

Isolement de *Clostridium septicum* à l'occasion d'une épizootie de charbon symptomatique à Madagascar

J.J. Rajaonarison¹ R. Andriamihamina¹
Fatou-Rakotobe² V. Rafaliarisoa¹
E. Randrianasolo¹ R.C.Y. Maharavo³

Mots-clés

Bovin – Charbon symptomatique –
Clostridium septicum –
Chromatographie en phase gazeuse –
Vaccin – Épidémiologie – Madagascar.

Résumé

Des foyers de charbon symptomatique ont fait leur apparition dans différentes localités de la région de Vakinankaratra (Madagascar) au cours des années 1996 et 1997 et ont causé la mort de 588 bovins en l'espace de sept mois. Même les animaux qui avaient été vaccinés entre avril et août 1996 n'ont pas été épargnés. Les analyses bactériologiques entreprises sur les prélèvements reçus ont permis de mettre en évidence en mars 1997 un autre agent du charbon symptomatique, *Clostridium septicum*, dont l'existence n'avait pas auparavant été rapportée dans le pays. Le diagnostic a été confirmé en mai par l'Institut pour la biotechnologie appliquée aux pays tropicaux de Goettingen (Allemagne) au moyen de la technique de la chromatographie en phase gazeuse. Un antigène vaccinal expérimental a été élaboré à partir du germe pour combler la valence manquante dans le produit conventionnel. L'isolement de cette bactérie survient 28 ans après les premières flambées de charbon symptomatique dues à *Clostridium chauvoei*. Son origine est discutée brièvement par les auteurs.

■ INTRODUCTION

Les premiers cas de charbon symptomatique à Madagascar sont apparus dans le Sud en juillet 1969 dans le canton d'Isoanala, sous-préfecture de Betroka (3). Sur un cheptel bovin comportant 22 000 têtes, 6 585 cas de mortalité (29,9 p. 100) ont été rapportés dans le secteur en l'espace de deux mois. Les déplacements des troupeaux, la consommation de viande d'animaux morts par les habitants et le non-respect des mesures de prophylaxie sanitaire avaient vite favorisé l'extension de l'épizootie.

La bactérie responsable ayant été identifiée comme étant *Clostridium chauvoei*, un vaccin à base d'anaculture fut développé localement et utilisé la même année pour enrayer la progression de la nouvelle infection. Devenu bivalent à partir de 1971 (*C. chauvoei* + spores de *Bacillus anthracis*) (1), il est produit dans un système de fermenteur, semi-purifié depuis 1979 (8, 9) et amélioré sur le plan de la performance de production et de la durée de conservation en 1989 (4). Ce vaccin dénommé Bichar[®] et sa variante trivalente Bicharcoli[®] (anti-charbons et anti-colibacillose) ont fait leurs preuves dans les campagnes annuelles nationales d'immunisation contre les maladies telluriques, jusqu'au milieu de 1996, malgré la chute brutale du taux de couverture, consécutive à la mise en application en 1994 de la vaccination payante, passant de 65 p. 100 en 1993 à 36 p. 100 en 1996.

A partir de septembre 1996, des foyers de charbon symptomatique ont été signalés dans la région du Vakinankaratra, située sur la partie centrale des hautes terres. La circonscription de l'Elevage

1. Institut malgache des vaccins vétérinaires (Imvavet), ministère de la Recherche scientifique, BP 4, Antananarivo 101, Madagascar

2. Faculté des sciences de l'université d'Antananarivo, ministère de L'Enseignement supérieur, Madagascar

3. Direction des Services vétérinaires, ministère de l'Elevage, BP 530, Antananarivo 101, Madagascar

(Cirel) d'Antsirabe déborde sur le Moyen-Ouest, côté Mandoto, agglomération située à environ 190 km de la côte. Ces foyers ont entraîné la perte de 588 bovins sur un cheptel estimé à 220 000 têtes (taux de mortalité de 0,27 p. 100) en sept mois. Même les animaux immunisés entre avril et août 1996 (taux de couverture avoisinant les 57 p. 100) n'ont pas été épargnés. Des recherches bactériologiques ont été entreprises pour déterminer l'agent causal.

