

## **PROTOCOLE DE BASE À L'INTENTION DES LABORATOIRES CLINIQUES**

### **POUR IDENTIFICATION ÉVENTUELLE DE**

### ***Bacillus anthracis***

Le but de ce protocole est d'indiquer aux laboratoires cliniques les techniques d'identification de ce microorganisme afin d'aider les médecins à établir leur diagnostic.

**Laboratoire de santé publique du Québec**

20045, chemin Sainte-Marie  
Sainte-Anne-de-Bellevue (Québec) Canada H9X 3R5  
Téléphone : (514) 457-2070  
Télécopieur : (514) 457-6346

# Note

Ce protocole a été adapté pour la province de Québec par le Laboratoire de santé publique du Québec (LSPQ) à partir de celui des Centers for Disease Control (CDC).

Nous vous rappelons que :

- i) À partir d'échantillons cliniques, *B. anthracis* est peu contagieux;
- ii) **Nous croyons inapproprié, pour tout laboratoire clinique, de traiter des échantillons provenant de l'environnement;** ceux-ci devant être manipulés en laboratoire de niveau de confinement 3, compte tenu des concentrations bactériennes élevées que l'on pourrait y trouver. Ces échantillons devraient tous être envoyés au LSPQ;
- iii) Si, à partir d'un échantillon clinique, vous pensez avoir une souche de *B. anthracis*, cessez toute manipulation et envoyez cette bactérie au LSPQ pour identification finale en suivant les lignes directrices pour le transport de bactéries virulentes (niveau 3) et veuillez SVP nous en aviser.

Nous vous remercions de votre collaboration.

La direction  
Laboratoire de santé publique du Québec

Collaborateurs :

**Experts :**

Robbin S. Weyant, Ph.D.  
Chef, Special Bacteriology and Reference Laboratory  
Centers for Disease Control and Prevention

John W. Ezzell, Jr., Ph.D.  
Chef, Special Pathogens Branch  
United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases

Tanja Popovic, M.D., Ph.D.  
Chef, Epidemic Investigations Laboratory  
Centers for Disease Control and Prevention

**Réviseurs techniques :**

Kimberly Quinlan Lindsey, Ph.D.  
Coordinatrice, Laboratory Education and Training  
Bioterrorism Preparedness and Response Program  
Centers for Disease Control and Prevention

Stephen A. Morse, M.S.P.H., Ph.D.  
Directeur adjoint, Laboratory Services  
Bioterrorism Preparedness and Response Program  
Centers for Disease Control and Prevention

Ce document est une traduction du document original, « Basic Laboratory Protocols for the Presumptive Identification of *Bacillus anthracis* », préparé par les Centers for Disease Control and Prevention, États-Unis.

Traduction Lexidic  
Révision : Laboratoire de santé publique du Québec  
Les photographies et le texte anglais sont affichés sur le site  
<http://www.bt.cdc.gov/Agent/Anthrax/Anthraxis20010417.pdf>

## Table des matières

### Identification de *Bacillus anthracis*

#### I. Introduction

1. Vue d'ensemble
2. L'infection humaine
3. Antibiothérapie
4. Vaccin contre l'anthrax

#### II. Procédures de laboratoire destinées à identifier *Bacillus anthracis*

1. Généralités
2. Cueillette de spécimens cliniques
3. Matériel nécessaire à l'ensemencement des spécimens cliniques
4. Isolement à partir de spécimens cliniques
5. Incubation et examen des cultures
6. Tests différentiels permettant une identification probable de *B. anthracis*
  - 6.a. Caractéristiques des colonies de *B. anthracis*
  - 6.b. Morphologie de *B. anthracis* à la coloration de Gram
  - 6.c. Coloration d'échantillons cliniques (sang et LCR) à l'encre de Chine pour mise en évidence de la capsule
  - 6.d. Test de mobilité : état frais ou test de mobilité en tube
7. Clé d'identification probable de *B. anthracis*
8. Mesures à prendre en cas d'identification de colonie *B. anthracis* susceptible d'être associée à une attaque bio-terroriste
9. Liste des fournisseurs

