleuves de Mahajilo, Sakeny, Mania, Manambolo, Lohazy et au Sud, le fleuve de Tsiribihina.

Il a deux types de saisons bien distinctes :

- Du mois de Mai à Octobre : saison sèche et fraîche,
- Du mois de Novembre à Avril : période chaude et pluvieuse.

Une période d'environ deux mois, caractérisée par le retour de la chaleur en Septembre, les premières pluies en Octobre constitue une sorte de transition entre deux saisons.

La pluviométrie annuelle est de 1323,3 mm.

1.3 Météorologie

Tableau IV : Météorologies

Latitude (°)	19,32
Altitude (m)	7'
Température moyenne annuelle (°C)	27,20
Température moyenne, mois le plus frais (°)	23,7
Température moyenne, mois le plus chaud (°)	29
Moyenne d'hygrométrie annuelle (%)	58
Evaporation (Piche)	1090

1.4 Milieu humain et social

1.4.1 Composition de la population

La population totale est constituée de 78,7% de ruraux contre 21,3% de citadins. Le RPGH définit la population urbaine comme étant celle résidant dans les communes y compris le chef-lieu de district.

1.4.2 Catégories socio-professionnelles

La population agricole représente les 95,4% de la population totale dont 130 272 agriculteurs-éleveurs et 6856 exerçant d'autres professions (techniciens, commerçants, artisans). La population urbaine s'adonne aussi en grande majorité à l'agriculture et l'élevage.

1.4.3 Situation administrative et démographique

Le district de Miandrivazo est réparti sur 10 arrondissements administratifs, 15 Communes Rurales et 126 Fokontany. Le district compte 143 741 habitants avec une densité moyenne de $12 \pm 9,54$ hab/km².

1.5 Situation socio-économique

1.5.1 Infrastructure

La RN 34 Antsirabe-Morondava passe par Miandrivazo. Le fleuve « Manambolo » est une voie d'appoint appréciable pour les localités du fait qu'il

traverse dans la région enclavée d'Ankavandra. La voie fluviale de « Tsiribihina » est accessible toute l'année.

L'aérodrome de Miandrivazo était initialement bitumé. Actuellement, la piste est tellement abîmée qu'elle ne peut plus supporter que les avions twin. L'aérodrome d'Ankavandra tient une grande importance du fait de sa situation dans la zone enclavée où l'approvisionnement, l'évacuation des produits et le déplacement des personnes dépendent du transport aérien, dans une partie, presque la totalité de l'année.

1.6 Marchés

Ce sont des marchés quotidiens ou hebdomadaires. Les collecteurs achètent directement les produits aux producteurs. Il existe aussi des marchés à bestiaux. Ces marchés existent dans toutes les communes mais la transaction en terme de bovidés se base surtout dans le chef lieu du district, tous les vendredis et aussi à Antsikida, tous les jeudis.

1.7 Elevage

L'élevage demeure une activité importante dans la région. On peut distinguer deux catégories : l'élevage extensif de zébus, d'une part, et l'élevage domestique des autres espèces, d'autre part. On compte 49 945 têtes de zébus dans la zone occupée par le mandataire.

2 Le laboratoire d'accueil

2.1.Généralités et historique de la recherche à l' IMVAVET

L'IMVAVET abrège l'Institut Malgache des Vaccins Vétérinaires. Sa mission consiste à la production et la recherche des vaccins vétérinaires et la commercialisation. Il siège à Ampandrianomby, rue Farafaty à Antananarivo 101. Cette nouvelle appellation date de 1995, mais son activité puise son origine depuis très longtemps :

- En 1906, le Docteur Joseph CAROUGEAU dirige le premier laboratoire vétérinaire de Madagascar, parmi les locaux de l'Institut Pasteur à Ambatofotsikely. Après déménagements effectués à Mahamasina en 1924 au Service provincial de l'élevage, puis dans les nouveaux locaux de l'Institut Pasteur en 1935, l'actuel bâtiment qui héberge l'IMVAVET a été inauguré sur la colline d'Ampandrianomby en 1955 et baptisé Laboratoire Central de l'Elevage sous la direction du Docteur Georges BÜCK. Des appellations se succèdent alors pour ce nouveau bâtiment.
- De 1926 à 1934, sous la direction du Vétérinaire Inspecteur Georges BÜCK, la bactériologie se développe considérablement et l'on fabrique déjà un vaccin anticholérique aviaire à deux injections.
- En 1957 et 1958, il y a eu ouverture du laboratoire de chimie par les pharmaciens Capitaine SAYERSE puis le Commandant Raoul DAUMAS avec comme activité principale l'analyse bromatologique des fourrages ainsi que l'analyse des vitamines et des acides aminés dans les aliments du bétail.
- En 1969, apparition de la maladie de charbon symptomatique et mise au point d'un vaccin anti-symptomatique avec des campagnes de vaccination anti-charbonneuse.
- En 1975, tous les chercheurs et cadres ont été malgachisés.
- A partir de 1978, avec la collaboration entre le DRZV et la GTZ, ont donné les résultats suivants :
 - o La mise au point d'une nouvelle méthode de prélèvement, son envoi et sa conservation (disque de buvard enfilé sur une aiguille).

- L'identification des sérotypes de Clostridium par la chromatographie en phase gazeuse.
- La mise en évidence du Clostridium chauvoei de sérotype 335 différent de 735 utilisé depuis 1969 et qui est originaire d'Isoanala Betroka.
 - 1980-1995 : suite de la même collaboration, devenue coopération entre RDM et la RFA, ont été fait :
- Mise au point d'une nouvelle technique de production de vaccin (nouveau type de fermenteur assurant la culture continue des bactéries).
- Obtention d'une culture plus riche et plus rapide de Pasteurelles, de Bacillus anthracis, de virus de teschen (sur Roller).
- Obtention de vaccin purifié contre les maladies telluriques.
- Obtention de vaccin polyvalent et efficace à volume réduit (1ml/bovin) par rapport au vaccin, contre les maladies telluriques, utilisé jusque là.
- Mise au point d'une technique de production de toxine (ultra filtration sélective) et d'une anatoxine vaccin efficace au 1/5^{ème} de ml.
- La gestion financière de la commercialisation des vaccins devient autonome à partir de 1994 suivis en 1995 par la séparation totale de l'unité des vaccins du FOFIFA et la création de l'IMVAVET.

Actuellement, la recherche effectuée à l'IMVAVET pour la production des vaccins vétérinaires, permet d'améliorer la santé animale à travers le respect des recommandations du fabricant, quant à l'utilisation de ces produits de la recherche. En somme, la recherche est indispensable pour un développement. Après plusieurs années de recherche pour parvenir à ces produits, on peut dire actuellement que le processus de fabrication des vaccins à l'IMVAVET respecte bien la rigueur scientifique et satisfait les exigences de l'Office International des Epizooties (OIE). Donc les vaccins issus de l'institut sont donc des produits sûrs et leur efficacité dépend de leur utilisation sur terrain.

2.2.Monographie du vaccin BICHAR®

- Dénomination commerciale : bichar®
- Dénomination scientifique : spores vivantes atténuées de bacillus anthracis, corps cellulaires de clostridium chauvoei inactivé et anatoxine de clostridium chauvoei
- Origine des souches
 - *Bacillus anthracis* : tierarztliches Institut der Universitat Gotingen Germany
 - *Clostridium chauvoei* : IMVAVET Madagascar
- Les titres des antigènes

Tableau V : valeurs de chaque titre des antigènes

Antigènes	titres	Pureté/stérilité
Spores de bacillus anthracis	5x10 ⁸ -10 ⁹ /ml	Conforme
Corps cellulaires de clostridium chauvoei	10 ¹¹ -10 ¹² /ml	Conforme
Anatoxine de clostridium chauvoei	10 ⁵ -10 ⁶ UI/ml	conforme

- L'adjuvant

On a obtenu un adjuvant de couleur blanche, qui se divise en une phase inférieure blanche et en une phase supérieure limpide au repos

- La couleur

Le vaccin est de couleur blanche, non visqueux, qui se prépare en un dépôt blanc et un surnageant limpide au repos ; pH 6,80 à 7,00. Il contient 5.10⁶ à 10⁷ par ml de spores vivantes atténuées de Bacillus anthracis, 5,2.10⁸ de corps cellulaires de clostridium chauvoei inactivés et 2,5UI/ml d'anatoxine de clostridium chauvoei

- Le conditionnement

- La répartition du vaccin avec la pompe à compression dans des flacons de 50ml sous hotte à flux laminaire
- Le bouchonnement se fait avec du bouchon type pénicilline
- Le capuchonné se fait avec de capsule en aluminium
- Le stockage est à + 4°C dans le laboratoire CQV, mais 4 à 30°C dans le milieu réel

3. Type d'étude

C'est une étude évaluative avec une enquête rétrospective de type longitudinale. Cette étude va évaluer expérimentalement la qualité du vaccin BICHAR® en milieu réel.

4. Période et durée de l'étude

4.1.Période étudiée

La collecte de données, la descente sur terrain et les tests au laboratoire se sont déroulés sur une période de neuf mois, allant du mois de Mai 2011 à Janvier 2012.

4.2.Durée de l'étude

L'étude a duré 2ans, allant du mois de Mai 2011 à Juin 2013.

5. Population d'étude

En tenant compte de la spécificité du vaccin, l'étude se porte alors sur les zébus.

6. Taille de l'échantillonnage

L'étude a été menée dans 6 communes de Miandrivazo dont Miandrivazo, Dabolava, Bemahatazana, Anosimena, Isalo et Ambatolahy. La zone occupée par le mandataire est composée de 10 communes et l'effectif du cheptel bovin est de l'ordre de 49 945. L'échantillonnage est tiré au hasard vu la difficulté de suivi et l'existence des zones enclavées.

2 000 têtes de zébus de différentes catégories d'âge ont été vaccinés avec les lots du vaccin BICHAR® 11/07. Cette taille d'échantillonnage est obtenue à partir du logiciel Win-Episcop®.

7. Limite de l'étude

A cause de la coutume, des rites et du manque de sensibilisation de la population du District de Miandrivazo, il est difficile de pratiquer la vaccination.

8. Les paramètres à étudier

8.1.Mesure de la température de conditionnement

8.1.1. Matériels

- Thermo-enregistreur (Ebro EBI-AE-S version C)
- Glaciaire
- Sac à dos
- Réfrigérateur

8.1.2. Méthodologie

Telle consiste à déposer les 36 lots de vaccin BICHAR® titrés préalablement dans la zone d'étude en les divisant en trois sous lots A, sous lots B et sous lots C. Après tirage au hasard, le sous lot A est placé dans le réfrigérateur du cabinet, le sous lot B et sous lot C dans le milieu ambiant et suivant les modes opératoires et le trajet du vaccinateur.

La mesure de température se fait sur chaque sous lot.

8.2.Titrage des spores de Bacillus anthracis souche 34F2

8.2.1. Matériels

- Pipette de 1ml gradué $1/10^{\text{ème}}$ (stérile)
- Vortex
- Série de milieu Bacillus anthracis
- Milieu solide sur boîtes de Pétri.
- Milieu liquide de dénombrement de 34F2
- 28 échantillons de vaccin pris au hasard parmi l'échantillonnage.
- Chauffe-bain (Lauda)

8.2.2. Méthode

Le titrage des spores d'anthrax 34F2 a été effectué à 6 niveaux :

- La préparation du vaccin à titrer : agitation forte du vaccin avant le premier prélèvement de 5ml.

- Le chauffage du prélèvement se fait dans le chauffe-bain à une température de 65°C pendant 30mn, en agitant toutes les 10mn afin de dissocier les agrégats de spores.
- La préparation successive de la dilution 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , ..., 10^{-7} .
- L'ensemencement immédiat dans le milieu de dénombrement se fait après la dilution. Il y a plusieurs méthodes, mais cette méthode permet d'éviter toute possibilité d'erreur. Il est conseillé de faire le comptage sur trois échantillons, prélevés sur la suspension de spores concentrée. Les spores ayant tendance à se regrouper en amas. (figure 2)
- Le contenu dans chaque milieu est homogénéisé soigneusement avant de les placer dans l'étuve à 37°C pendant 24heures.
- Enfin, la lecture se fait le lendemain en comptant le nombre de colonies de 34F2 sur le milieu.

8.3.Mesure du pH

Le pH de chaque lot final doit être déterminé. Le pH mètre doit être étalonné avec des solutions tampons, l'une de pH 5,0 et l'autre de 7,0. Après rinçage des électrodes avec de l'eau distillée et séchage, il convient de mesurer le pH du vaccin.

8.4.Test de stérilité et pureté du reste de vaccin

8.4.1. Matériels

- Pipettes pasteurs.
- Pipetman,
- Boîtes et tubes, contenant des milieux :
- Bouillon ordinaire
- Bouillon thioglycolate,
- Bouillon viande-foie,
- Milieux de Sabouraud
- Gélose au sang,
- Gélose ordinaire
- 6 échantillons de reste de vaccin tiré au hasard.

8.4.2. Méthodes

8.4.2.1. Contrôle bactériologique et fongique

Le contrôle bactériologique et fongique s'agit de vérifier la présence d'autres germes autres que les souches contenues dans le vaccin. Il se fait à 3 niveaux :

- L'ensemencement des milieux de culture sous hotte à flux laminaire par du vaccin,
- L'incubation à 37°C,
- L'observation et notation de l'existence ou non des germes qui poussent, toutes les 24 heures et jusqu'au 5^{ème} jour de la lecture définitive.

8.4.2.2. Contrôle bactérioscopique

Lors de ce contrôle, l'examen des échantillons de vaccin pris au hasard à l'état frais et par coloration Gram au microscope (x 100).

8.5. Test d'épreuve (*Clostridium chauvæi*)

8.5.1. Matériels

- Souche d'épreuve (*Clostridium chauvæi* 735)
- 36 cobayes pesant de 400 à 500g et qui conviennent bien au contrôle de qualité du vaccin. Ils doivent, préalablement à leur utilisation, être laissés en attente pendant une durée minimale de trois jours, qui leur permettra au nouvel environnement des animaleries où les contrôles doivent être exécutés.

8.5.2. Méthodologie

Le test d'innocuité des vaccins comprend 3 niveaux :

Niveau 1 : Vaccination (BICHAR® lot 11/07) de 4 lots de 6 cobayes et mettre à côté un témoin de 6 cobayes

La manipulation comprend la mise en place de 4 lots de 6 cobayes pour l'épreuve et un autre lot de 6 cobayes pour un témoin et la vaccination de chaque lot d'épreuve.

Niveau 2 : Rappel de vaccination (BICHAR® lot 11/07) près 21 jours de la première injection.

Il s'agit de faire une deuxième injection, 21 jours après la première, suivant l'indication du fabricant.

Niveau 3 : Détermination de la DL_{50} d'une suspension bactérienne diluée de 10 en 10 et inoculée aux cobayes.

DL_{50} (dose létale 50% exprimée en termes de fraction de dilution) : dilution capable de tuer 50% d'individus testés.

La méthode consiste à faire une dilution (eau physiologique de 5%) de la souche d'épreuve pour obtenir une dilution de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , ... à 10^{-9} . 9 lots de 6 cobayes ont été inoculés respectivement avec les dilutions. 1 lot de 6 cobayes a été inoculé avec de souche pure pour servir de témoin positif et un autre avec de l'eau physiologique pour un témoin négatif. Une autopsie des cobayes morts après inoculation a été réalisée.