■ MATERIEL ET METHODES

Les matières virulentes ont été constituées par des prélèvements de muscles et de foies de bovins morts envoyés sous glace et par voie terrestre par la Cirel d'Antsirabe. Deux séries de mise en culture parallèle ont été effectuées pour chaque inoculum : l'une en aérobie dans la gélose profonde viande-foie, gélose-mobilité et sur gélose au sang en boîte de Petri ; l'autre dans les conditions d'anaérobiose (étuve à vide Heraeus, dessiccateur) dans la gélose viande-foie, dans les milieux Rcm (*reinforced clostridial medium*) liquide et solide. L'isolement s'est déroulé à 37 °C pendant 24 à 48 h.

Pour les tests de présomption relatifs aux clostridies, le caractère sulfito-réducteur a été recherché sur milieu Drcm (*differential reinforced clostridial medium*), l'hémolyse sur gélose au sang, le pouvoir pathogène sur cobayes par inoculation en intramusculaire de 0,5 ml d'une culture jeune en bouillon viande-foie additionnée de 0,5 ml de chlorure de calcium à 3 p. 100. La méthode de coloration au vert malachite a permis de mettre en évidence la présence de spores dans les cultures âgées.

Le test d'immunité croisée avec *C. chauvoei* a été exécuté sur deux lots de cobayes inoculés depuis trois semaines avec 1 ml du Bichar® et éprouvés quinze jours après l'injection de rappel contre dix doses létales à 50 p. 100 (DL 50) respectivement de la souche homologe 735 et de la bactérie étudiée.

L'identification complète a été réalisée par l'Institut de biotechnologie appliquée (Ibt) pour les pays tropicaux de Göttingen, en Allemagne (Prof. H. Böhnelt). Elle a été basée, en plus des méthodes classiques, sur l'étude des produits du métabolisme bactérien (alcools et acides gras volatils) par la technique de la chromatographie en phase gazeuse (Cpg) ou chromatographie gaz-liquide. Quatre lots d'échantillons (n° 98, 497, 122, 500) comportant au total onze isolats différents dont neuf issus du laboratoire de diagnostic du Fofifa (Centre national de la recherche appliquée au développement rural) ont été préparés pour y être analysés. Leur envoi a consisté en des disques de papier filtre stériles, imbibés de culture bactérienne, montés sur une aiguille perforant le bouchon et enfermés dans des petits tubes en polypropylène (8), le tout convenablement emballé dans une boîte en carton.

■ RESULTATS

Sur les deux souches de bactéries (98 Imv et 497 Imv) isolées dans notre Institut, la 98 Imv a montré les principaux caractères communs aux anaérobies strictes de la flore tellurique : bacilles à Gram positif, absence de cultures dans les boîtes de Petri ensemencées en surface et laissées en atmosphère normale, pousse uniquement dans la zone profonde de la gélose en culot, possession de spores.

La bactérie 98 Imv, isolée à partir du prélèvement de foie reçu le 3 mars 1997, s'est présentée sous forme de bâtonnets mobiles, gazogènes. En gélose profonde, les colonies ont été ouatées, floconneuses, arborescentes. Les spores ont occupé une position centrale ou subterminale et la sporulation a été lente et pauvre en milieu Rcm. L'injection au cobaye a produit une myosite hémorragique identique à celle provoquée par *C. chauvoei*, entraînant la

mort en moins de 20 heures. Sur les calques colorés de foies d'animaux inoculés, les éléments bactériens étaient disposés en chaînettes, formant parfois des filaments très longs. La souche a donné de l'hémolyse sur gélose au sang et a produit du H₂S sur Drcm.

Le test d'immunité croisée s'est traduit par la mort des cobayes éprouvés avec la souche hétérologue et la survie de ceux ayant reçu la souche homologe. Tous les témoins ont succombé, montrant ainsi l'absence de parenté antigénique entre le germe étudié et le bacille de Chauveau.

Ces quelques caractères évocateurs ont permis d'émettre une forte présomption en faveur de *Clostridium septicum*. La confirmation a été apportée par l'Institut de Göttingen en mai 1997.