## I. Introduction

### 1. Vue d'ensemble

L'anthrax est une zoonose transmissible à l'homme à la suite d'une manipulation ou d'une consommation de produits d'origine animale contaminés. L'agent étiologique de l'anthrax, *Bacillus anthracis*, est un bacille à Gram positif formant des spores. L'anthrax peut être présent dans toutes les régions tempérées, mais il représente néanmoins un risque plus élevé dans les pays ne bénéficiant pas de programmes de santé publique totalement efficaces et normalisés. Les régions à risque élevé les plus souvent citées sont l'Amérique centrale et l'Amérique du Sud, l'Europe méridionale et orientale, l'Asie, l'Afrique, les Caraïbes et le Moyen-Orient. Dans ces régions, les mammifères sauvages herbivores (notamment les chevreuils, les gnou et les éléphants) et le bétail domestique (chèvres, moutons, vaches, chevaux et cochons) sont plus à risque. Le plus souvent, ces animaux sont infectés parce qu'ils broutent des terres contaminées, mangent une nourriture contaminée ou s'abreuvent à des points d'eau contaminés. Les spores de *B. anthracis* sont viables dans le sol pendant de nombreuses années. En Amérique du Nord, le bétail est rarement infecté, mais des flambées d'anthrax ont déjà été signalées parmi des populations de chevreuils en Louisiane, au Texas et jusque dans le Midwest, ainsi que dans des populations de bisons des bois dans les Territoires du Nord-Ouest, au Canada. Les cas d'anthrax les plus souvent signalés aux États-Unis sont survenus au Texas, en Louisiane, dans le Mississippi, l'Oklahoma et le Dakota du Sud. Les oiseaux, les amphibiens, les reptiles et les poissons ne sont pas directement susceptibles d'attraper la maladie. Certains mammifères carnivores (ex. chiens, lions) et omnivores (ex. cochons) peuvent être infectés s'ils consomment de la viande provenant d'animaux contaminés.

### 2. L'infection humaine

Quiconque manipule un produit contaminé ou consomme de la viande pas assez cuite provenant d'animaux contaminés peut être infecté par *B. anthracis*. L'infection peut aussi être le résultat d'une inhalation de spores de *B. anthracis* venant de produits d'origine animale contaminés (ex. laine) ou d'une libération intentionnelle de ces spores en cas d'attaque bio-terroriste. Aucun cas de transmission interhumaine n'a encore été déclaré. Il existe trois formes d'anthrax chez l'humain : cutanée, gastro-intestinale et pulmonaire.

#### 2.a. Anthrax cutané

L'infection cutanée survient lorsque la bactérie ou la spore pénètre à travers une coupure ou une érosion de la peau, ce qui se peut se produire lorsque l'on manipule de la laine, des peaux, du cuir ou des poils (notamment de chèvre) d'animaux infectés. L'infection se présente tout d'abord sous la forme d'une bosse prurigineuse ou d'une papule faisant penser à une piqûre d'insecte. Un ou deux jours plus tard, la bosse est devenue une vésicule remplie de liquide qui éclate et se transforme en un ulcère non douloureux (une « escarre »). Généralement, cette escarre de 1 à 3 cm de diamètre présente une zone nécrotique (morte) noire en son centre. *B. anthracis* libérant une toxine œdémateuse, ces lésions sont souvent associées à un œdème marqué. On observe parfois un gonflement des ganglions lymphatiques proches de la région infectée. Environ 20 % des cas d'anthrax cutané non traités provoquent la mort, soit parce que l'infection est devenue systémique, soit à cause de la détresse respiratoire causée par l'œdème au niveau cervical et dans la partie thoracique supérieure. Les malades traités au moyen d'antibiotiques appropriés décèdent rarement. En général, les lésions deviennent stériles en 24 h et disparaissent en quelques semaines.

### 2.b. Anthrax gastro-intestinal

La forme gastro-intestinale, qui peut résulter de la consommation de viande d'animaux infectés, se caractérise par une inflammation aiguë du tractus intestinal. Les premiers symptômes de nausées, de perte d'appétit, de vomissements et de fièvre sont suivis de douleurs abdominales, d'hématémèses et de diarrhées abondantes. Difficile à évaluer, le taux de décès dus à l'anthrax gastro-intestinal se situe entre 25 % et 60 %.