Mode opératoire (annexe 10)

Niveau 4 : Injection de la souche d'épreuve après 21 jours du deuxième rappel et observation quotidiennement pendant au moins 10 jours.

21 jours après le rappel, les cobayes sont immunisés, l'épreuve d'efficacité a lieu par l'injection de la souche virulente.

On aurait une meilleure preuve de la stabilité du BICHAR® sur terrain si on utilise, pour immuniser les cobayes, le reste de vaccin non utilisé après la campagne de vaccination.

8.6. Mode de collecte, de saisie et analyse des données

8.6.1. Documentation

8.6.1.1. Recherche d'information

La recherche d'information a été faite dès le début de l'étude jusqu'à l'étape finale de la rédaction.

8.6.1.2.Centre de documentation

Des ouvrages, des manuscrits de thèses et de mémoires, traitant en particulier l'élevage et la prophylaxie médicale en terme de maladies telluriques bovines et ovines dans le monde mais surtout à Madagascar ont été consultés au :

- CITE Ambatonakanga
- ESSA
- IMVAVET
- Centre de documentation du DESMV
- Centre de documentation Befelatanana.

8.6.1.3.Internet

La consultation des revues, des ouvrages, des articles, des rapports ainsi que des notes a été surtout consacrée pour les informations sur le charbon symptomatique et bactérien afin de connaître leur prévalence et la qualité des vaccins utilisés pour la prévention de la maladie dans le monde et dans les pays tropicaux.

8.6.2. Collecte des données

Les données concernant la situation antérieure délivrées par la Direction des Services Vétérinaires et le cabinet Vétérinaire Hery à Miandrivazo.

8.6.2.1.Direction des Services Vétérinaires

Les données obtenues dans les rapports concernant les décrets rendant obligatoires la vaccination annuelle contre les maladies charbonneuses (annexe 1), l'arrêté fixant les mesures de lutte contre le charbon symptomatique (annexe 2) et la situation actuelle des maladies telluriques.

8.6.2.2. Cabinet vétérinaire Hery

Des rapports annuels, des cahiers de recensement, des registres cliniques ainsi que différentes archives ont été consultés et dépouillés.

8.7. Enquête

Les enquêtes ont été effectuées auprès des éleveurs et au mandataire. Elle vise la connaissance de l'effectif du troupeau de chaque éleveur et la pratique de la vaccination.

Cette méthode était effectuée comme suit :

- Détermination de la structure générale de l'exploitation, qui a consisté à décrire la conduite de l'élevage, et les soins octroyés aux animaux (traitement antiparasitaire, vaccination...).
- Connaissance de la biosécurité qui a concerné l'implantation de l'exploitation par rapport à différents points (autres élevages bovins...), les pratiques en matière de conduite d'élevage (mesures de biosécurité, historiques sanitaires...).

Des détails supplémentaires ont été recueillis par rapport à des symptômes spécifiques pouvant être liés au charbon symptomatique ou charbon bactérien.

8.8.Traitement des données

8.8.1. Stockage et manipulation

Les données ont été stockées sous Microsoft Office Access 2007. Elles ont ensuite été nettoyées avant d'être codifiées.

8.8.2. Etude des variables


Tableau VI : étude des variables

Variables	Modalités	Observations
Vaccination	Oui Non	<ul style="list-style-type: none"> • Variable binaire • Décrit le fait que l'éleveur vaccine ou non ses bovins
Taux de recouvrement Vaccinal	Oui Non	<ul style="list-style-type: none"> • Variable binaire • Indique la fréquence d'administration du vaccin sur la zone d'étude
Traitement antiparasitaire	Oui Non	<ul style="list-style-type: none"> • Variable binaire • Décrit le fait que l'éleveur vermifuge ou non les bovins
Fréquence des soins	Systématique Non systématique	<ul style="list-style-type: none"> • Variable qualitative nominale • Indique la fréquence d'administration des médicaments chez les zébus
Visite de personnel de soin	Oui Non	<ul style="list-style-type: none"> • Variable binaire • Indique le passage de personnel de soin (vétérinaire, technicien) dans l'élevage
Méthode de Castration	Oui Non	<ul style="list-style-type: none"> • Variable qualitative ordinale • Décrit les pratiques adoptées par l'éleveur pour la castration sanglante ou non

8.8.3. Analyse des données : mesure de la corrélation et l'Odds Ratio

➤ Mesure de la corrélation

L'analyse des données a été effectuée sous le logiciel CORICO. Il s'agit de déterminer la corrélation entre les différents individus et les différentes variables.

L'instant remarquable est marqué par un  (triangle) et les variables en cube



. La corrélation est positive si le trait reliant les deux variables est continu (_____).

Elle est négative si le trait est discontinu (-----). (Annexe 06)

➤ Calcul d'Odds ratio

Ce calcul a été effectué sous le logiciel Epi-info 6.4. Il s'agit d'un tableau 2 x 2 en ciblant les exposés et non exposé et d'autre part les vaccinés et non vaccinés.

Tableau N° VII : tableau 2 x 2 études cas témoin.

Malade	Bien portant	
A	b	Vacciné
C	d	Non vacciné

$$OR = (a+d)/(b+c)$$

Tenons en compte le risque nul qui est égal à 1.

Dans le cas des vaccinations, le résultat est hautement significatif si la valeur de p value est inférieure à 0,05.

Autres paramètres épidémiologiques calculés :

➤ **Prévalence = nombre d'individu malade/ population totale**

➤ **Moyenne = effectif total/ nombre de classe**

➤ **L'IC intervalle de confiance =**

$$IC = [(d - 1,96 ET), (d + 1,96 ET)]$$

L'intervalle de confiance identifie une fourchette de valeurs, situées de part et d'autre de l'estimation, et où l'on peut être sûr à 95% de trouver la valeur réelle. Les deux valeurs qui définissent l'intervalle s'appellent les limites de confiance. L'utilisation d'un pourcentage fixé à 95% est une convention arbitraire.

CHAPITRE II : RESULTATS

Chapitre II : RESULTATS

1. Parcours du vaccin depuis le centre de contrôle qualité jusqu'à l'inoculation aux bovins

Le transport des vaccins BICHAR® et BICHAR COLI® se fait dans des cartons puisqu'ils sont thermostables. Les vaccins vont parcourir 600 km pour arriver au cabinet vétérinaire de Miandrivazo. En arrivant au cabinet, les échantillons sont divisés en trois (3) sous lots et la température du milieu ambiant et du réfrigérateur est mesurée par un thermo enregistreur. La durée de stockage des vaccins avant leur utilisation est de 2 jours.

1.1. Parcours des vaccins pendant la campagne de vaccination

Les vaccins sont sous la responsabilité des vaccinateurs depuis leur enlèvement au cabinet vétérinaire. Ils sont transportés dans le sac à dos du vaccinateur.

1.2. Les valeurs de températures mesurées au cours du trajet des échantillons des vaccins

Tableau VII : les valeurs enregistrées

Date	Température (°C)
23 / 05 / 11 (J ₀)	4
24 / 05 / 11 (J ₁)	[5- 35]
08 / 06 / 11 (J ₁₅)	[18,7-32,8]
23 / 06 / 11 (J ₃₀)	[19,2- 31,8]
08 / 07 / 11 (J ₄₅)	[16- 32]
23 / 07 / 11 (J ₆₀)	[13- 35]
22 / 08 / 11 (J ₉₀)	[16-34]
20 / 11 / 11 (J ₂₄₀)	[19,6-36,2]

1.3. Titrage des spores de *Bacillus anthracis* souche 34F2

Eu égard à la norme imposée par l'OIE dont la valeur moyenne est supérieure ou égale à 10^7 , les titres sont satisfaisants.

Tableau IX : Titrage antigénique des spores de *B. anthracis* dans le vaccin.

	Titre BA
CQV1	7000000
CQV2	12500000
CQV3	15500000
CQV4	7000000
Cab30j	19600000
Refcab30j	16000000
MGcab30j	28000000
Cab45j	18500000
Refcab45j	15000000
MGcab45j	18700000
Cab60j	14000000
Refcab60j	16700000
MGcab60j	10600000
Cab90j	9000000
Refcab90j	10450000
MGcab90j	18000000
Cab240j	6800000
Refcab240j	7000000
MGcab240	9000000

CQV 1 : titre de l'échantillon N°01 pris au hasard titrée dans le laboratoire de contrôle des qualités des vaccins à J₀.

CQV 3 : titre de l'échantillon N°02 pris au hasard titrée dans le laboratoire de contrôle des qualités des vaccins à J₀

Cab30j : titre de l'échantillon de sous lots A pris au hasard après séjour de 30 jours à la température ambiante du cabinet vétérinaire Hery de Miandrivazo.

MGcab30j : titre de l'échantillon de sous lots B pris au hasard après séjours de 30 jours à la température ambiante du trajet parcouru par le vaccinateur jusqu'à l'inoculation du vaccin.

Refcab45j : titre de l'échantillon de sous lots C pris au hasard après séjour de 45 jours à la température du réfrigérateur du cabinet.

Cab60j : titre de l'échantillon de sous lots A pris au hasard après séjour de 60 jours à la température ambiante du cabinet vétérinaire Hery de Miandrivazo.

MGcab60j : titre de l'échantillon de sous lots B pris au hasard après séjour de 60 jours à la température ambiante du trajet parcouru par le vaccinateur jusqu'à l'inoculation du vaccin.

Refcab90j : titre de l'échantillon de sous lots C pris au hasard après séjour de 90 jours à la température du réfrigérateur du cabinet.

Cab240j : titre de l'échantillon de sous lots A pris au hasard après séjour de 240 jours à la température ambiante du cabinet vétérinaire Hery de Miandrivazo.

MGcab240j : titre de l'échantillon de sous lots B pris au hasard après séjour de 240 jours à la température ambiante du trajet parcouru par le vaccinateur jusqu'à l'inoculation du vaccin.

Les titres des vaccins restent dans la norme imposée par l'OIE qui est de 10^7 /ml.

1.3.1. Mesure du pH

Le pH doit être de $7,00 \pm 0,3$. Les valeurs obtenues correspondent à la normale.

Tableau X : pH des vaccins étudiés

Désignation	pH
CQV1	7,00
CQV2	7,00
CQV3	6,90
CQV4	7,00
Cab30j	6,88
Refcab30j	7,00
MGcab30j	6,97
Cab45j	6,90
Refcab45j	7,00
MGcab45j	6,92
Cab60j	6,90
Refcab60j	6,88
MGcab60j	6,96
Cab90j	6,90
Refcab90j	7,00
MGcab90j	6,80
Cab240j	7,00
Refcab240j	6,80
MGcab240	6,92

1.3.2. Mesure de corrélation entre les différentes variables : pH, titre BA, T° de conservation et la durée de conservation

La durée et la température de conservation sont en corrélation positive par contre elle est en corrélation négative avec le titre des spores de *B. anthracis*.

Plus la durée augmente, plus la température augmente, notons que la période de l'étude a durée 2 ans. De plus, le titre diminue si la durée est longue. (Figure 2)

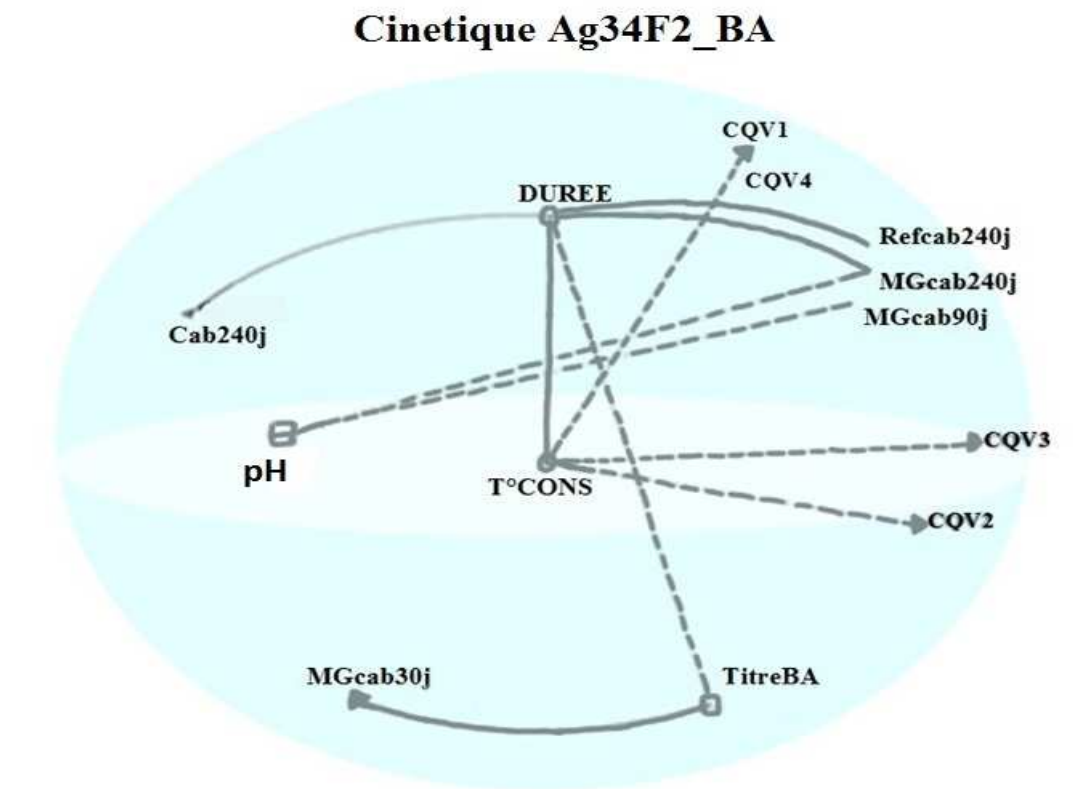


Figure 2 : représentation sur sphère de corrélation de l'évolution du titre d'antigène 34F2, souche Sterne, en fonction de la durée, de la mode de conservation et du pH du vaccin, en tenant compte de la variation des températures du milieu ambiant.

1.3.3. Test de stérilité et de pureté du vaccin non utilisé

1.3.3.1 Contrôle bactériologique et fongique

Après ensemencement sur milieu solide du reste de vaccin prélevé, l'observation après 24 heures de culture montre la présence seule des colonies *Bacillus anthracis*.