■ DISCUSSION

Les résultats de ces investigations bactériologiques et immunologiques concordent bien avec les réalités du terrain, c'est-à-dire l'émergence de nouveaux foyers de charbon symptomatique face auxquels l'actuel Bichar® s'est révélé inefficace. Par ailleurs, l'évolution de la maladie, les signes cliniques et lésionnels décrits par le responsable de la santé animale de la Cirel d'Antsirabe ont été presque les mêmes que ceux constatés en 1969 dans le Sud. Ont été observés, notamment, la prédominance de la forme suraiguë (75 p. 100 des cas) tuant les bovins au bout de 1 à 8 heures, la mortalité survenant 1 à 5 jours plus tard dans la forme aiguë, la fréquence du météorisme, la présence de tumeurs crépitanes ou non, la parésie ou la boiterie des membres concernés, quelques cas d'excitation et de diarrhées, la dégénérescence rénale et la lésion exsudative des masses musculaires atteintes devenant noirâtres et cuites. Les manifestations cliniques se sont présentées de façon isolée ou parfois associée. En outre, comme dans la plupart des clostridioses animales, l'infection a affecté plus particulièrement les jeunes de moins de trois ans et les adultes présentant de l'embonpoint, les bœufs castrés et les vaches. La souche bactérienne 98 Imv provenait d'ailleurs d'une génisse Pie rouge norvégienne de 17 mois d'âge d'une ferme laitière périurbaine d'Antsirabe (ferme Fafitsara), morte subitement le 21 février 1997. Confortés dans leurs critères de présomption, les auteurs ont lancé la mise au point d'un antigène vaccinal à partir du germe récemment isolé avant confirmation de son identification en Allemagne.

Clostridium septicum mis à part, les travaux menés à Göttingen sur les 11 isolats n'ont pas révélé la présence d'autres agents du charbon symptomatique chez les bovins, comme, par exemple, *C. chauvoei*, le plus fréquent, ou *C. perfringens*, plus occasionnel. Seules deux anaérobies peu ou non pathogènes pour le cobaye et la souris (*C. bifementans*, *C. ramosum*) ont été rapportées.

A ce propos, il convient de signaler que le dosage par Cpg des acides gras volatils excrétés par les germes anaérobies dans le milieu de culture pendant leur croissance s'avère une méthode rapide et fiable (7, 8, 10, 12) pour leur identification. Mené dans des conditions de culture standardisées, il constitue un outil de diagnostic utile, complémentaire aux tests conventionnels reposant sur l'étude des caractères morphologiques, culturels, biochimiques, pathogènes et immunologiques. La technique a été plus tard étendue aux alcools et acides gras des membranes cellulaires (7, 10). La comparaison par analyse biométrique des profils chromatographiques obtenus avec les données disponibles à partir des spécimens de référence permet ainsi d'élargir considérablement l'éventail des critères de différenciation des espèces et des souches de toutes les bactéries, quel que soit leur type respiratoire.

Quant à l'origine de la bactérie 98 Imv, bacille mobile, les analyses par chromatographie en phase gazeuse ont montré qu'elle

n'avait pas de relation avec les souches malgaches de *Clostridium* de référence 735, 335, 217, ni avec les souches de collection de l'Ibt (commun. pers., H. Böhnel). Auparavant, Seifert et coll. (8), à l'issue de dix années d'études épidémiologiques (1976-1986) sur les maladies telluriques à Madagascar, ont trouvé que toutes les clostridies malgaches qu'ils avaient isolées étaient immobiles et dotées d'un pouvoir toxigène élevé. Certaines d'entre elles sont proches de *C. chauvoei* ; d'autres, en revanche, forment un groupe à part du fait de leurs caractéristiques métaboliques. Sans vouloir minimiser les diverses considérations plausibles, entre autres celles d'ordre génétique, il est possible que *C. septicum*, nouveau venu dans la pathologie vétérinaire locale, ait été introduit à la suite de la migration des rapaces. Blancou et coll. (2), en 1972, ont en effet montré que des germes pathogènes étaient capables de persister dans le tractus digestif de ces oiseaux, 3 à 5 jours après un repas infectant. Ce délai, selon ces auteurs, est théoriquement suffisant à une espèce migratrice pour transmettre une maladie infectieuse dont le foyer est situé à plus de 2 500 km de distance, par exemple de l'Afrique vers Madagascar.