### 2.c. Anthrax pulmonaire

L'anthrax pulmonaire est provoqué par l'inhalation de spores de *B. anthracis*. Cette inhalation est le plus vraisemblablement due à une libération volontaire de *B. anthracis* par aérosol. Après une période d'incubation de 1 à 6 jours (selon le nombre de spores inhalées), la maladie se déclare de façon graduelle et non spécifique. Fièvre, malaises et fatigue peuvent être observés au départ, parfois associés à une toux improductive et à un léger malaise thoracique. Ces premiers symptômes sont souvent suivis d'une brève amélioration (allant de quelques heures à plusieurs jours), puis du développement rapide d'une vive détresse respiratoire accompagnée de dyspnée (respiration laborieuse), sudation profuse (transpiration), stridor (bruit strident lors de l'inspiration) et cyanose (la peau prend une teinte bleuâtre). L'état de choc et la mort surviennent généralement dans les 24 à 36 h suivant les premiers symptômes de détresse respiratoire. Dans les stades ultérieurs, le taux de mortalité approche de 100 % malgré un traitement énergique. Les signes physiques sont généralement non spécifiques. La radiographie pulmonaire suffit souvent à établir le diagnostic (signe pathognomonique), révélant un élargissement du médiastin ainsi que des épanchements pleuraux, le plus souvent sans infiltration.

*B. anthracis* peut être observé dans le sang à la coloration de Gram et lors d'une hémoculture ordinaire, mais souvent dans les derniers stades de la maladie. Seuls les bacilles végétatifs encapsulés sont présents pendant l'infection. Les spores ne peuvent être observées dans le sang, en partie parce que les niveaux de CO<sub>2</sub> dans le corps préviennent la sporulation. Les résultats des études d'inhalation d'anthrax chez les primates non humains (singes Rhésus) indiquent que les bacilles et les toxines se manifestent dans le sang 2 à 3 jours après exposition à la bactérie. L'apparition des toxines coïncide avec celle des bacilles dans le sang, et il existe des tests permettant d'identifier rapidement les toxines.

## 3. **Antibiothérapie**

La plupart des souches de *B. anthracis* sont sensibles à de nombreux antibiotiques. On recommande généralement de prescrire de la pénicilline, de la ciprofloxacine ou de la doxycycline. Pour être efficace, le traitement doit débuter le plus tôt possible. Non traitée, la maladie est presque toujours mortelle.

## 4. **Vaccin contre l'anthrax**

Un vaccin contre l'anthrax chez l'homme est disponible aux États-Unis [mais non au Canada]. Ce vaccin, qui est un filtrat acellulaire contenant un antigène protecteur et de l'alun, serait efficace dans 93 % des cas d'anthrax cutané. Les études expérimentales sur animaux laissent à penser que le vaccin pourrait aussi protéger contre la menace que constitue la libération de *B. anthracis* par aérosol.

*B. anthracis* est susceptible d'être un agent de menace associé à une guerre bactériologique. Aux É.-U., le Department of Defense recommande de vacciner tout le personnel militaire en service actif. Selon l'Advisory Committee for Immunization Practices (ACIP), les civils qui devraient être vaccinés sont d'une part les personnes en contact dans leur milieu de travail avec des peaux d'animaux importées, des fourrures, de la laine, de la poudre d'os, des poils d'animaux (surtout de chèvre) et de la soie d'animal, d'autre part les personnes ayant des activités reliées aux diagnostics ou examens susceptibles de les mettre en contact avec les spores de *B. anthracis*. Le vaccin ne devrait être administré qu'aux hommes et aux femmes en bonne santé âgés de 18 à 65 ans, les études menées jusque là n'ayant pris en considération que ce segment de population. Les femmes enceintes ne devraient pas être vaccinées, car personne ne connaît les effets du vaccin sur le fœtus.

Le protocole de vaccination contre l'anthrax consiste en 3 injections sous-cutanées à 2 semaines d'écart, suivies de 3 autres injections à six mois d'écart (6, 12 et 18 mois). Des injections annuelles de rappel sont nécessaires pour préserver l'immunité. Environ 30 % des personnes vaccinées présentent des réactions locales minimales (sensibilité et rougeur locales). Il peut se produire une réaction locale modérée si la personne a déjà attrapé la maladie. Les violentes réactions locales sont rares; en pareil cas, un gonflement important de l'avant-bras s'ajoute à la réaction locale. Des réactions généralisées, caractérisées par des symptômes ressemblant à un état pseudogrippal, surviennent dans moins de 0,2 % des cas.