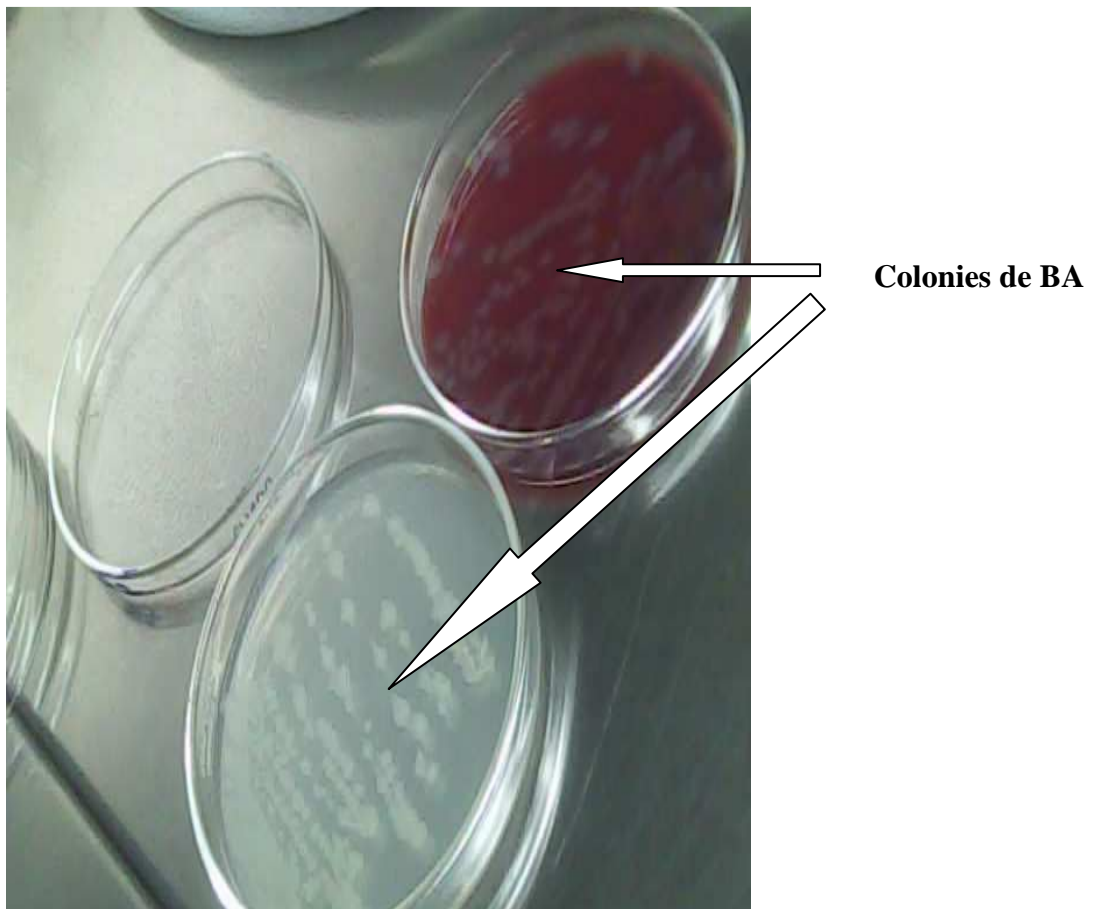


Figure 3 : résultat de la stérilité du vaccin

1.3.3.2 Contrôle des caractéristiques de la bactérie isolée

La bactérie possède les caractères cultureux et tinctoriaux suivants (Tableau X)

Tableau X : caractère du germe *Bacillus anthracis*

Caractères cultureux	<i>Bacillus anthracis</i>
Morphologie	Gros bacille de $5-6\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$
Gram	Positif
Mobilité	Négatif
Type respiratoire	Aéro- anaérobie
Sporulation	Spores ovoïdes
pH de croissance	7 – 7,40
caractère des colonies	colonies rugueuses de 3-4 mm de diamètre blanchâtre à surface chagrinée, contour irrégulier.

1.3.4. Résultat d'épreuve

1.3.4.1. DL_{50} de la souche d'épreuve (souche du laboratoire)

Détermination de la DL_{50} d'une suspension bactérienne diluée de 10 en 10 et inoculée aux souris par la méthode de Reed et Muench.

Selon la méthode de Reed et Muench :

Tableau XI : Nombre de vivant et mort pour chaque dilution

I	II	III		IV		V
Dilutions	N d'animaux morts	Nombre d'animaux		Somme des animaux		%
	N d'animaux inoculés avec le BICHAR® sorti du laboratoire après séjour de 90 jours au milieu ambiant	Morts	S vivants	Morts	Survivants	De mortalité
10^{-1}	6/6	6	0	25	0	100
10^{-2}	5/6	5	1	19	1	95
10^{-3}	4/6	4	2	14	3	82
10^{-4}	4/6	4	2	10	5	66
10^{-5}	3/6	3	3	6	8	42
10^{-6}	2/6	2	4	3	12	20
10^{-7}	0/6	0	6	1	18	5
10^{-8}	1/6	1	5	1	23	4
10^{-9}	0/6	0	6	0	29	0

En III, sont portés les chiffres réels d'animaux morts et survivants.

En IV, sont portés les chiffres cumulatifs, calculés à partir des chiffres réels en postulant que tout animal après inoculation d'une dose donnée serait mort si on lui avait inoculé une dose plus forte, et, réciproquement, que tout animal ayant survécu à l'inoculation d'une dose donnée aurait forcément résisté à l'inoculation d'une dose plus faible. Les chiffres de IV sont obtenus par l'addition successive des chiffres de II, allant

de bas en haut pour les animaux morts et de haut en bas pour les survivants. Cet artifice de calcul permet d'augmenter le nombre d'animaux de chaque lot et donc la précision statistique sur la mesure du pourcentage de mortalité calculé à partir des chiffres de IV et non de III.

La DL_{50} est déterminée par la formule $X = [(M - 50) / (M - m)] \times d$

M : % de mortalité de la dilution critique supérieur ici M=66

m : % de mortalité de la dilution critique inférieur ici m = 42

d : échelle de log ici d = 1

$X = [(66-50) / (66-42)] \times 1 = 0,7$

Il n'y a aucune uniformité de la dose d'épreuve employée pour vérifier l'efficacité des vaccins contre le charbon symptomatique. D'après la méthode de Reed et Munch, la DL_{50} est la correspond à la dilution de $10^{-4,7}$. A cette valeur, on a pu constater que 50% des animaux d'épreuve ont été tués.

1.3.4.2. Résultat du test de réactivité

Parmi les 4 lots de 6 cobayes vaccinés, un cobaye n'a pas survécu à l'épreuve ainsi que les témoins.

Le suivi de chaque animal a duré pendant 5 jours.

Tableau XII : Résultat d'épreuve de *Clostridium chauvoei*

Malade	Bien portant	
1	23	Vacciné
5	1	Non vacciné

D'après le logiciel Epiinfo 6.4, l'Odds ratio = $[(1 \times 1) / (23 \times 5)]$

OR= 0, 05

IC_{95%}= [0,07 – 0,35]

p value : 0,0002 < 0,05

Le taux de protection du vaccin est hautement significatif car le p value est largement inférieur à l'Odds ratio.

1.3.5. Etude des variables

Tableau XIII : Les variables pouvant influencer l'efficacité de la vaccination

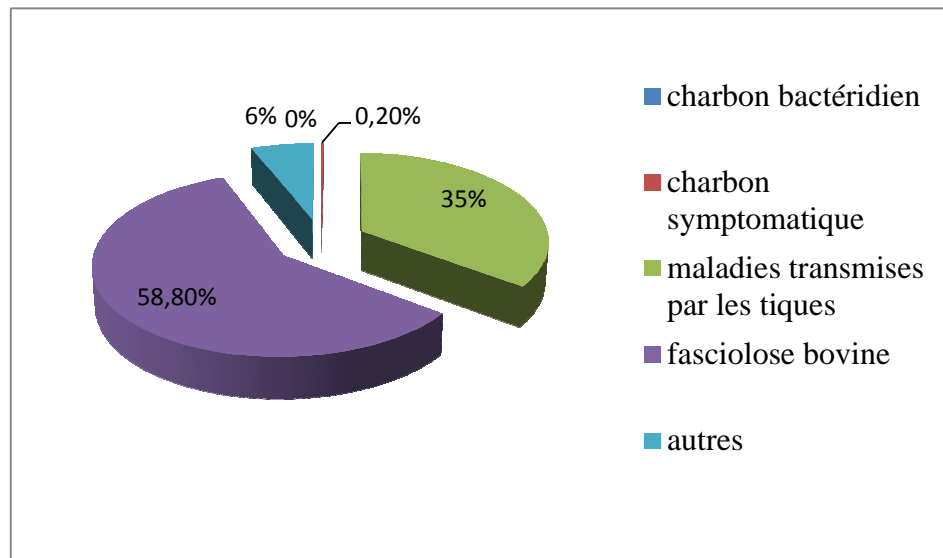
Variables	Modalités	Observations	Résultat
Vaccination	Oui Non	<ul style="list-style-type: none"> • Variable binaire • Décrit le fait que l'éleveur vaccine ou non ses bovins 	<ul style="list-style-type: none"> • 100% • 0%
Traitement antiparasitaire	Oui Non	<ul style="list-style-type: none"> • Variable binaire • Décrit le fait que l'éleveur vermifuge ou non bovins 	<ul style="list-style-type: none"> • 2% • 98%
Recouvrement vaccinal	Oui Non	<ul style="list-style-type: none"> • Variable binaire • Indique la fréquence d'administration du vaccin sur la zone d'étude 	<ul style="list-style-type: none"> • 52,9 • 47,1
Fréquence des soins	Systématique Non systématique	<ul style="list-style-type: none"> • Variable qualitative nominale • Indique la fréquence d'administration des médicaments chez les zébus 	<ul style="list-style-type: none"> • 35% • 65%
Visite de personnel de soin	Oui Non	<ul style="list-style-type: none"> • Variable binaire • Indique le passage de personnel de soin (vétérinaire, technicien) dans l'élevage 	<ul style="list-style-type: none"> • 57% • 43%
Méthode de Castration	Oui Non	<ul style="list-style-type: none"> • Variable qualitative ordinale • Décrit les pratiques adoptées par l'éleveur pour la castration sanglante ou non 	<ul style="list-style-type: none"> • 70% • 30%

Tous les éleveurs vaccinent leurs cheptels (100%). Par contre, une faible proportion a recours à des traitements antiparasitaires, soit 2%. Les soins, c'est-à-dire les

traitements apportés lors d'une intervention par les personnels des soins vétérinaires, se font de façon systématique par 35% des éleveurs. Plus de la moitié d'entre eux, soit 57%, ont recours à un personnel de soin (vétérinaire ou technicien) pour l'administration de soins des animaux, et 43% le font eux-mêmes à partir des plantes ou autres choses. Enfin, 70% de ces éleveurs adoptent la castration sanglante.

1.3.6. Maladies prédominantes

Le charbon symptomatique, l'anthrax, la fasciolose et les maladies transmises par les tiques affectent surtout les bovins. La fasciolose et les maladies transmises par les tiques présentent une forte prévalence tandis qu'on note quelque cas sporadique de



charbon symptomatique.

Figure 04 : les maladies prédominantes dans les 6 communes

La prévalence de la fasciolose bovine atteint les 58,80% dans la zone d'étude tandis que des cas sporadiques de charbon symptomatique apparaissent toujours (0,2%) malgré la vaccination.

CHAPITRE III : DISCUSSION ET PROPOSITION

I. DISCUSSION

1. Explication ou commentaire des résultats obtenus sur terrain

1.1 Le parcours du vaccin depuis le centre de contrôle qualité jusqu'à l'inoculation aux bovins

L'identification des différentes étapes du parcours des vaccins a été faite et observée lors de la mise en œuvre de la campagne de vaccination de mois d'Avril à juillet. Plusieurs critères ont été constatés. Les vaccins sont exposés à la température ambiante de 5°C à 36,5°C pendant une durée de 240 jours contrairement à la norme imposée par le fabricant avec une température ambiante de 22 à 25°C pendant 90 jours et vue la difficulté de les garder à basse température.

Le lot du vaccin BICHAR® lot 11/07 est de bonne qualité et ayant subi le contrôle bactériologique et immunologique à la sortie de l'IMVAVET, cette étape est nécessaire pour la détermination des éventuelles échecs de vaccination et la détermination de la persistance du charbon symptomatique liés aux différents critères mesurés.

1.2 Les valeurs de températures mesurées au cours des trajets des échantillons des vaccins

La connaissance de la thermostabilité des vaccins est nécessaire pour assurer leur innocuité (c'est-à-dire leur absence de nuisance) et leur efficacité. Elle permet au responsable de la gestion des vaccins de mettre en place les conditions optimales de leur conservation au moyen d'une chaîne du froid adaptée.

Du centre de contrôle au cabinet vétérinaire de Miandrivazo, la température enregistrée varie de 5°C à 35°C, la variation brusque de la température peut entraîner une altération du vaccin ou la modification des ses pouvoirs immunologiques.

Tous les vaccins sont sensibles à la chaleur mais à des degrés divers. Ainsi, certains peuvent supporter des températures de 37° C plus de 4 semaines en gardant leur potentiel immunogène. C'est le cas du vaccin BICHAR® étudié qui donne un taux de protection de 98,5%.

Chaque exposition à des températures supérieures à + 8° C a un effet cumulatif sur le potentiel immunogène des vaccins.

De 23 Mai au 20 Novembre 2011, on note une variation de la température ambiante de 4°C (température du réfrigérateur du centre de contrôle de qualité du vaccin du labo) à 36,2°C température enregistrée vers midi le jour du 20 Novembre 2011.

1.3 Titrage des spores de *Bacillus anthracis* souche 34F2

La variation de titre des spores de *Bacillus anthracis* n'est pas significative. Les titres enregistrés sont supérieurs ou égaux à 10^7 /ml qui est la norme imposée.

Une erreur de manipulation peu engendrer une augmentation de la sporulation des souches en donnant une concentration de MGcab30 $2,8 \times 10^7$ /ml.

1.4 Les variables pouvant influencer l'efficacité du vaccin

1.4.1 Traitement antiparasitaire

Vu les qualités de la population, seuls 2% des éleveurs pratiquent la vermifugation avec seulement 35% de soin systématique. L'absence de traitement antiparasitaire n'influence pas l'efficacité du vaccin.

1.4.2 Méthode de castration

La plupart des éleveurs pratiquent la castration de leurs zébus surtout ceux destinés pour le trait et le travail. 30% de la pratique est décrite sanglante. Avec 30% de taux, cette variable n'influence pas aussi l'efficacité du vaccin en voyant le taux de morbidité (0,2%).

1.4.3 Les maladies prédominantes

La prévalence du charbon symptomatique est de 0,20% en cinq ans. Ce taux est obtenu, vu le taux de couverture vaccinal et la desserte des différentes localités. De plus, on a pu constater que même s'il y a les maladies prédominantes, celles-ci n'influencent non plus l'efficacité du vaccin.

2. Comparaison entre divers résultats bibliographiques et résultats sur terrain

2.1. Norme de conservation

Les normes de conservation des vaccins sont définies par le fabricant et le programme national de vaccination. Actuellement, l'OIE recommande que tous les vaccins soient conservés de façon continue à des températures comprises entre + 2° C et + 8° C. Le rangement correct des vaccins dans les équipements de la chaîne du froid contribue à leur qualité. Il est organisé en fonction de la thermosensibilité des vaccins. Les vaccins les plus sensibles à la chaleur sont disposés à proximité des éléments producteurs de froid (partie haute dans les réfrigérateurs verticaux). Les flacons de vaccins ouverts pouvant être conservés dans un réfrigérateur. La température de conservation du vaccin étudié diffère de celle imposée. De plus, lors du transport des échantillons, on a pu noter un choc thermique pouvant altérer l'efficacité du vaccin.

D'après Misra R. P. le vaccin doit être conservé à l'abri de la lumière et au sec. Dans les conditions du terrain, il est difficile de les garder sous froid pendant une longue durée.