Enfin, le charbon symptomatique et l'œdème malin chez les bovins sont la conséquence de l'activation des spores de certaines espèces pathogènes et toxigènes de *Clostridium* restées quiescentes dans la rate, le foie, les muscles. Elles peuvent agir seules ou en association entre elles. La distinction des types de myosite gangreneuse qui en résultent n'étant pas aisée, les auteurs ont préféré utiliser uniquement la terminologie habituelle de « charbon symptomatique ». Afin que des mesures prophylactiques au moins puissent être prises, il est important que les vétérinaires praticiens et les techniciens sachent que désormais de pareilles myosites chez les bovins ne sont plus l'apanage du bacille de Chauveau dans le pays.

■ CONCLUSION

La récente épidémie de charbon symptomatique causée par *Clostridium septicum* soulève la notion importante de surveillance épidémiologique des dominantes pathologiques sévissant à Madagascar et, son corollaire, l'obligation d'envoi de prélèvements appropriés au Laboratoire pour déterminer la nature exacte des agents responsables. Par ailleurs, les éclaircissements apportés ont permis d'éviter les interprétations diverses lorsqu'une vaccination se révélait inefficace.

L'antigène vaccinal dont la préparation a débuté en avril devait être associé, après une série de travaux complémentaires et les tests d'usage, au vaccin correspondant déjà existant. Au cours de ces investigations, l'association de *Clostridium septicum* en particulier avec le bacille de Chauveau n'a pas été mise en évidence. Comme les premières flambées de charbon symptomatique à *C. chauvoei* apparues en 1969 dans le Sud, celles observées dans le Vakinankaratra en 1996 illustrent vraisemblablement le rôle épidémiologique prépondérant des oiseaux migrateurs dans la transmission à distance des maladies infectieuses.

Remerciements

Les auteurs remercient vivement la Directrice du service d'Administration des projets Gtz (Office de coopération allemand) d'avoir donné un avis favorable à la demande du Responsable de l'Imvavet pour l'envoi des souches bactériennes et la prise en charge de leurs frais d'identification au Laboratoire de Göttingen. Leur gratitude va également au Professeur H. Böhnel (Institut pour la biotechnologie appliquée en régions tropicales de Göttingen, Allemagne) pour la confirmation de leur résultat et pour ses commentaires personnels.

BIBLIOGRAPHIE

1. BLANCOU J., 1974. Etude d'un vaccin mixte contre le charbon bactérien et le charbon symptomatique. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **27** : 183-187.
2. BLANCOU J., RAJAONARISON J., 1972. Note sur le rôle vecteur des rapaces dans la propagation de certaines maladies bactériennes. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **25** : 187-189.
3. BLANCOU J., RAKOTOARIVELO J., SERRES H., 1971. Note sur les premiers cas de charbon symptomatique à Madagascar. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **24** : 19-21.
4. FATOU-RAKOTOBE, RAJAONARISON J.J., ANDRIAMIHAMINA R., RANDRIANASOLO E., RAFALIARISOA V., 1990. Progrès technologiques réalisés de 1987 à 1989 dans la production des vaccins bactériens. Antananarivo, Madagascar, Fofifa/Cenraderu, p. 103-115. (Archives du Fofifa n° 6)
5. HENTON M.M., 1998. Blackquarter and malignant oedema, a retrospective study. In: Proc. ARC-Onderstepoort OIE int. Congress with WHO cosponsorship on Anthrax, Brucellosis, CBPP, Clostridial and Mycobacterial Diseases, Berg-en-Dal, Kruger National Park, South Africa, 9-15 August 1998, p. 300-301.
6. KATITCH R., DJOUKITCH B., VOUKITCH EVITCH Z., 1963. Résultats de recherche sur la pathogénie du charbon symptomatique causé par *C. chauvoei*. *Rec. Méd. vét.*, **139** : 546-559.
7. LAWRENCE D., HEITEFUSS S., SEIFERT H.S.H., 1991. Differentiation of *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* by gas chromatographic whole-cell fatty acid analysis. *J. clin. Microbiol.*, **29**: 1508-1512.
8. SEIFERT H.S.H., BOHNEL H., DEPPING A., GIERCKE-SYGUSCH S., HEINE A., RANAIVOSON A., ROTH F., SUKOP U., 1988. Etiology and incidence of soil-borne diseases in Madagascar. *Anim. Res. Dev.*, **27**: 34-69.
9. SEIFERT H.S.H., BOHNEL H., RANAIVOSON A., 1983. Immunoprophylaxis of clostridial infections in ruminants in Madagascar through intradermal application of ultra-filtered toxoids of locality-specific clostridia. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.*, **90**: 274-279.
10. SEIFERT H.S.H., GIERCKE-SYGUSCH S., BOHNEL H., 1990. Identification of pathogenic bacteria by headspace gas chromatography. *Anal. Microbiol. Method.*, **8**: 125-136.
11. SWARTZ M.N., 1980. Anaerobic spore-forming bacilli: The Clostridia. In: Davis B.D., Dulbecco R., Eisen H.N., Ginsberg H.S., Microbiology, 3rd Edn. Philadelphia, PA, USA, Harper and Row, p. 712-722.
12. VESTER J.L., WAYNE C.M., WALLIS L.J., 1967. Determination of volatile acid production by gas chromatography. *Can. J. Microbiol.*, **13**: 1033-1040.