## II. Procédures de laboratoire destinées à identifier *Bacillus anthracis*

### 1. Généralités

Les procédures ci-dessous visent à exclure la possibilité de la présence de *B. anthracis* dans un spécimen clinique. Elles devraient être exécutées dans des laboratoires de microbiologie de niveau de confinement 2. Des gants et un sarrau doivent être portés pour traiter les spécimens et effectuer les tests, et le port de lunettes de sécurité ou d'un écran de protection est recommandé. Toute activité entraînant un contact des mains avec les muqueuses (boire, manger, fumer, se maquiller, etc.) est interdite. Il convient de se laver les mains avant de quitter le laboratoire. Il n'est pas nécessaire d'être vacciné contre l'anthrax.

#### 1.a. Manipulation des échantillons

Pour des raisons de sécurité, les échantillons d'agents biologiques constituant une menace pour la santé devront être analysés dans une enceinte de biosécurité (EBS) de catégorie II. Les procédures nécessitant l'enlèvement d'objets d'une EBS (ex. lames de microscope) devraient suivre les précautions et pratiques microbiologiques publiées. Il est important de toujours vérifier qu'aucun article inutile ne se trouve dans l'enceinte afin de ne pas influencer la qualité du débit et de la circulation de l'air. Comme pour toute autre procédure impliquant du matériel infectieux, il est recommandé de porter un ensemble de protection personnelle standard, notamment des gants de latex et un sarrau, ou encore un survêtement jetable. Une protection respiratoire additionnelle devrait être envisagée lorsque le matériel ou les procédures sont susceptibles de présenter un danger en dehors de l'EBS. Une fois l'agent biologique identifié, il peut s'avérer opportun de modifier la manipulation des échantillons.

#### 1.b. Décontamination

Les eaux de Javel commerciales contiennent 5,25 % d'hypochlorite et suffisent pour la décontamination courante des surfaces et instruments ayant été en contact avec le *B. anthracis* lorsque diluées à 1:10. Les objets contaminés (pipettes, aiguilles, anses, lames de microscope, etc.) devront être immergés dans une solution décontaminante jusqu'à ce qu'ils soient stérilisés en autoclave. Les surfaces de travail, dont l'EBS, devraient être essuyées avec une solution décontaminante avant et après usage. La méthode de décontamination d'un écoulement accidentel dépend de sa nature. Les écoulements qui comprennent des cultures récentes ou des échantillons connus pour leur concentration peu élevée de spores devraient être inondés de solution décontaminante et laissés à tremper pendant au moins 5 minutes avant d'être nettoyés; ceux qui comprennent des échantillons à forte concentration de spores ou des matières organiques, ou qui se produisent dans des endroits à température plus basse que la température ambiante (réfrigérateurs, congélateurs), devraient être exposés à une solution décontaminante pendant au moins 1 heure avant d'être nettoyés. Le personnel, quel qu'il soit, chargé d'un nettoyage de cette sorte devrait porter des gants, des lunettes de sécurité et un sarrau ou une blouse chirurgicale. Il faut envisager la possibilité d'une protection respiratoire lorsque l'on soupçonne qu'une grande quantité de liquide a été dispersé en fines gouttelettes.

## **2. Cueillette de spécimens cliniques**

### 2.a. Matériel

Désinfectant sporicide  
Récipient pour expectorations  
Cotons-tiges stériles  
Ensemble pour hémocultures  
Récipient pour culture de selles

### 2.b. Anthrax cutané

2.b.1. Stade vésiculaire – C'est à ce stade que le bacille est le plus facile à mettre en évidence. Faire tremper deux cotons-tiges stériles dans le liquide d'une vésicule jusque-là intacte.

2.b.2. Stade de l'escarre – Insérer et faire tourner deux cotons-tiges sous le rebord de l'escarre, sans la retirer.

### 2.c. Anthrax gastro-intestinal

2.c.1. Une culture de selles doit être faite si le patient peut produire un échantillon.

2.c.2. Les hémocultures seront positives lors des stades ultérieurs de la maladie, surtout si les spécimens ont été obtenus avant le début de l'antibiothérapie.

### 2.d. Anthrax pulmonaire

2.d.1. En cas de symptômes respiratoires, prélever, si possible, des expectorations pour une culture et un frottis.

2.d.2. Les hémocultures seront positives lors des stades ultérieurs de la maladie (2 à 8 jours après l'exposition), surtout si les spécimens ont été obtenus avant le début de l'antibiothérapie.