Le vaccin BICHAR® est thermostable, c'est la qualité primordiale pour son utilisation dans les contextes malagasy de la campagne de vaccination bovine annuelle.

Il n'est donc pas altéré malgré les écarts de température subis sur terrain.

2.2. Effet de la température

D'après E. SHLYAKHOV et al, les résultats de la vaccination avec des bactéries capsulées sont, globalement, satisfaisants, les vaccins pastoriens présentaient encore de graves inconvénients. Si l'exposition à des températures élevées augmentait bien la fréquence de l'apparition des mutants avirulents, certains lots de vaccins conservaient une virulence résiduelle marquée (47). D'après les résultats de température mesurée, on note une plage de variation de 5°C à 35°C, un choc peut alors survenir, entraînant une altération du vaccin.

De plus cette altération peut être à l'origine d'une sporulation des souches en donnant une augmentation du titre du vaccin.

Dans ce cas, en absence du système de réfrigération, la durée moyenne de conservation du vaccin ne devrait pas excéder 90 jours pour préserver son efficacité.

Le titre du vaccin diminue au-delà de cette durée de conservation ainsi que ses qualités immunologique et bactériologique.

2.3. Le titre du vaccin

Le vaccin BICHAR® 11/07 garde le titre imposé par l'OIE (10^7 /ml). Malgré la présence des champs maudits, on n'a pas pu découvrir l'apparition des mutants avirulents. Les contaminations éventuelles du reste de vaccin après l'utilisation répétée de la même aiguille n'ont pas été détectées. Le titre des antigènes permet alors la protection de l'animal pendant une année.

Quelques cas ont été observés en 2004 dans la zone d'étude liée à la difficulté de l'accès des lieux enclavés (68).

2.4. Test d'épreuve

Lors du test d'efficacité, les cobayes témoins sont morts avec des lésions caractéristiques du charbon symptomatique. Ils présentent des muqueuses hémorragiques. La peau de la tumeur est mobile, il peut y avoir un excès de fluide sanguinolent mousseux et le muscle concerné apparaît sombre et sec. Les lésions musculaires sont en général sèches et nécrotiques et entourées par une aire d'intense congestion (60). Une odeur rance caractéristique se dégage du cadavre (61). Une congestion et une exsudation généralisée avec un épanchement abdominal sont constatées. Une dégénérescence du foie et des reins qui apparaissent pâles et friables est présente. La rate est parfois engorgée de sang et une adénite est notée dans quelques cas. Lors de l'autopsie, des lésions ont été observées au niveau du point d'inoculation, des lésions musculaires au niveau des membres postérieurs et au niveau des intercostaux, des exsudats sanguinolents dans le tissu sous cutané, une congestion de foie et une congestion pulmonaire.

Le résultat montre que le vaccin protège à 98,5% les cobayes vaccinés. Or, lors des enquêtes menées auprès des éleveurs, des cas de charbons symptomatiques ont été signalés. La persistance de cette maladie s'explique alors par le fait que la vaccination n'est pas toujours préservatrice à 100%.

Souvent, la vaccination est inefficace parce qu'elle est faite sur des sujets qui ne peuvent pas s'immuniser. C'est le cas pour les jeunes veaux. Habituellement, ils ne

bénéficient de l'inoculation qu'à dater du quatrième mois, âge où ils deviennent aptes à contracter le charbon (49).

L'épreuve après 21 jours n'est pas le seul moyen de vérifier l'efficacité du vaccin, parfois, d'autres cas peuvent entraîner la mort des animaux de laboratoire et risque de fausser les résultats. Lors de cette étude, l'épreuve de la sérologie n'a pas été effectuée vu la difficulté d'avoir une réponse fiable suite à une vaccination à partir d'une souche Sterne. D'après C. Pezard et al., les deux toxines sécrétées par *Bacillus anthracis* sont composées de combinaisons binaires de trois protéines:

L'antigène protecteur (PA), le facteur léthal (LF), et l'œdème facteur (EF). Six souches mutantes qui sont déficientes dans la production d'un ou deux de ces composants de la toxine ont été préalablement construites et caractérisées.

Dans ce travail, ils ont examiné la réponse d'anticorps à la production *in vivo* de PA, LF et EF chez des souris immunisées avec des spores de souches de la production de ces protéines. Des titres élevés d'anticorps anti-PA ont été observés après vaccination avec toutes les souches de la production de PA, tandis que les titres d'anticorps anti-EF et LF étaient faibles chez les animaux vaccinés avec des souches productrices(71).

En revanche, la vaccination avec des souches productrices soit PA et EF ou PA et LF a entraîné une augmentation respective de la réponse immunitaire à EF ou LF, Les différents niveaux de protection des souris immunisées avec des spores de souches mutantes permettent non seulement de confirmer le rôle d'AP comme l'antigène protecteur majeur dans la réponse humorale, mais aussi d'indiquer une contribution significative de la LF et EF à l'immunoprotection. Ils ont constaté, toutefois, que les souches PA-déficientes ont également été en mesure de fournir certaines protections, ce qui suggère que les mécanismes immunitaires autres que la réponse humorale peuvent être impliqués dans l'immunité à l'anthrax. Enfin, une souche de contrôle manquant de la toxine plasmide codant était incapable de fournir une protection ou de provoquer une réponse immunitaire contre des antigènes bactériens, indiquant un rôle possible pour pXO1 dans la survie de *B. anthracis* dans une hôte. En outre, l'épreuve de la sérologie devrait être effectuée lors du contrôle du niveau de protection contre le charbon symptomatique (02).

2.5. Les paramètres pouvant influencer l'efficacité du vaccin

2.5.1 La vaccination

2.5.1.1 La vaccination en totalité du cheptel

La vaccination est le seul moyen efficace pour prévenir la maladie, par contre lors de la campagne de vaccination, l'effectif total du cheptel n'est pas vacciné vu la rétivité de certains bovins présents au moment de la vaccination. Au moment de l'enquête, les éleveurs prétendent vacciner en totalité leur cheptel. Mais, la peur des « Dahalo » les dissuade d'amener tous les animaux au centre de vaccination. Les Dahalo profitent souvent de cette occasion pour voler les troupeaux après la vaccination.

2.5.2 Visite du personnel de soin

Dans la zone d'étude, chaque vaccinateur ou technicien est responsable de deux communes. Pour les lieux enclavés, la fréquence de visite est rare à cause de l'éloignement de la distance et l'absence de route carrossable.

2.5.3 Polyparasitisme

Le taux de la vermifugation systématique est seulement de 2%. Or, d'après Ranaivoson en 1991, le polyparasitisme (fasciolose, strongyloses, ascaridioses) diminue la résistance des animaux et favorise le développement de la maladie.

La prévalence de 58,80% de la fasciolose sur le cheptel bovin de la zone d'étude, ne semble pas influencer significativement sur l'efficacité du BICHAR®.

2.6 La persistance de la maladie charbon symptomatique

Les cas de charbon symptomatique ont été déterminés lors des enquêtes auprès des éleveurs. Une estimation du taux de suspicion de charbon survenu dans la zone d'étude peut aller jusqu'à 0,2%. D'après les signes cliniques et lésionnels suivants : la boiterie et la tuméfaction crépitantes du muscle de l'épaule confortent la suspicion de la

maladie. Cependant ces signes sont insuffisants pour confirmer avec certitude que c'est du vrai charbon symptomatique. Le seul moyen de confirmer les suspicions reste l'analyse bactériologique (43). Il est difficile de distinguer le vrai charbon symptomatique d'autres tumeurs charbonneuses, donc l'affirmation des éleveurs doit être vérifiée dans un laboratoire. Mais les éleveurs ont l'habitude et reconnaissent le Besoroka de plus, souvent.

3. Validation statistique des principaux résultats

3.1. Différences

La prescription du fabricant (conservation à 18°C et à l'abri du soleil) n'a pas été prise en compte, la conservation du vaccin se fait à une température ambiante de 18°C à 35°C. Les résultats obtenus ont une différence si l'on se réfère au titre des antigènes de *Bacillus anthracis* présente dans 1ml de vaccin. Les moyennes obtenues ne diffèrent pas significativement de la norme qui est de 10^7 /ml mais on peut noter quand même de la large différence entre CQV1 et MGcab30j.

Le taux de couverture vaccinale qui est de 54,2% en 2011 justifie la persistance de la maladie malgré la campagne de vaccination obligatoire depuis 1970.

3.2. Corrélation

D'après la figure N°03, la durée de conservation et la température sont corrélées positivement. Plus la durée augmente, plus la température augmente. Ceux-ci s'expliquent par la période de la réalisation de l'étude qui est encore une période fraîche, mais après 240 jours dans la température ambiante, le titre cab240j est de $0,68 \times 10^7$ /ml, on note une faible diminution du titre.

Le titre et le pH sont corrélés négativement, puisque si le pH devient acide, cela va entraîner l'altération du vaccin. Notons que la souche 34F2 a besoin d'un $\text{pH}=7,0\pm 0,3$ pour pouvoir sporuler, l'acidité du vaccin peut entraîner un grand problème au niveau du comptage. Un pH inférieur à 7 empêche la croissance du *Bacillus anthracis*.

4. Identification des problèmes

D'après l'étude effectuée, des problèmes ont été soulevés parmi les hypothèses proposées. Le taux de recouvrement vaccinal, la vaccination en totalité du troupeau de chaque éleveur, le statut immunitaire des jeunes animaux inférieur à 4 mois, la difficulté de différencier, le vrai charbon symptomatique des autres tumeurs charbonneuses, la présence des zones difficiles d'accès, les mythes et les croyances qui rend difficile les conditions de vaccination et enfin les « dahalo » sont les problèmes soulevés qui rendent possible la persistance du charbon symptomatique.

II. Proposition de solution aux problèmes

Au terme de ces discussions, cette étude suscite quelques perspectives futures :

1. court terme

- Un spécialiste de laboratoire de l'IMVAVET doit former et sensibiliser les vétérinaires sanitaires et leurs techniciens pour respecter les normes de conservation et l'utilisation des vaccins.
- Les autorités de l'IMVAVET doit contrôler et suivre les activités sur terrain pour une application correcte des normes et standard pendant la manipulation des vaccins depuis l'achat jusqu'à l'inoculation aux bovins.
- Chaque quartier doit mettre en place un bon couloir de vaccination pendant la campagne de vaccination pour la bonne pratique de la vaccination, pour la sécurité du vaccinateur et enfin le respect de la voie d'injection et la dose injectée
- Le vétérinaire mandataire doit recruter d'autres vaccinateurs pour augmenter le taux de recouvrement vaccinal.
- Le vaccinateur doit vérifier les troupeaux présents au moment de la vaccination pour éviter les fraudes dans les cahiers de zébu. Certifiés par les autorités locales.
- Le vétérinaire mandataire doit contrôler l'effectivité de la vaccination pour les 80% de l'effectif avancés dans les rapports annuels en comparant le nombre des vaccinés et le nombre de doses livrées par l'IMVAVET.

2. A moyen terme

- Le Ministère doit sortir une note pour la mise au marché du vaccin BESORVAX® pour prévenir l'œdème malin qui est semblable au vrai charbon symptomatique et pour réduire le taux de persistance de cette maladie.

3. A long terme

- La nécessité d'une étude des niveaux d'infestation parasitaire pour confirmer l'influence du polyparasitisme sur l'immunité de l'animal pendant et après la vaccination ; ceci pour améliorer les méthodes adoptées pendant la campagne de vaccination.
- L'épreuve sur le cobaye après 21 jours du rappel n'est pas suffisante pour juger de l'efficacité à long terme du vaccin, il faudra faire un suivi de la cinétique d'anticorps contenus dans le sérum des bovins vaccinés.
- L'analyse sérologique des animaux qui ne peuvent pas s'immuniser est nécessaire pour démontrer l'importance des champs maudits.
- Chaque brigade doit envoyer des agents de sécurité (gendarmes) pendant les campagnes de vaccination pour l'assurance des éleveurs.

CONCLUSION

CONCLUSION

Au terme de l'étude, les résultats montrent que :

La mise en œuvre de la campagne de vaccination est devenue une routine. La dose vaccinale prescrite pour chaque animal et le rappel après 21 jours de la 1^{ère} injection est respectée en théorie mais rencontre des problèmes dans la pratique.

La conservation dans le milieu ambiant et la durée de conservation a un impact sur le titre, l'acidité et l'altération du vaccin au-delà des 90 jours imposés par le fabricant.

L'injection du vaccin au moment de la vaccination n'est pas correcte, vu l'état du couloir de vaccination et les réticences des zébus.

La qualité sur terrain du vaccin BICHAR® reste intacte.

Le taux de protection du vaccin est hautement significatif après le test d'épreuve effectué sur les cobayes. Le vaccin est efficace car il procure une protection de 98,5% à 21 jours du rappel (période à laquelle le taux d'anticorps est supposé au maximum).

L'efficacité du vaccin et le faible taux de déparasitage doivent être tenus en compte car le polyparasitisme joue un grand rôle dans l'affaiblissement de l'immunité des zébus.

La persistance des maladies charbonneuses n'est donc pas due au vaccin.

La présence des zones enclavées, les mythes et les croyances rendent difficiles la pratique de vaccination dans certaines zones.

Lors de l'étude, divers problèmes ont été identifiés. La recherche d'autres causes est ouverte en particulier l'influence des manipulations par les vaccinateurs et de l'insuffisance du taux de vaccination (52,9%).

ANNEXES

**Annexe 01 : Décrets rendant obligatoires la vaccination annuelle contre les
maladies charbonneuses**

Art. 3. — La circulation des animaux de l'espèce bovine en dehors des limites de la sous-préfecture d'origine, dans et hors des provinces où la vaccination contre le charbon symptomatique est réglementairement organisée, est subordonnée à la vaccination contre le charbon symptomatique et contre le charbon bactérien depuis moins d'un an.

Art. 4. — Les conducteurs ou transporteurs d'animaux de l'espèce bovine circulant dans ou hors des limites des provinces où la vaccination contre le charbon symptomatique est réglementairement organisée, doivent obligatoirement être en mesure de présenter immédiatement les certificats de vaccination à toute réquisition de l'autorité.

Art. 5. — Les passeports de bovidés prévus à l'arrêté du 7 mai 1921, modifié par l'arrêté du 9 décembre 1940, ne peuvent être délivrés qu'au vu des certificats de vaccination et doivent en mentionner les références.

Référence du passeport est de même portée au dos du certificat de vaccination rendu ensuite au propriétaire.

Art. 6. — Des arrêtés du Ministre de l'agriculture, de l'expansion rurale et du ravitaillement préciseront en tant que de besoin les détails d'application du présent décret.

Art. 7. — Les infractions aux dispositions du présent décret et des arrêtés pris pour son application seront punies des peines prévues par les articles 2, 3 et 4 de l'ordonnance n° 62-088 susvisée.

Art. 8. — Le Ministre de l'agriculture, de l'expansion rurale et du ravitaillement, le Ministre chargé de l'intérieur, le Garde des sceaux, Ministre de la justice sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent décret qui sera publié au *Journal officiel* de la République.