Reçu le 18.09.2001, accepté le 05.04.2002

Summary

Rajaonarison J.J., Andriamihamina R., Fatou-Rakotobe, Rafaliarisoa V., Randrianasolo E., Maharavo R.C.Y. Isolation of *Clostridium septicum* during a Blackleg Outbreak in Madagascar

Blackleg outbreaks have been reported at various locations in Vakinankaratra area (Madagascar) in 1996 and 1997, and caused the death of 588 head of cattle within seven months. Even animals that had been vaccinated between April and August 1996 were not spared from the disease. After performing bacteriological investigations on samples in March 1997, another blackleg agent, *Clostridium septicum*, was isolated, and its presence was reported in the country for the first time. The Institute for Applied Biotechnology in the Tropics of Goettingen (Germany) confirmed the diagnosis by the gas chromatography technique in May. An experimental vaccine was developed from that strain in order to fill the lacking valence in the conventional product. The isolation of *C. septicum* occurred 28 years after the first outbreaks of blackleg caused by *Clostridium chauvoei*. Its origin is briefly discussed.

Key words: Cattle – Blackleg – *Clostridium septicum* – Gas chromatography – Vaccine – Epidemiology – Madagascar.

Resumen

Rajaonarison J.J., Andriamihamina R., Fatou-Rakotobe, Rafaliarisoa V., Randrianasolo E., Maharavo R.C.Y. Aislamiento de *Clostridium septicum* durante una epizootia de carbón sintomático en Madagascar

Focos de carbón sintomático aparecieron en diferentes localidades de la región de Vakinankaratra (Madagascar), durante los años de 1996 y 1997, causando la muerte de 588 bovinos en el espacio de siete meses. Incluso los animales previamente inmunizados, entre abril y agosto de 1996, fueron afectados. Los análisis bacteriológicos realizados sobre las muestras recibidas permitieron evidenciar en marzo 1997 otro agente del carbón sintomático, *Clostridium septicum*, cuya existencia no se había reportado anteriormente en el país. El diagnóstico fue confirmado en mayo por el Instituto de biotecnología aplicada a los países tropicales de Goettingen (Alemania), mediante la técnica de cromatografía en fase gaseosa. Se preparó un antígeno como vacuna experimental a partir del germen, para llenar la falta en el producto convencional. El aislamiento de esta bacteria se da 28 años después de las primeras apariciones de carbón sintomático debidas a *Clostridium chauvoei*. Los autores discuten brevemente su origen.

Palabras clave: Ganado bovino – Carburnco sintomático – *Clostridium septicum* – Cromatografía de gases – Vacuna – Epidemiología – Madagascar.