## **3. Matériel nécessaire à l'ensemencement des spécimens cliniques**

Gélose sang de mouton à 5 % (GSM)  
Gélose MacConkey  
Gélose d'alcool phényléthylique (pour les cultures de selles)  
Bouillon trypticase soya  
Lames propres de microscope  
Cotons-tiges stériles (il est préférable d'utiliser les écouvillons des trouses commerciales pour le transport des échantillons [culture aérobie])  
Anses jetables stériles  
Centrifugeuse clinique avec porte-tubes biosécuritaires appropriés  
Désinfectant sporicide (hypochlorite de sodium ou de calcium à 0,5 %)

#### **4. Isolement à partir de spécimens cliniques**

##### 4.a. Prélèvement d'expectorations

Inoculer 3 milieux de culture couramment utilisés pour ce type de spécimen (GSM, gélose MacConkey et bouillon d'enrichissement).

##### 4.b. Hémocultures

4.b.1. Les méthodes habituelles sont suffisantes.

4.b.2. La présence de bacilles dans le sang peut être suffisamment importante pour que ceux-ci puissent être vus directement à la coloration de Gram. *B. anthracis* a l'aspect de chaînettes de 2 à 4 cellules encapsulées comme l'indiquent les zones claires entourant les bacilles. La présence dans le sang de gros bâtonnets encapsulés à Gram positif suggère fortement la présence de *B. anthracis*.

4.b.3. Si la bouteille d'hémoculture est positive, faire directement une coloration de Gram et vérifier la présence de bâtonnets encapsulés. Ces hémocultures devraient être repiquées sur GSM et sur gélose MacConkey.

##### 4.c. Prélèvements sur coton-tige

4.c.1. Utiliser un seul coton-tige pour inoculer 3 milieux de culture couramment utilisés pour les plaies superficielles (GSM, gélose MacConkey et bouillon d'enrichissement).

4.c.2. Préparer un frottis pour coloration de Gram avec le second coton-tige.

##### 4.d. Échantillon de selles

4.d.1. Les méthodes habituelles de cultures de selles (GSM, gélose MacConkey ou alcool phényléthylique) sont suffisantes.

4.d.2. Ne pas utiliser de plaques HEKTOEN ou CVA (Ceboperazone-Vanesnycine-Auphodéricerin B)

##### 4.e. Échantillons de LCR

4.e.1. Si une centrifugeuse avec godets de sécurité est disponible, centrifuger pendant 15 minutes l'échantillon de LCR à 1 500 x g.

4.e.2. Recueillir le culot et préparer un frottis pour coloration de Gram.

4.e.3. Inoculer le reste du culot sur GSM et bouillon d'enrichissement (bouillon trypticase soya ou thioglycolate).

#### **5. Incubation et examen des cultures**

5.a. Les cultures devraient être incubées dans des conditions ambiantes à 35-37 °C.

5.b. Les cultures devraient être examinées dans les 18 à 24 h après l'incubation. *B. anthracis* peut apparaître à partir de la 8<sup>e</sup> heure d'incubation.

## 6. Tests différentiels permettant une identification probable de *B. anthracis*

### 6.a. Caractéristiques des colonies de *B. anthracis*

6.a.1. Après incubation de 15 à 24 h sur GSM à 35-37 °C, des colonies bien isolées de *B. anthracis* de 2 à 5 mm de diamètre apparaissent. Ces colonies plates ou légèrement convexes ont une forme ronde irrégulière, avec des bords légèrement ondulés, et l'aspect du verre dépoli. On observe souvent des projections en forme de virgule venant du bord de la colonie, ce qui produit une colonie « tête de méduse ».

6.a.2. Les colonies sur GSM ont généralement une consistance tenace. Si l'on tente de soulever une colonie avec une anse, celle-ci prendra la forme de pics de blancs d'œufs battus. Contrairement aux colonies de *B. cereus* et de *B. thuringiensis*, les colonies de *B. anthracis* ne sont pas β-hémolytiques. Toutefois, l'hémolyse faible qui peut être observée dans les zones de croissance confluyente des cultures anciennes ne doit pas être confondue avec une β-hémolyse.

6.a.3. Lorsque l'on examine des milieux de croissance primaires, il est important de comparer l'importance de la croissance de *B. anthracis* sur GSM à celle de sa croissance sur gélose MacConkey. *B. anthracis* croît rapidement sur GSM; il ne croît pas sur gélose MacConkey. La croissance de *B. anthracis* est rapide. Les zones fortement inoculées peuvent présenter une croissance 6 à 8 heures après ensemencement et les colonies individuelles peuvent être détectées dans les 12 à 15 heures. Cette caractéristique peut contribuer à isoler *B. anthracis* dans les cultures mixtes comprenant des organismes à croissance plus lente.