Source : DSV

Annexe 2 (source : DSV)

ARRÊTÉ N° 1709/98 du 09.03.98 fixant les mesures de lutte contre le Charbon symptomatique

Chapitre 1 : Mesure à prendre en cas de suspicion

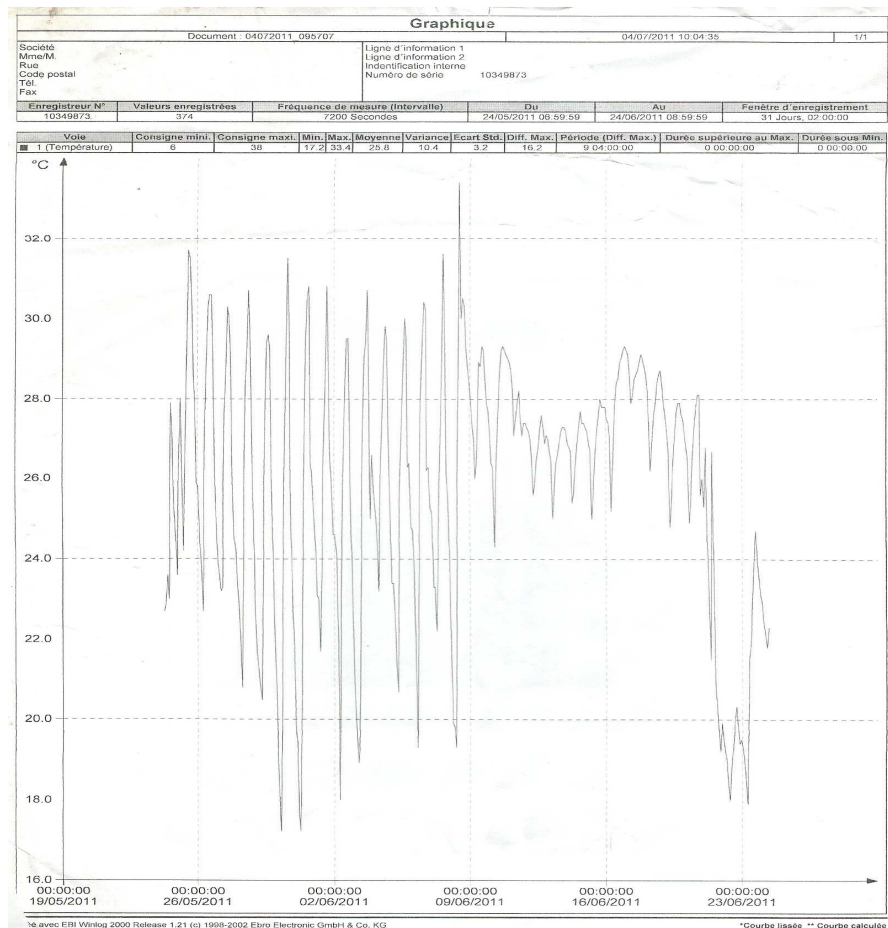
- **Art. 3 :** Lorsque dans une exploitation se trouvent des bovidés suspectés d'être atteint de CS, l'autorité administrative territorialement compétente prend un arrêté de mise sous surveillance pour une durée qui entraîne l'application des mesures suivantes :
 - Isolement, séquestration, visites, recensement et marquage des bovidés,
 - Interdiction de tout mouvement de bovidés en provenance ou à destination,
 - Accès ou sortie de tout animal mort ou vivant, tout objet, produit ou denrée de l'exploitation interdit, sauf autorisation de la DSV ou de son représentant local,
 - Réalisation des prélèvements,
 - Réalisation d'enquête épidémiologique.
- **Art. 5 :** L'AATC, sur proposition du Directeur SV ou son représentant local, peut appliquer l'une des mesures prévues à l'art. 3 à d'autres exploitations dans le cas d'une possibilité de contamination.
- **Art. 6 :** L'arrêté de MSS est abrogé à partir du 3^{ème} jour suivant la visite lorsque toute suspicion de CS est écartée.
- Le vétérinaire en fait un rapport à l'autorité hiérarchique.

Chapitre 2 : Mesures à prendre en cas de confirmation

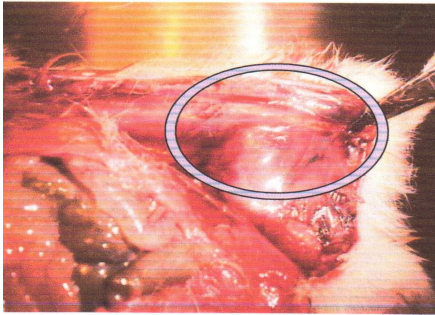
- **Art. 7 :** Lorsque le CS est confirmé, l'AATC prend, sur proposition de la DSV ou son représentant local, un arrêté déclaratif d'infection (ADI) pour une durée de 60j.

- Cet arrêté délimite un périmètre déterminé permettant l'application des mesures suivantes :
 - isolement, séquestration, cantonnement, visite, recensement des bovidés dans le périmètre,
 - mise en interdit du périmètre,
 - interdiction de tenir des foires et marchés, transport et circulation des bovidés, et autre rassemblement,
 - désinfection des étables, parcs et terrains de parcours, véhicules ayant servi au transport, destruction des matières alimentaires et fumiers.
- A l'expiration de la durée de surveillance fixée par l'ADI, la levée des mesures sanitaires n'interviendra que 20j. après la disparition du dernier cas.
- Art. 9 : L'exposition, la vente ou la mise en vente des bovidés atteints de CS sont interdites.
- Art. 10 : Il est interdit de hâter la mort des malades par effusion de sang et de dépouiller les cadavres.
- Art. 12 : En cas d'épizootie, et à défaut de propriétaire, l' AATC désigne un enclos où les cadavres sont enfouis.
- Art. 13 : Il est interdit de faire paître un animal sur le terrain d'enfouissement.
- Art. 14 : Dans le cas d'épizootie de CS, les mesures de prophylaxie collective (vaccination et traitement curatif) sont obligatoires.

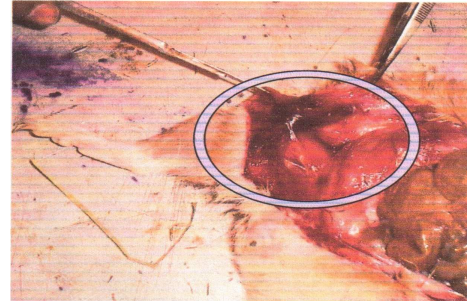
ANNEXE 03 : COURBE DE VARIATION DE LA TEMPERATURE



ANNEXE 04 : LÉSIONS OBSERVEES LORS DE L'AUTOPSIE



**Présence de gaz sous le point
d'inoculation**



**Lésions musculaires sombre,
sèches et nécrotiques**



**Lésions musculaires
sèches entourées par une
aire d'intense congestion**



**Exsudat sanguinolent dans
les tissus sous-cutané**

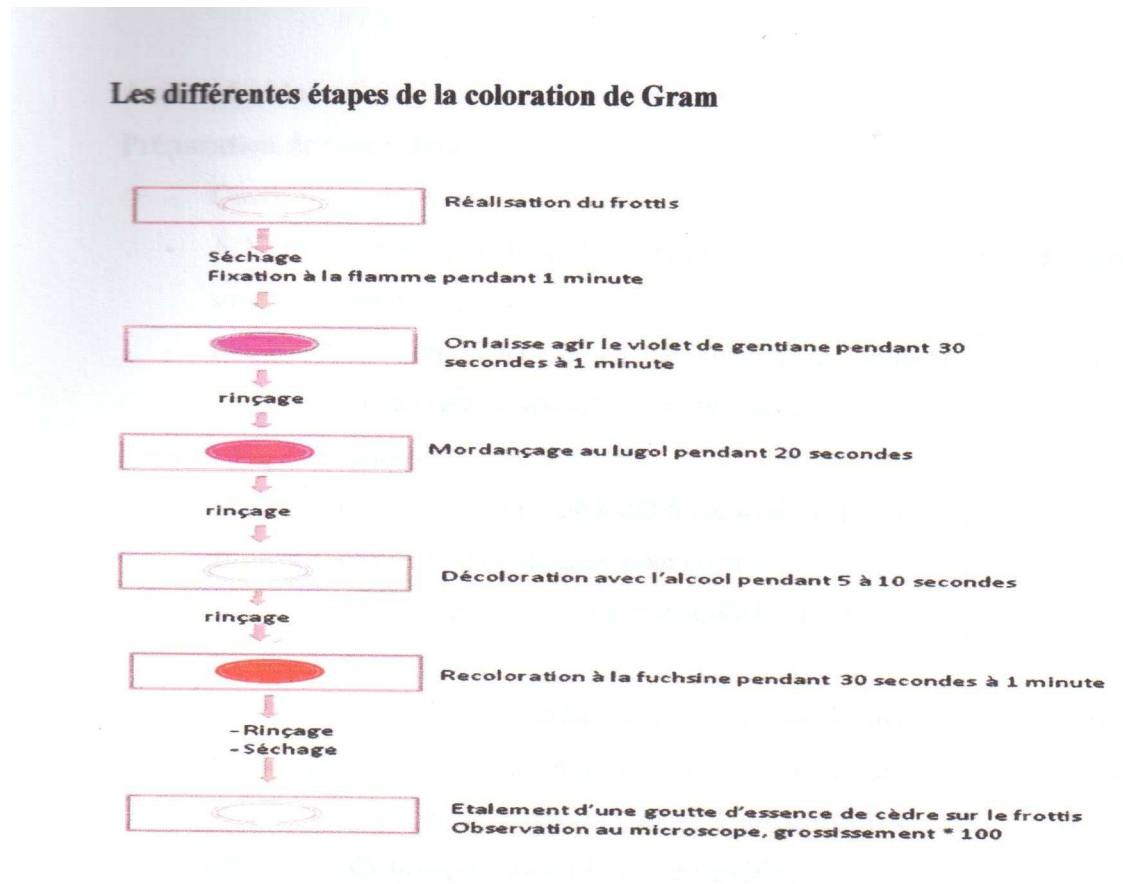


Congestion du foie



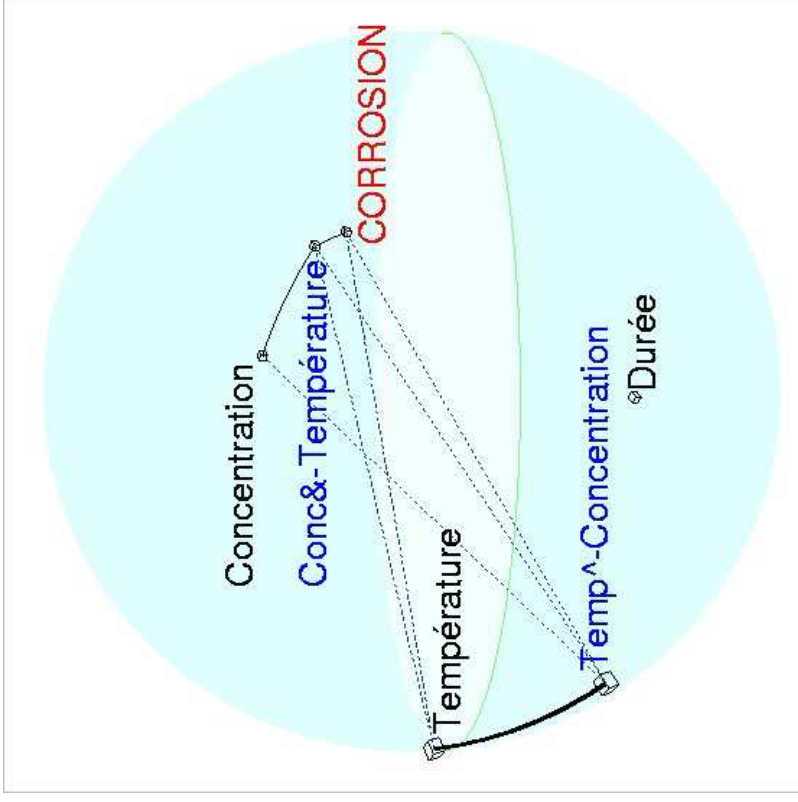
Congestion pulmonaire

ANNEXES 05 : LES DIFFERENTES ETAPES DE LA COLORATION DE GRAM



SOURCE : (71)

ANNEXE N°06 : Le logiciel CORICO : l'analyse globale des données



Un Outil d'analyse et de synthèse sans équivalent !

A partir d'un tableau de données (par exemple un tableur Excel) comportant des colonnes ("variables") et des lignes ("observations" de ces variables), CORICO détecte les **fausses bonnes corrélations** entre ces variables (celles qui sont dues à une tierce variable), et les **corrélations masquées** (lorsqu'une variable dépend simultanément de plusieurs autres variables) ; et il élabore le **schéma explicite** des seuls **liens** directs entre les variables qualitatives et quantitatives.

Quelques soient les dimensions du problème, la représentation sur une **sphère unique** (et non sur des plans multiples) assure la vue globale immédiate. La synthèse de l'**organisation** des relations (linéaires ou non), débarrassée des multiples redondances qui prêtent à confusion, apparaît en toute clarté. C'est un **garde-fou dans la prise de décision**.

Ci-contre: les traits pleins indiquent une corrélation **positive** "remarquable", les traits pointillés une corrélation **négative** "remarquable". Les symboles &, ^, sont des cas d' "interactions logiques". Par exemple : "Concentration&-Température" lié par un trait plein à la CORROSION signifie que l'occurrence simultanée d'une forte concentration et d'une faible température augmente la corrosion...

Aussi utile pour les petits tableaux que pour les grands !

Dès lors que vous avez plus de trois variables et plus de trois observations par variable, des problèmes de redondances et d'interaction peuvent masquer l'essentiel. CORICO révèle des relations qui vous étonneront par leur pertinence.

A l'opposé, en face d'un énorme tableau, la tentation est grande de n'en considérer qu'une partie. CORICO permet de tout appréhender, et d'en dégager l'essentiel, sans a priori.

Un gain de signification sans perte d'information !

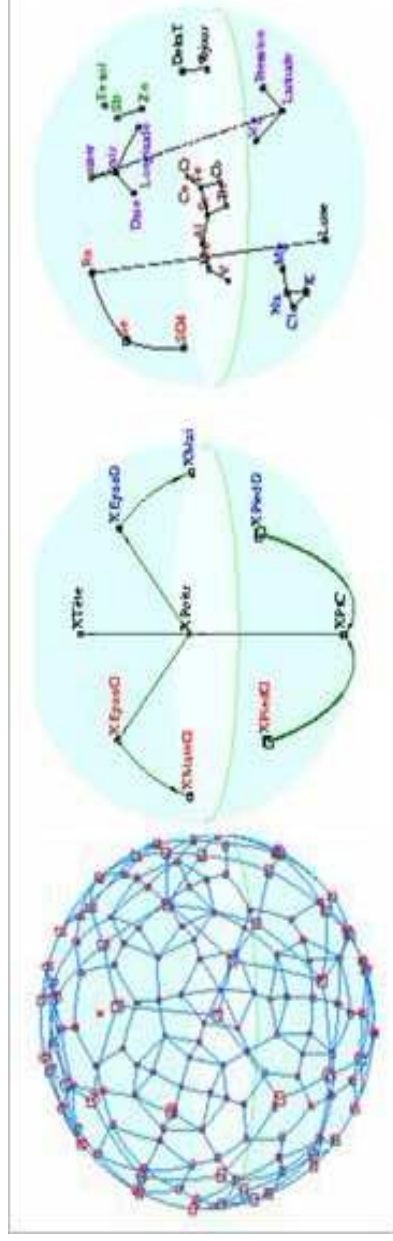
Submergé par l'information, on croit généralement que la statistique doit travailler sur des moyennes et "consentir à une perte d'information". Malheureusement, le gain de signification n'est pas garanti car la moyenne mélange tout, et entraîne souvent des erreurs de jugement. La nouveauté radicale de CORICO consiste à supprimer seulement l'information superflue (éliminer les facteurs de confusion), pour obtenir un gain de signification sans perte d'information.