### Figure 1.

Morphologie de la colonie *B. anthracis* et *B. cereus*. Culture en une nuit de *B. cereus* (côté gauche) et de *B. anthracis* (côté droit) sur GSM.

(La photographie est affichée sur le site <http://www.bt.cdc.gov/Agent/Anthrax/Anthraxis20010417.pdf>.)

## **6.b. Morphologie de *B. anthracis* à la coloration de Gram**

### 6.b.1. Procédure

Effectuer la coloration de Gram selon les procédures habituelles.

### 6.b.2. Interprétation des résultats

*B. anthracis* est un gros bâtonnet (1 à 1,5 X 3-5  $\mu\text{m}$ ) à Gram positif qui forme des spores ovales, centrales ou sub-terminales (1 X 1,5  $\mu\text{m}$ ) ne provoquant pas de gonflement notable de la cellule sur GSM. Les spores sont absentes des échantillons cliniques à moins d'être exposées à des niveaux atmosphériques de  $\text{CO}_2$ ; les niveaux de  $\text{CO}_2$  présents dans le corps préviennent toute sporulation. À la coloration de Gram, les cellules végétatives provenant d'hémocultures et par examen direct de frottis par impression sont des chaînettes de 2 à 4 cellules encapsulées. Toutefois, les cellules en croissance sur GSM dans des conditions ambiantes ne sont pas encapsulées et se présentent sous la forme de longues chaînes de bâtonnets. Les souches virulentes cultivées sur gélose nutritive en présence de  $\text{CO}_2$  à 5 % ou au moyen d'autres milieux de base additionnés de bicarbonate de sodium à 0,8 % produiront des bacilles fortement encapsulés. La capsule peut être observée au microscope en utilisant une coloration à l'encre de Chine.

### **Figure 2.**

Coloration de Gram de *B. anthracis* provenant de GSM (agrandissement à 1 000X).

(La photographie est affichée sur le site <http://www.bt.cdc.gov/Agent/Anthrax/Anthraxis20010417.pdf>.)

## 6.c. Coloration d'échantillons cliniques (sang et LCR) à l'encre de Chine pour mise en évidence de la capsule

### 6.c.1. But

L'encre de Chine permet d'améliorer la visualisation de *B. anthracis* encapsulé dans des échantillons cliniques tels que le sang, les bouteilles d'hémocultures ou le LCR.

### 6.c.2. Matériel

Lames de microscope  
Lamelles  
Encre de Chine  
Microscope avec objectif à immersion (100X)

### 6.c.3. Contrôles

#### a) Souches contrôle

- (1) Contrôle positif -- *Klebsiella pneumoniae* sur GSM ou équivalent
- (2) Contrôle négatif -- *E.coli* ATCC 25922 ou équivalent

#### b) Contrôle de qualité

Faire le test avec une suspension de cultures récentes des souches contrôle. Celles-ci devraient être vérifiées chaque jour de test.

#### c) Résolution d'un problème résultant d'un contrôle anormal

Vérifier la pureté et l'identité des souches contrôle et recommencer le test.

### 6.c.4. Procédure

a) Pour les contrôles, transférer dans 0,5 ml de sérum ou de sang complet traité à l'EDTA une petite quantité de colonies (1 mm de diamètre) provenant de chaque GSM de contrôle. Agiter.

b) Pour les inconnues, prélever 100 µl d'échantillon (sang, LCR).

c) Transférer 5 à 10 µl d'inconnues ou de la souche contrôle sur une lame, déposer une lamelle sur la goutte et ajouter 5 à 10 µl d'encre de Chine sur le bord de la lamelle.

d) Après diffusion de l'encre, observer les cellules en utilisant un objectif à 100X avec de l'huile à immersion sur le dessus de la lamelle.

## Figure 3.

Coloration à l'encre de Chine de *B. anthracis*.

(La photographie est affichée sur le site <http://www.bt.cdc.gov/Agent/Anthrax/Anthraxis20010417.pdf>.)

### 6.c.5. Interprétation des résultats

Dans le cas du contrôle positif, la capsule apparaît sous forme de zone claire bien définie autour des cellules. Aucune zone ne devrait apparaître sur le contrôle négatif.