Économiser des heures de manipulation de tableaux croisés dynamiques, éviter les fausses pistes, c'est s'épargner, parfois, des années de travaux sans issue.

L'exploration visuelle des données est rapide, intuitive et rigoureuse.

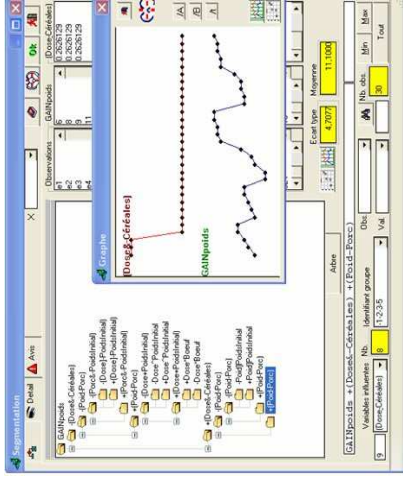
Un graphe unique, réellement multidimensionnel, remplace une multitude de graphes bidimensionnels. Il peut être agrémenté de couleurs et de commentaires, et ouvre pour vous des pistes nouvelles.

L'Interface est simple et efficace, facile à apprendre et à utiliser (2 jours de [formation](#)). Vous disposez d'aides contextuelles conviviales, d'une aide en ligne et d'exemples détaillés. Plus un assistant permanent en cas de trou de mémoire, sans parler des [tutoriaux](#).



Un outil décisionnel et de modélisation (régression) jamais vu ailleurs !

CORICO apporte une réponse unique et fiable au problème trop connu de la [sélection](#) des variables pertinentes (ou de fonctions non linéaires de ces variables), parmi des milliers de possibilités, même si le nombre d'observations est inférieur au nombre de variables. Il introduit des variables particulièrement significatives ([interactions logiques](#)) dans des modèles compacts et opérationnels, dont l'interprétation directe vous amène beaucoup d'information.



Un outil de classification et de segmentation innovant !

CORICO travaille aussi bien sur variables quantitatives que qualitatives; il tient compte des interactions. D'un simple clic, vous sélectionnez les divers groupes d'observations, dont les groupes extrêmes, et vous pouvez en extraire des règles opérationnelles.

Une économie d'expériences incroyable mais vraie !

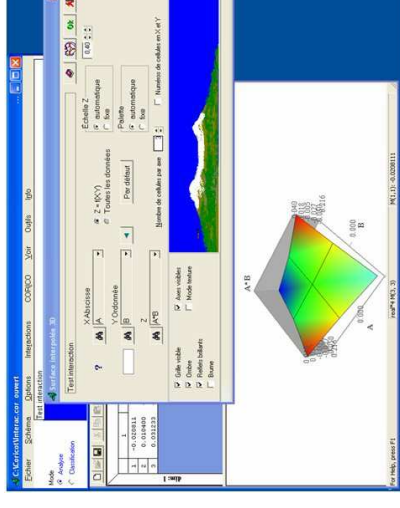
CORICO s'adapte à tous les problèmes concrets du Plan d'Expériences quand :

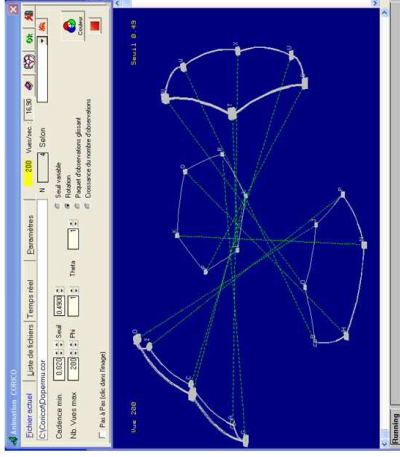
- il y a beaucoup de facteurs influents, contrôlés ou non;
- les facteurs contrôlés ne sont pas tous indépendants;
- il est risqué de postuler un modèle a priori ou de faire l'impasse sur certaines interactions;
- il est difficile, lors de la réalisation des essais, de respecter exactement les niveaux prévus;
- les résultats des premiers essais obligent à changer de stratégie;
- les essais sont coûteux.

L'Analyse Animée des Données ! Qu'est-ce que c'est ?

C'est l'analyse de la **variabilité de la variabilité**.

Un tableau de données et sa matrice de corrélations peuvent être vus comme un tout. Mais les corrélations peuvent évoluer au cours du temps, ou simplement évoluer entre deux groupes de lignes du tableau. Or le graphique de CORICO (sur la sphère) se prête bien à une représentation « mouvante » des liens entre les différents paramètres : il nous libère des problèmes de stabilité ou de validation des axes (puisqu'il n'y a pas d'axe).





Le mouvement attire l'attention sur des aspects essentiels, inaccessibles autrement. Ainsi, il est souvent plus facile d'interpréter une dizaine d'images à la seconde, qu'une seule image de votre tableau de données ; et quelquefois intéressant de découper même un petit tableau en une succession de vues.

Pourquoi **une** image animée plutôt que cent schémas ? Parce qu'il faut tout faire pour éviter les trahisons de la mémoire. Alors, sous l'apparence désordonnée, se dévoile un ordre intelligible : la "collecte des données brutes" se transforme en "perception des faits", dans leur cohérence concrète.

Une voie s'ouvre vers l'**analyse temps réel multivariée** et le **pilotage expérimental**. D'anciens tableaux de données prennent vie à l'écran. En quelques instants, vous tirez parti d'une importante quantité de données. Ce n'est plus tant la valeur des corrélations qui importe, que la manière dont leur structure d'ensemble se déforme ou évolue.

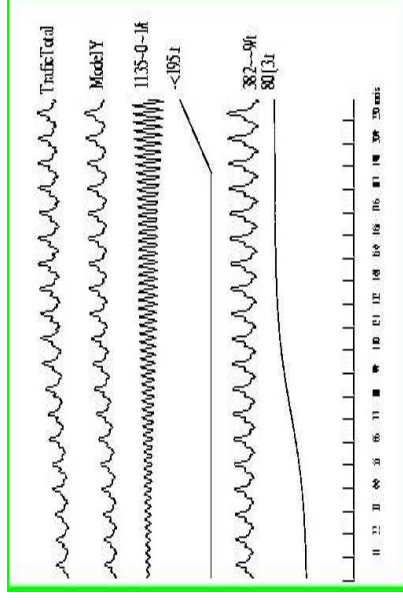
Quelques applications : **maîtrise des procédés** - tableaux multiples - tableaux évolutifs - suivi d'indicateurs - images hyperspectrales - séquences temporelles - analyse sensorielle - biologie évolutive - données industrielles, sportives, médicales, multiprotocole, tableaux de bords animés, etc.

Un outil de prédiction des séries temporelles sans pareil !

Nul besoin d'imposer une cadence régulière d'échantillonnage. Les diverses composantes apparaissent sur un graphique (saisonnalité, rupture de tendance, amortissement ou amplification, points atypiques...), et peuvent être interpolées ou extrapolées.

Et, en quelques clics, vous mettez en forme vos tableaux de données :

Pour filtrer, fusionner, réordonner, transposer, ventiler, agréger, échantillonner, scinder..., vous n'avez pas à recourir à un langage de programmation !



Annexe 07 : Extrait de carte routière (modifiée)

28

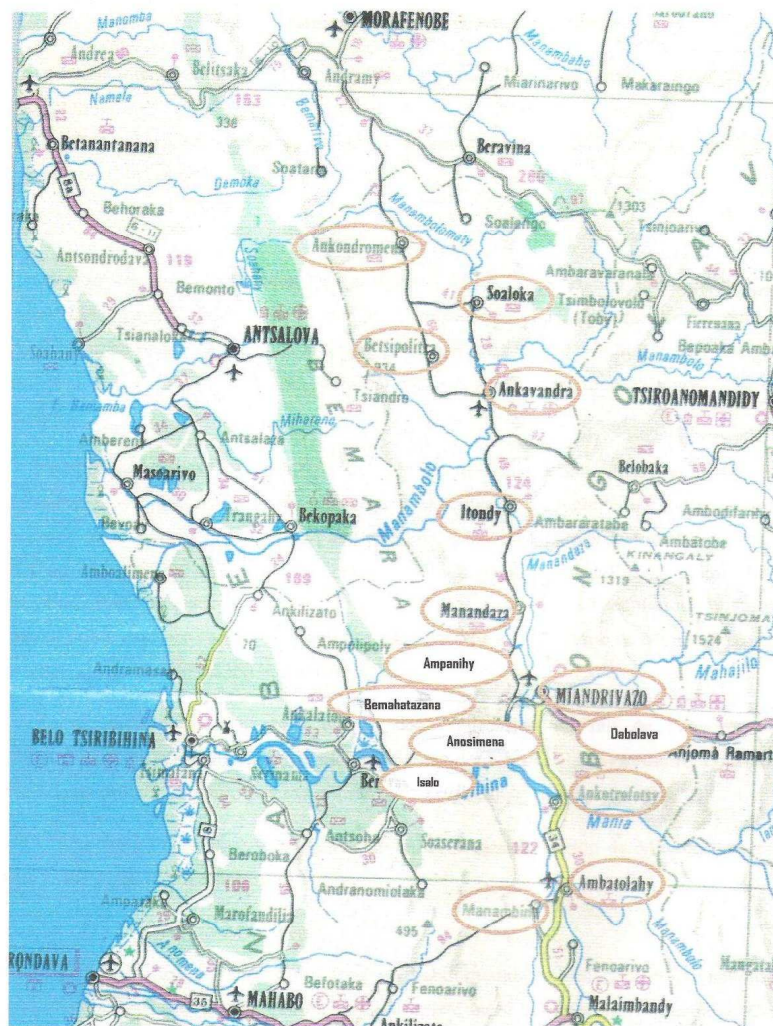


Figure 2: Extrait de carte routière (modifiée)

Source : Foibe Taotsaritanin'ny Madagasikara, 2005

Annexe 08 : circonscription de Miandrivazo

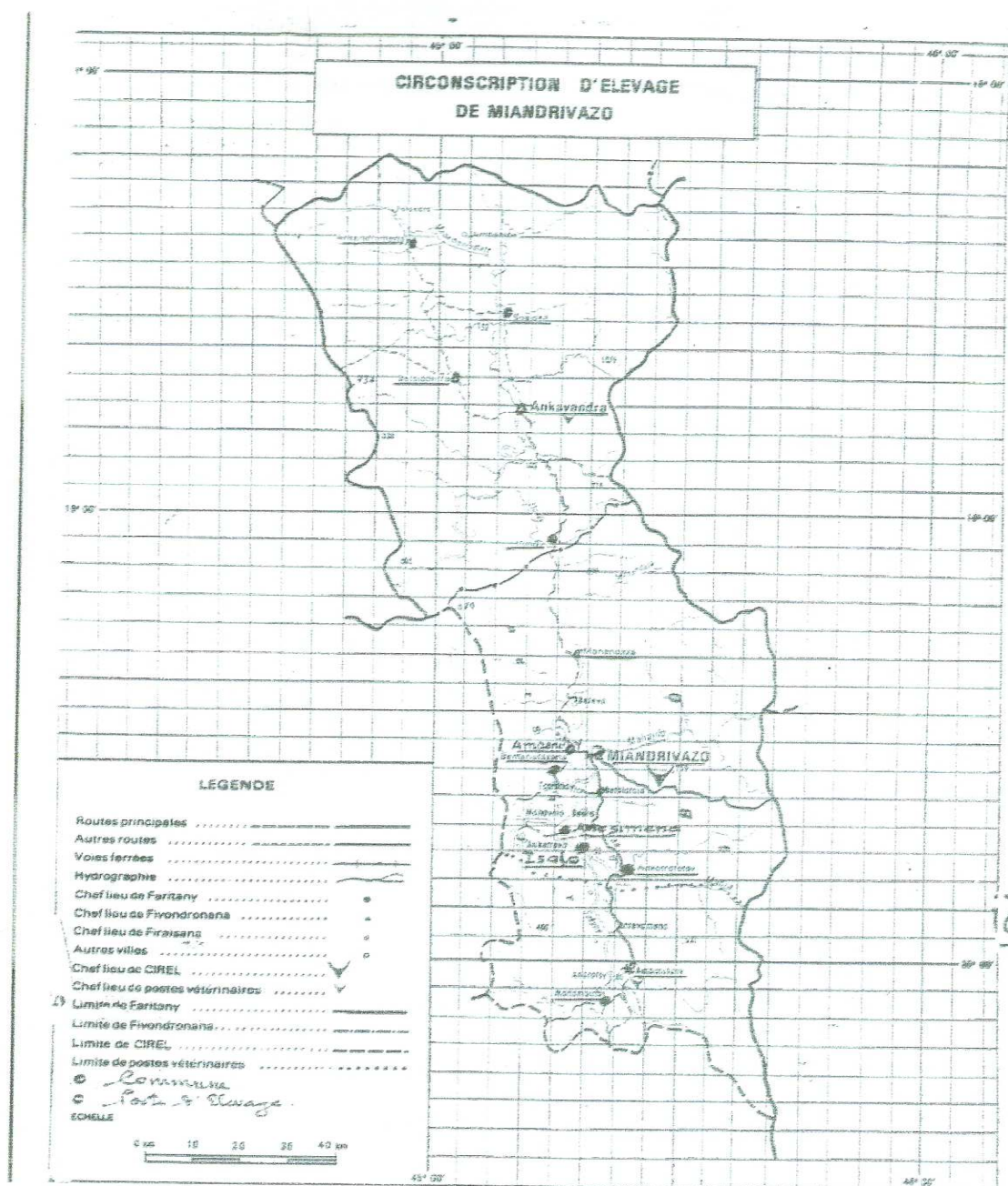


Figure 3: CIREL de Miandrivazo.

Annexe 09 : Limites du District

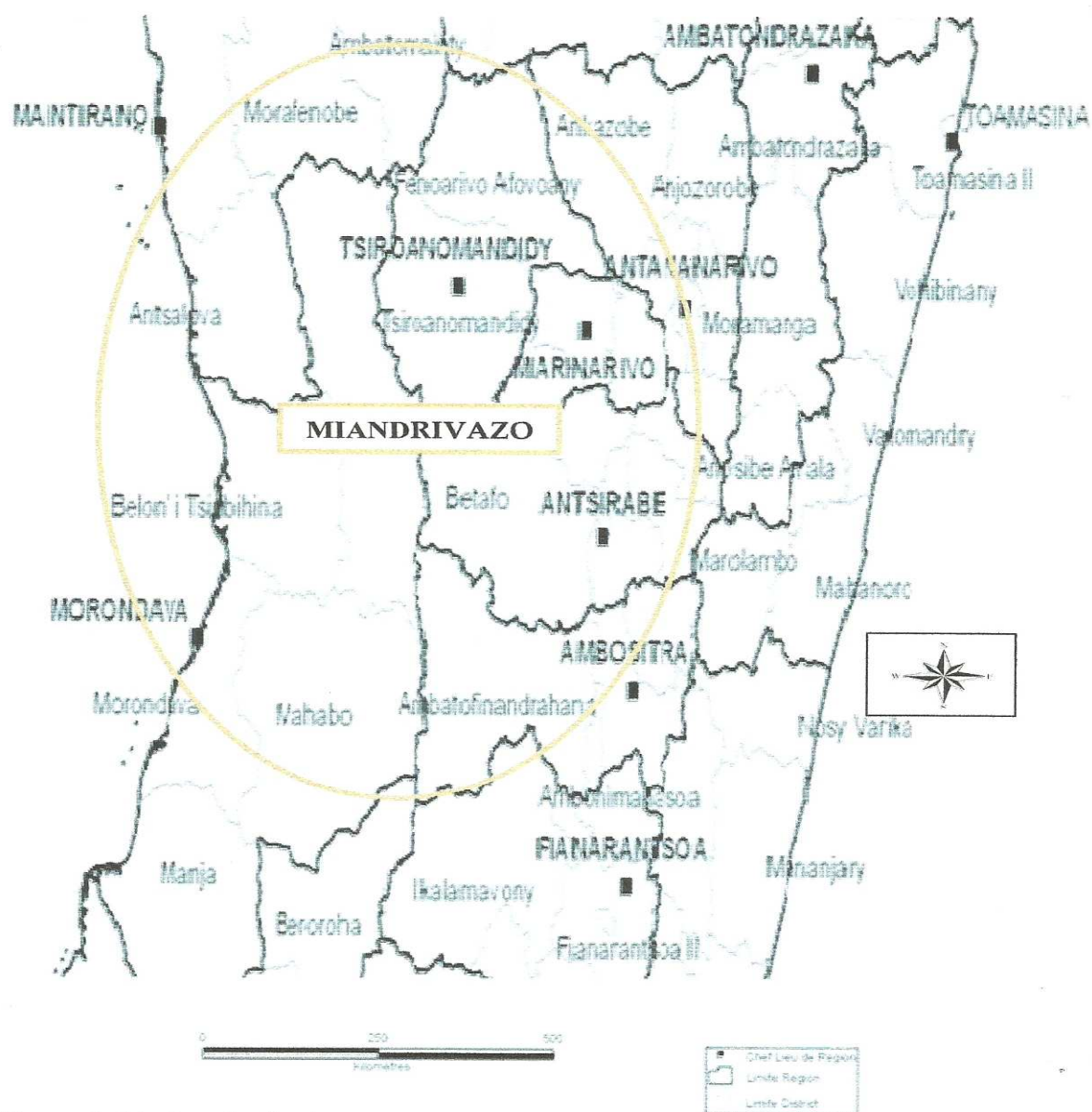


Figure 1: Limites du district

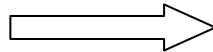
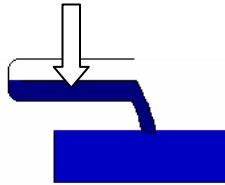
Annexe 10 : Détermination de la DL_{50}

Matériels

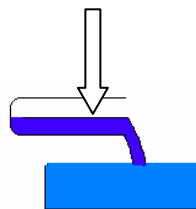
- Tubes à essais
- Eau physiologique à 0,85 p 1000
- $CaCl_2$ à 5%
- Pipettes graduées
- Agitateur magnétique

Méthode

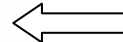
Solution mère (souche
d'épreuve E735 après
22h)



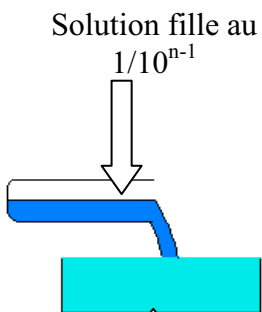
Solution fille au
 $1/10^{\text{ème}}$



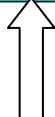
Eau
physiologi-
que 4,5ml



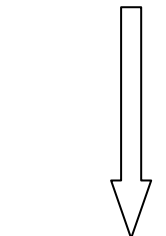
Solution fille au
 $1/10^{\text{ème}}$



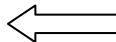
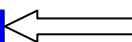
Solution fille au $1/10^n$



Solution fille au $1/100^{\text{ème}}$



Eau
physiologi-
que 4,5ml



FICHE D'ENQUETE

NOM enquêteur :

Date :

I. Traçabilité

Région :

District :

Fokontany :

Nom éleveur :

II. Race et stade physiologique des bovins

Races	Stades physiologiques							effectifs
Zébu	velle	Génisse	Taurillon	vache	veau	taureau	castré	
Holstein								
PPRN								
PR								
autres								

III. Box d'élevage

- Litière :

Cumulé :

1. OUI

☐

2. NON

☐

Durée d'accumulation en

année :

- Type de parc :

Fermé

☐

Non fermé



IV. Castration

1. Sanglante

2. Fermée

/...../...../

Période de
castration :.....
.....

Opérateur de la castration :

1. Dr vétérinaire

2. Technicien

/...../...../...../...../

3. Eleveur

4. Autres à préciser

V. Santé/ maladie

Déparasitage

OUI

NON

/...../...../

Si OUI ?

➤ Fréquence par an

1. Une fois

2. Deux fois

3. Trois fois

/...../...../...../

➤ DATE :

➤ Produit de déparasitage

1. Nématodicide
2. Douvicide
3. Ectoparasiticide
4. Autres

/...../...../...../...../

MALADIE

- Période remontant l'apparition de(s) maladie ayant survenu dans le troupeau (depuis JUIN 2010) :
- Date et mois si possible
- Date de la 1^{ère} apparition :
- Période de recrudescence
- Fréquence ou mode d'apparition : () cyclique () annuelle () saisonnière
- Catégorie et effectif des sujets atteints :

veau	velle	taureau	Vache	Taurillon	castré

➤ Signes ?

1. Fièvre
2. Boiteries
3. Inrumination
4. Mufle sec
5. Tournis
6. Salivation
7. Inappétence
8. Paralysie
9. Mort subite
10. Autres à préciser

/...../...../...../...../...../

/...../...../...../...../...../

NOMBRE DE MALADE ?

Nombre de mort ?

Y a-t-il un traitement administré ?

OUI

NON

/...../...../

SI OUI,

Immédiatement

Tardivement

/...../...../

1. DEUX JOURS
2. UNE SEMAINE
3. DEUX SEMAINE

/...../...../...../

A préciser

Qui le fait ?

A quelle fréquence ?

Comment évolue la maladie après le traitement ?

• Guérison :

1. OUI
2. NON

/...../...../

SI oui,

1. Quelques jours
2. Une semaine
3. Deux semaines
4. AUTRES

/...../...../...../...../

Mesure à prendre sur les animaux malades :

1. Isolement
2. Vendu vivant
3. Abattement
4. Autres à préciser

/...../...../...../...../

VI. Immunisation

Pratiquez-vous la vaccination anti-charbonneuses ?

1. OUI
2. NON

/...../...../

SI NON,

pourquoi ?.....

Faites-vous vacciner tous les troupeaux ?

1. OUI

2. NON

/...../...../

SI NON,

pourquoi ?.....

1. Effectif élevé de la population au sein du cheptel
2. Problème d'argent
3. Autres à préciser

/...../...../...../

Catégorie d'animaux touchés par la vaccination

	Veau	Velle	Taurillon	Vache	taureau
Vacciné					
Non vacciné					

Pour quelle raison faites-vous vacciner vos zébus ?

1. Obligation de l'état
2. Plaisir
3. Pour prévenir les maladies

/...../...../...../

Faites-vous déparasiter les animaux avant la campagne de vaccination ?

1. OUI
2. NON

/...../...../

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- 01 RIBOT J. J. et BLANCOU J. Le charbon bactérien et symptomatique à Madagascar. *Rév.Elev. Med. Vét. Pays trop.*1969 ; 104-11.
- 02 RASOLOMBOAHANGINJATOVO H. et RAFATRO H. Evaluation de la vaccination contre le charbon symptomatique. *Thèse Med.Vét.* 2009 ; 47-60.
- 03 BLANCOU J., RAZAFINDRAMANANA et RATOBY A.T. Etude d'un vaccin mixte contre le charbon bactérien et le charbon symptomatique. *Rév.Elev. Med. Vét. Pays trop.*, 1995 ; 27 : 183- 7.
- 04 BOSERET G., LINDEN A., MAINIL J. La maladie du charbon ou Anthrax. *Fac.Med.Vet .Liège*, 2003 ; 1-3.
- 05 FASANELLA A., GALANTE D., GAROFOLO G. et JONES M.H. Anthrax under valued zoonosis. *Vet. Microbiol.*, 2009 ; 10 : 1016.
- 06 AGENCE FRANÇAISE DE SECURITE DES ALIMENTS. *Bulletin Epidémiologique*, 2009 ; 32 : 1-7.
- 07 DAVIES D. G. Anthrax infection in bone meal from various countries of Origin. *Hyg.camb.*, 1972 ; 70: 455- 7.
- 08 YOUNG J.B. Epizootie of anthrax in falls country. *Texas. J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1971; 67: 842- 3.
- 09 FOX M.D., BOYCE J.M., KAUFMANN A F., YOUNG J.B. and WHITFORD H.W. An epizootiologic study of anthrax in falls country. *Texas. J am. Vet. Med. Assoc.*, 1977; 130: 327- 33.

- 10 LAMARQUE, HAESSLHER C. CHAMPION R., GRANGA D., BENDIMA S., STEIMET Z.P., GUELINA A et MAURICE Y. Le charbon au Tchad: Une Zoonose d'actualité. *Médecine tropicale*, 1989; 49: 245- 56.
- 11 RAYMOND A., SMEGO J.R., GEBRIAN B.D. and ESMANGELS G. Cutaneous manifestation of anthrax in Rural Haiti. *Clinical infectious disease*, 1998; 26 : 97-104.
- 12 ANDRE-FONTAINE G., ARTOIS M., AUGUSTIN J.C., BASTIAN S., BENET J.J., CERF O. et al. Les zoonoses infectieuses, 2001; 38-40.
- 13 SOLTYS M. Anthrax in a laboratory worker with observations on the possible Source of infection. *Path. Bact.*, 1948; 40: 253- 7.
- 14 JAMESON and GREEN. Anthrax and bone- meal fertiliser. *The Lancet*, 1955; 268: 60.
- 15 SELCHAR P.C., SINGH R.S., SRIDHAR M.S., BHASKAR C.J. and RAO Y.S. Outbreak of human anthrax in Ramadhadra-puram village of Chittoor district in Andhra, Pradesh. *Indian J. Med Res.*, 1990; 2: 448- 52.
- 16 PFIESTERER R.M. Diagnostic and Epidemiological aspect of a mostly forgotten disease. *Schweiz Med wochenschr*, 1991; 121: 813- 25.
- 17 LOKSHIMI and KUMAR. A study of human anthraxepidemy. *IndianPathol. Microbiol.*, 1992; 35: 1-4.
- 18 GEORGES S., MATHAI D., BALRA V., LALITHA M.K. and JOHN T.J. AnOutbreak of anthrax meningencephalitis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1994; 88: 206- 7

- 19 VASSAIRE. Le charbon bactérien: accident professionnel d'hier et toujours présent. Bull. Acad. Vét. de France, 1997 ; 70: 93-100.
- 20 OPARE C., NSIRE A., AWUMBILLA B., and AKANMORI B.D. Human behavioural factors implicated in outbreaks of human anthrax in the Tamale municipality of northern Ghana. Acta tropica, 2000; 76 : 49-52.
- 21 DEVOS V. The ecology of anthrax in Kruger national Park, South Africa. Salisbury Medical Bull. Special supplement. 1990; 68: 19-23.
- 22 LEPPLA; LALITHA et THOMAS, Bacterial toxins and virulence factors in disease. Handbook of natural toxins, New-York Marcel Dekker Inc. 1997; 8.
- 23 LOGAN. Bacillus anthracis species of medical and veterinary importance. Med. Microbiol., 1998; 2 : 157- 65.
- 24 FORSYTH G., LOGAN N.A. et DE VOS P. Revue taxonomique du genre Bacillus. Bull. Soc. Fr Microbiol., 1998; 114- 29.
- 25 TURNBULL P.C.B. Definitive identification of Bacillus anthracis: A review. Applied Microbiol., 199; 87: 237- 40.
- 26 XU and CÔTÉ J.C. Phylogenetic relationships between Bacillus species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences. Int. J. Syst. Evo. Microbiol., 2003 ; 53 : 695-704.
- 27 SIRARD C., GUIDI-RONTAN C., FOUET A. and MOCK. Characterization of a plasmid region involved in *Bacillus anthracis* toxin production and pathogenesis. Int. Med. Microbiol., 1996; 290: 313- 6.

- 28** LEPPLA. Anthrax toxins. In MOSS B., IGLEWSKI M., VAUGHAN and TU. Bacterial toxins and virulence factors in disease. Handbook of natural toxins, New-York: Marcel Dekker Inc., 1995; 8: 543 – 72.
- 29** ANGAYA M .et MOUNPORT D. Charbon bactérien animal au Tchad : épidémiologie, pouvoir pathogène et caractérisation des premières souches isolées, 2005; 8.
- 30** PATRA G., VAISSAIRE L, WEBER-LEVY M., LE DOUJET C. and MOCK M.Molecular characterization of Bacillus anthracis strains involved in outbreak of anthrax in France in 1997. Clinical Microbiology, 1998; 36: 3412- 4.
- 31** EUZEBY. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire, 1998.
- 32** SIRARD C., GUIDI-RONTANI C., FOUET A. and MOCK M.Characterization of a plasmid region involved in Bacillus anthracis toxin production and pathogenesis. Int. Med. Microbiol., 2000; 290: 313- 6.
- 33** FASANELLA, LOSITO S., TROTTA T., ADONE R., MASSA S. and CRUCHINI CHIOCCO O. Detection of vaccine virulence factors by polymerase chain reaction. Vaccine, 2001; 19: 4214- 8.
- 34** SHLYKHOV et RUBINSTEIN. Hypersensibilité retardée charbonneuse poste vaccinale et Etude chez les cobayes vaccinés contre le charbon. Médecine Tropicale, 1994 ; 54 : 33- 7.
- 35** RAMISSE, PATRA G., GARRIGUE H., GUESDON J.L. and MOCK M. Identification and characterization of Bacillus anthracis by multiplex analysis of Sequences on plasmides POXI and PX02 and chromosomal DNA FEM Microbiology letters, 1996; 145: 9-15.