## **6.d. Test de mobilité : état frais ou test de mobilité en tube**

### 6.d.1. But

Ce test établit la mobilité des isolats suspects. *B. anthracis* est une bactérie non mobile, caractéristique inhabituelle chez les différentes espèces de *Bacillus* et pouvant donc servir à identifier de façon préliminaire des isolats de *B. anthracis*. Deux méthodes sont présentées ici; la méthode de l'état frais et le test de mobilité en tube.

### 6.d.2. Matériel

a) Pour la procédure de l'état frais

Lames de microscope propres

Lamelles

Eau distillée stérile

Anses jetables stériles

Microscope avec objectif de 40X et oculaire de 10X

Tube de verre stérile

b) Pour le test de mobilité en tube

Milieu de mobilité en tube (5 ml par tube)

Aiguille ou anse stérile jetable de 1 µl

### 6.d.3. Contrôles

a) Souches contrôle

(1) Contrôle positif -- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 35032 ou équivalent

(2) Contrôle négatif -- *Acinetobacter* spp. ATCC 49139 ou équivalent

b) Contrôle de qualité

Faire le test avec des cultures récentes de souches contrôle en reprenant les méthodes utilisées avec les inconnues. Les souches contrôle devraient être vérifiées chaque fois qu'il y a un test.

c) Résolution d'un problème résultant d'un contrôle anormal

Vérifier la pureté et l'identité des souches contrôle et recommencer le test.

### 6.d.4. Procédures

État frais et test de mobilité

a) État frais

(1) Déposer 2 gouttes (approximativement 0,1 ml) d'eau distillée stérile dans le tube de verre stérile.

(2) Prélever, avec l'anse, une colonie suspecte provenant d'une culture de 12 à 20 h et la mettre en suspension dans l'eau (une anse, provenant d'un milieu de culture récent en bouillon, peut aussi être utilisée.)

(3) Transférer 1 goutte de la suspension sur la lame de microscope et recouvrir de la lamelle.

(4) Examiner la lame au microscope à l'aide de l'objectif à 40X (agrandissement total = 400X).

(5) Immerger les lames dans une solution d'hypochlorite à 0,5 %.

b) Test de mobilité

(1) À l'aide d'une aiguille stérile, retirer une partie de colonie isolée suspecte provenant d'une culture de 18 à 24 h.

(2) Inoculer le tube de mobilité en enfonçant soigneusement l'aiguille à une profondeur de 3 à 4 cm et retirer l'aiguille tout droit, de façon à ne voir qu'une seule ligne d'inoculum.

(3) Laisser incuber pendant 18 à 24 h le tube en aérobiose à 35-37°.

c) Interprétation des résultats

(1) État frais : Des microorganismes se déplacent au hasard dans le liquide en suspension. Les organismes non mobiles ne peuvent pas se déplacer ou bien se déplacent avec un mouvement Brownien.

(2) Test de mobilité : Les organismes non mobiles, dont *B. anthracis*, ne formeront qu'une seule ligne de croissance qui ne déviara pas du point original de l'inoculation. Les organismes mobiles formeront une zone diffuse de croissance autour de la ligne d'inoculation.

## 7. Clé d'identification probable de *B. anthracis*

7.a. À partir d'échantillons cliniques, notamment de sang, LCR ou plaies superficielles : bâtonnets encapsulés à Gram positif.

7.b. Gros bâtonnets à Gram positif sporulés : *Bacillus* sp.

7.c. Spores ovoïdes ne présentant pas de gonflement; aspect de verre dépoli des colonies : morphologie de *Bacillus* de groupe 1 (comprenant *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* et *B. cereus* var. mycoïdes).

7.d. Non mobile : *B. anthracis* et *B. cereus*, var. mycoïdes.

7.e. Non hémolytique : probabilité de *B. anthracis*.

## 8. Mesures à prendre en cas d'identification de colonie *B. anthracis* susceptible d'être associée à une attaque bio-terroriste

8.a. Conserver les spécimens originaux pour une éventuelle enquête criminelle.

8.b. Communiquer avec les autorités policières locales, avec le département de santé publique de la région et avec le Laboratoire de santé publique du Québec.

8.c. Une consultation avec le département de santé publique de la région régionale et avec le Laboratoire de santé publique du Québec est vivement conseillée dès que l'on soupçonne que *B. anthracis* est utilisé comme agent de menace bio-terroriste.

## 9. Liste des fournisseurs

American Type Culture Collection [ATCC], 800-638-6597.