- 36** ELHANANY E., BARAK R, FISHER M., KOBILER D. and ALTBOIJM Z. Detection of specific *Bacillus anthracis* spore biomarkers by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. *CHERIF*, 2000; 12: 2110- 6.
- 37** BORIN A, OUZARI H., BOUDABOUS A and DAFFONCHIO D. Characterization of repetitive element polymorphism polymerase chain reaction chromosomal marker that discriminates *Bacillus anthracis* from related species. *Journal of applied microbiology*, 2002; 93: 456- 62.
- 38** TURNBULL P.B. Anthrax vaccine, past, present and future vaccine, 1991; 2: 533-9.
- 39** MACKHEAK M.E. and CLAUS K.D. Response of hanters and guinea pigs to antigens of *Clostridium chauvoei*. *Amer.J.Vet.USA*, 1972; 33: 1053- 8.
- 40** BLOOD et HENDERSON. The blackleg and malignant oedema. *N Engl J. Vet. Med.*, 1971; 6: 247-8.
- 41** WILSON et RADOSTITS. Diseases associated with *Clostridium* species. In *Veterinary Medicine*, 10th edition Edinburgh : WB Saunders Elsevier, 2007 ; 821-46.
- 42** RANAIVOSON A.; le charbon symptomatique à Madagascar: contribution à l'étude épidémiologique, étiologique et prophylactique: thèse de Doctorat ès sciences biologiques Université Blaise Pascal, Clermont-ferrand II, 1991.
- 43** LIPPINCOT W. et WILKINS, Les Caractéristiques générales des entérobactériaceae ., 1994 :71-174.

- 44** SEIFERT et al, Immunoprophylaxis of clostridial infections in ruminants in Madagascar through intradermal application of ultra-filtred toxoids of locality specific clostridia. Dtschtieraerztwochenschr, 1983; 90: 274- 9.
- 45** RYFF J.F. and LEE A.M. Blackleg immunity. J Am Vet Med Assoc., 1947; 111:283-8.
- 46** VAISSAIRE M., MOCK C. LE DOUJET and LEVY M. Le charbon bactérien. Epidémiologie de la maladie en France, Méd.Mal.Infect., 2001 ; 31: 257- 71.
- 47** SHLYAKHOV E., BLANCOU J.et RUBINSTEIN E. Les vaccins contre la fièvre charbonneuse des animaux de Louis Pasteur à nos jours.Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 1996; 15: 853- 62.
- 48** PRAZMOWSKI A.Untersuchungüber die Entwicklungsgeschichte und FermentwirkungeinigerBakterien-Arten. Inaugural Dissertation, Hugo Voigt, Leipzig; 1880; 1-58.
- 49** SMITH, KEPPIE et STANLEY J. L. The chemical basis of the virulence of Bacillus anthracis. British journal of experimental pathology, 1955; 36: 460-72.
- 50** SEIFERT H.S.H., BOHNEL H. and RANAIVOSON A. Immunoprophylaxis of clostridial infections in ruminants in Madagascar through intradermal application of ultra-filtered toxoids of localityspecific clostridia, 1983; 90: 274-79.
- 51** HOPKINS J. Enquête épidémiologique sur le charbon symptomatique chez les ovins. In: MORICE P. et RAIMOND P. Comptes rendus du 4e Symposium sur les maladies ovines. Paris : Vigier, 1991 ; 894-897.

- 52 BLANCOU et RAJAONARISON J. Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux, 1972 ; 667- 9.
- 53 KERRY et BLANCOU J. A note on the occurrence of *C. chauvoei* in the spleens and livers of normal cattle. Vet. Rec., 1964; 76: 396.
- 54 MINIETH. Les incidences annuelles et saisonnières du charbon symptomatique dans divers pays., 1952 ; 5-6.
- 55 CONTINI A. *C. chauvoei*: microbiologic and antigenic characteristics of strains isolated by focuses of blackleg in Sardinia. Atti Soc. ital.Sci. vet., 1969; 23: 1007-10.
- 56 RAOUF S. and MOUSSA. Complexity of toxins from *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei*. J Bacteriol. 1958; 76: 538– 45.
- 57 KINDELE M.R. Findings in the brains of compressed air workers: Relationship to *Clostridium perfringens* is the most common cause of gas gangrene. Undersea Biomed Res., 1982 ; 9:75-80.
- 58 LECLAINCHE et VALLÉE H. Étude comparée du Vibron septique et de la bactérie du charbon symptomatique. Ann. Inst., Pasteur, 1900; 14: 590- 6.
- 59 CESARI et al. The production of the toxin by the culture and the use of blackleg antitoxin, 1915.
- 60 RADOSTITS, GAY, BLOOD and HINCHCLIFF. Le Charbon symptomatique. In: SAUNDERS W.B., Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses, 1999; 9: 15-26.
- 61 ROBSON and WILSON. Clostridial diseases in cattle. In: Primefact, Blackleg in cattle, 2007.

- 62** HELMAN. A textbook of the diseases of cattle. Société Française de Buiatrie, Paris, 1997; 307.
- 63** HARWOOD. The study of anaerobic spore-forming clostridia and their importance in medical and Indus, 2006; 62-9.
- 64** HATHEWAY. Toxigenic clostridia. Centers for Disease Control, Division of Bacterial Diseases, Atlanta, Georgia, 1990; 3033
- 65** BHAT P., MOHAM D.N. and LATITRA M.K. Cuitent incidence of anthrax in animals and man in India. Proceedings of the International workshop on anthrax, Winchester, England, 1989; 18-9.
- 66** ANDERSEN G.L., SIMCHOCK, J.M. and WILSON K.H. Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species. Journal of Bacteriology, 1996; 178: 377- 84.
- 67** SHLYKHOV E. et RUBINSTEIN E. Hypersensibilité retardée charbonneuse poste vaccinale : Etude chez les cobayes vaccinés contre le charbon. Médecine tropicale, 1994 ; 54: 33- 7.
- 68** ANDRIANASANDRATRA H. et RANAIVOSON A. Enquête sur l'état de l'élevage bovin dans les dix communes de Miandrivazo, 2008 ; 25-35.
- 69** MATTAR M.A., CORTINAS TI and STEFANINI A.M. Extracellular proteins of *Clostridium chauvoei* are protective in a mouse model. Acta Vet Hung, 2007; 55: 159-70.
- 70** RATOVONANAHARY H.M. Rapport de stage sur les vaccins produits par l'IMVAVET. Publication, communications scientifiques et rapport technique, coll. Int. Acad. Malg, 2011 ; 11-25.

- 71 PEZARD C., DUFLOT E. and MOCK M. Protective Immunity induced by *Bacillus anthracis* toxin-deficient Strain, 2005; 139: 2459-63.
- 72 FORSE BILL et al. Que faire sans vétérinaire. Cirad / CTA / Kathala, 2002 ; 154.
- 73 RANAIVOSON A. Notes sur les obstacles à la réussite de la prophylaxie des maladies telluriques à Madagascar. Actes de colloque sur l'amélioration de l'élevage en zone tropicale, cas de Madagascar. Acad. Malg., 1985 ; 9.
- 74 RANDRIAMANADRAITSIORY E. M. Les maladies charbonneuses des bovidés, particularités épidémiologiques, lutte, perspectives d'avenir. Thèse Doct.Vét. Toulouse ,1978 ; 148.
- 75 RANAIVOSON A. et RAJAONARISON J. J. Vaccins mixtes contre les charbons à Madagascar. Commun. Acad. Malg., 1984 ; 205- 10.
- 76 RAZAFINDRAKOTO D. Principales actions de prophylaxie réalisée à Madagascar. Bull. OIE, 1970 ; 74 : 709- 17.
- 77 RIBOT J.J., RAZAFINDRAKOTO D., BLANCOU J. et RAKOARIVELO J. Evolution et avenir des maladies microbiens chez les bovins à Madagascar pendant ces dernières années. Terres Malg., 1974 ; 16 : 217- 25.

VELIRANO

« Eto anatrehan' i ZANAHARY, eto anoloan'ireo mpikambana ao amin'ny Holafitra Nasionalin'ny Dokotera Veterinera Malagasy sy ireo Mpampianatra ahy, mianiana aho fa hitandro lalandava ary hatraiza hatraiza ny haja amam-boninahitry ny Dokotera Veterinera sy ny asa. Noho izanydia manome toky ary mianiana aho fa:

-Hanatanteraka ny asako eo ambany fifehezan'ny fitsipika misy ary hanaja hatrany ny rariny sy ny hitsiny;

-Tsy hivadi-belirano amin'ny lalàn'ny voninahitra, ny fahamendrehana, ny fanajana ny rariny sy ny fitsipi-pitondran-tena eo am-panatanterahana ny asa maha-Dokotera Veterinera. Hanaja ireo nampianatra ahy, ny fitsipiky ny hai-kanto. Hampiseho ny sitraka sy fankatelemana amin'izy ireo ka tsy hivaona amin'ny soa nampianarin'izy ireo ahy;

-Hanaja ny ain'ny biby, hijoro ho toa ny andry hiankinan'ny fiarovana ny fahasalaman'izy ireo sy ho fanatsarana ny fiainany ary hikatsaka ny fivoaran'ny fahasalaman'ny olombelona sy ny toe-piainany;

-Hitazona ho ahy samirery ny tsiambaratelon'ny asako;

-Hiasa ho an'ny fiarovana ny tontolo iainana sy hiezaka ho an'ny fisian'ny fiainana mirindra ho an'ny zavamanan'aina rehetra ary hikatsaka ny fanatanterahana ny fisian'ny rehetra ilaina eo amin'ny fiaraha-monina tsy misy raoraon'ny olombelona sy ny biby;

-Hiezaka ahafehy ireo fahalalana vaovao sy hai-tao momba ny fitsaboana biby ary hampita izany ho an'ny hafa ao anatin'ny fitandroana ny fifanakalozana amin'ny hairaha mifandray amin'izany mba hitondra fivoarana ho azy.

Na oviana na oviana aho tsy hanaiky hampiasa ny fahalalako sy ny toerana misy ahy hitondra ho any amin'ny fahalovana sy hitarika fihetsika tsy mendrika.

Ho toavin'ny mpiara-belona amiko anie aho raha mahatanteraka ny velirano nataoko.

Ho rakotry ny henatra sy horabirabian'ireo mpiray asa amiko kosa aho raha mivadika amin'izany. »

UNIVERSITE D'ANTANANARIVO
FACULTE DE MEDECINE
DEPARTEMENT D'ENSEIGNEMENT
DES SCIENCES ET DE MEDECINE
VETERINAIRES

PERMIS D'IMPRIMER

LU ET APPROUVE

Signé, Le président de la thèse

Professeur RASAMINDRAKOTROKA Andry

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Le Doyen de la Faculté de Médecine,

Professeur ANDRIAMANARIVO Mamy

Lalatina

UNIVERSITE D'ANTANANARIVO
FACULTE DE MEDECINE
DEPARTEMENT D'ENSEIGNEMENT DES SCIENCES
ET DE MEDECINE VETERINAIRES

**DEMANDE D'AUTORISATION POUR SOUTENIR LA THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU
GRADE DE DOCTEUR EN MEDECINE VETERINAIRE, DIPLOME D'ETAT**

POSTULANT(E) :

TITRE DE LA THESE :

JURY :

- Président :
- Juges :

SOUTENANCE DE THESE PREVUE (15 JOURS DE LECTURE MINIMUM)

LeAHeures

A

ACCUSE DE RECEPTION DE LEUR EXEMPLAIRE DE THESE PAR LES MEMBRES DU JURY

Membres du Jury

Date de réception de la thèse

Signature

Président : Professeur RASAMINDRAKOTROKA Andry

Juges : Professeur RANDRIANAFISAMINDRAKOTROKA Nantenaina Soa

Professeur RAKOTOZANDRINDRAINNY Raphaël

Rapporteur : RANAIVOSON Andrianasolo

Le Président de thèse

Le (la) Postulant(e)

Name and Surname: TAJDIN Onjananahary Moëz Sylvio

**Title of thesis: EVALUATION OF THE QUALITY OF LAND BICHAR ®
VACCINE**

Heading: IMMUNOLOGY

Number of pages: 61

Number of tables: 14

Number of figures: 04

Number of appendix: 11

Number of references: 77

SUMMARY

Anthrax and blackleg disease persists despite the mandatory nature of the vaccination. Studies were carried out to try to find an explanation of this persistence, for our part, we choose to engaged in monitory quality of bivalent BICHAR®. The field study was conducted in six municipalities in the district of Miandrivazo while all laboratory was done at IMVAVET. This study was conducted from May 23, 2011 until June 2013. She opened a potential impact of certain environmental risk factors that may affect the effectiveness of annual vaccination. For this study, the vaccine samples were deposited on land to the exact conditions of use, and then, were redirected sequentially in the laboratory quality control for testing responsiveness. The result indicate that the title of bacillus anthracis spores after 240 days on average is $1,356 \times 10^7/\text{ml}$, keeping the standard of vaccination, In addition, any contamination due to handling were not screened. The test event for the symptomatic coal shows that the vaccine protects 98, 5% after 90 days stay at the temperature ranging from 15 to 35° C. However, certain precautions should not be taken into account to optimize the effectiveness of the vaccine, the coverage rate of this vaccine, the immune status of calves less than 4 months, the security and insurance of farmer and finally the whole herd vaccination.

Keywords: anthrax, blackleg-Bichar-vaccine effectiveness

Director of thesis: Professor RASAMINDRAKOTROKA Andry

Rapporteur of thesis: Doctor RANAIVOSON Andrianasolo

Author's address: Lot II A 104K Nanisana Tana 101

Nom et Prénoms : TAJDIN Onjananahary Moëz Sylvio
Titre de la Thèse : EVALUATION SUR TERRAIN DE LA QUALITE DU
VACCIN BICHAR®

Rubrique : IMMUNOLOGIE

Nombre de pages : 61 **Nombre de tableaux :** 14 **Nombre de figures :** 04
Nombre d'annexes : 11 **Nombre de références bibliographiques :** 77

RESUME

Les maladies charbonneuses bovines persistent encore malgré le caractère obligatoire de la vaccination. Des études ont été alors réalisées pour tenter de trouver une explication à cette persistance. Pour notre part, nous choisissons d'entreprendre un suivi de qualité du vaccin bivalent BICHAR®. L'étude sur terrain a été effectuée dans les six communes du District de Miandrivazo tandis que tout le travail de laboratoire a été fait à l'IMVAVET. Cette étude a été réalisée du 23 Mai 2011 jusqu'au mois de Juin 2013. Elle a ouvert un possible impact potentiel de certains facteurs de risques environnementaux pouvant affecter l'efficacité de la vaccination annuelle. Pour l'étude, des échantillons de vaccin ont été déposés sur terrain selon les conditions exactes de l'utilisation pour les utilisateurs ; puis ont été réacheminés séquentiellement au Laboratoire de Contrôle Qualité pour les tests de réactivité. Les résultats obtenus indiquent que le titre de spores de *Bacillus anthracis* après 240 jours sur terrain est en moyenne $1,356 \times 10^7/\text{ml}$ gardant la norme du titre vaccinal. De plus, les contaminations éventuelles dues à la manipulation n'ont pas été dépistées. Le test d'épreuve pour le charbon symptomatique montre que le vaccin protège à 98,5% après séjour de 90 jours à une température variant de 15 à 35°C. Cependant, certaines précautions devraient être prises en compte pour optimiser l'efficacité du vaccin : le taux de couverture vaccinale, le statut immunitaire des veaux inférieur à 4 mois, la sécurité et l'assurance des éleveurs et enfin la vaccination en totalité des troupeaux.

Mots clés : Anthrax-charbon symptomatique- BICHAR- vaccin-efficacité

Directeur de thèse : Professeur RASAMINDRAKOTROKA Andry

Rapporteur : Docteur RANAIVOSON Andrianasolo

Adresse : Lot II A 104 K Nanisana