

Méthode analytique

Identification de bactéries cultivables

Responsable technique de la méthode

Delphine Lanoie, M. Sc., microbiologiste agréée

Personne(s) ayant contribué à la présente version de
cette méthode

Thi Thanh Tam Nguyen, technicienne de laboratoire

Audrey Bernèche-D'Amours, M. Sc., RMCCM, microbiologiste
agréée et biochimiste

MA-341





Avis de non-responsabilité

L'IRSST ne donne aucune garantie relative à l'exactitude, la fiabilité ou le caractère exhaustif de l'information contenue dans ce document. En aucun cas, l'IRSST ne saurait être tenu responsable de tout dommage corporel, moral ou matériel résultant de l'utilisation de cette information. Notez que les contenus des documents sont protégés par les législations canadiennes applicables en matière de propriété intellectuelle. Les méthodes d'analyses ou d'étalonnages sont celles mises au point ou retenues par l'IRSST pour l'exécution de ses différents mandats. Elles peuvent requérir l'utilisation de matériels, d'opérations ou d'équipements dangereux. Ces méthodes n'ont pas pour but de mentionner tous les problèmes de sécurité associés avec leur utilisation. C'est la responsabilité de l'utilisatrice et de l'utilisateur d'établir les pratiques de santé et de sécurité appropriées. L'utilisation des données incluses dans ces méthodes se fera aux seuls risques de l'utilisatrice et de l'utilisateur : l'IRSST se dégage de toute responsabilité relative aux erreurs ou aux dommages qui découleraient de telle utilisation et de telle application. Les hyperliens qui apparaissent dans ce document ont été validés au moment de la publication.

Cette publication est disponible en version PDF sur le site Web de l'IRSST.

Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales du Québec, 2024

ISBN : 978-2-89797-289-9 (4^e édition, 2024)

ISBN : 978-2-89631-255-9 (1^{re} édition, 2008)



SUIVI DES MODIFICATIONS

NATURE DE LA MODIFICATION

La présente version de cette méthode est reformatée selon le nouveau gabarit de rédaction des méthodes analytiques. Elle comporte une mise à jour des techniques analytiques utilisées pour identifier les bactéries cultivables au laboratoire de l'IRSST, en incluant l'identification microbienne par spectrométrie de masse et par séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S. Le système Microscan ainsi que l'analyse du profil en acide gras ne sont plus des techniques utilisées à l'IRSST pour l'identification bactérienne et ont donc été retirés de cette version.
--



AGENT MICROBIEN CIBLÉ

Bactéries mésophiles hétérotrophes aérobies et anaérobies facultatives cultivables
--

APPLICABILITÉ

Cette méthode est utilisée pour identifier des bactéries cultivées à partir d'échantillons d'air, de surface ou provenant de procédés solides ou liquides. Après avoir isolé une souche bactérienne en culture pure, les caractères macroscopiques et microscopiques des colonies bactériennes sont observés et des tests biochimiques simples sont réalisés. L'identification finale pourra être réalisée en utilisant une ou plusieurs de ces techniques : par spectrométrie de masse utilisant la technologie MALDI-ToF, par séquençage de type Sanger du gène codant pour l'ARNr 16S ou en fonction des caractéristiques phénotypiques de la souche par le système Biolog (tests biochimiques).

LIMITATIONS ET INTERFÉRENCES

La performance de cette méthode peut être influencée par divers éléments :

- La rencontre des conditions de croissance nécessaires au développement des bactéries;
- La présence d'une croissance confluyente sur les milieux de culture, rendant difficile l'isolement en culture pure;
- La présence de microorganismes envahissants sur les milieux de culture, rendant difficile l'isolement en culture pure;
- Le maintien du caractère cultivable d'une souche lors de l'isolement en culture pure;
- La présence de la bactérie recherchée dans la base de données utilisée.



RÉACTIFS ET MATÉRIELS

- Colorants de Gram
- Peroxyde d'hydrogène 1-5%
- Réactif oxydase
- Géloses TSA (Trypticase soja) ou autre au besoin

VITEK® MS

- Cibles (lames) : VITEK® MS-DS
- Matrice : VITEK® MS-CHCA
- Acide formique : VITEK® MS-FA

SeqStudio

- Trousse d'amplification « 16S Direct »
- Trousse de séquençage « BigDye Direct »

Biolog

- Microplaques GEN III

APPAREILLAGE

- Réfrigérateur (4±2°C)
- Incubateur (37°C±2°C)
- Autoclave
- Enceinte de sécurité biologique
- Stéréomicroscope
- Microscope à lumière transmise muni d'un contraste de phase, grossissement jusqu'à 100X
- Micropipettes et embouts stériles

VITEK® MS

- Système d'identification microbienne MALDI-ToF (VITEK® MS de Biomérieux)

SeqStudio

- Séquenceur (SeqStudio Genetic Analyzer de Applied Biosystems)
- Thermocycleur
- Logiciel d'analyse de séquence (MicrobeBridge de Applied Biosystems)

Biolog

- Logiciel informatique MicroLog M

PRÉPARATION DE L'ANALYSE

Caractérisation préliminaire

Étape 1	Isoler en culture pure sur milieu TSA tous (ou le nombre prescrit) les types de morphologies coloniales différentes observées sur le pétri initial. Incuber à 37°C ± 2°C pendant 24 à 48 h.
Étape 2	Pour chaque isolat, observer et noter les caractéristiques macroscopiques des colonies (dimension, couleur, texture, pigmentation du milieu, etc.).
Étape 3	Pour chaque isolat, observer et noter les caractéristiques microscopiques des cellules bactériennes. Réaliser un montage humide pour observer la motilité et une coloration de Gram pour observer la forme, l'arrangement et le résultat de Gram.
Étape 4	Réaliser le test de catalase en utilisant le peroxyde 1-5% et le test d'oxydase en utilisant le réactif oxydase sur chaque isolat.

Commentaires :

D'autres milieux de culture peuvent être utilisés pour faciliter l'identification de certains genres. Le milieu utilisé lors de la mise en culture initiale dictera normalement le milieu de culture qui sera utilisé pour l'étape d'isolement en culture pure.

**Identification finale**

Étape 5	Utiliser les techniques analytiques suivantes pour identifier chaque isolat.
	<ol style="list-style-type: none">1. Identification bactérienne par spectrométrie de masse MALDI-ToF2. Identification bactérienne par séquençage de type Sanger3. Identification bactérienne par profil biochimique
	Typiquement, les techniques analytiques sont effectuées selon l'ordre illustré par le schéma ci-dessous. Il est toutefois possible de combiner certaines de ces techniques ou de privilégier un type de technique en particulier, en fonction du contexte.

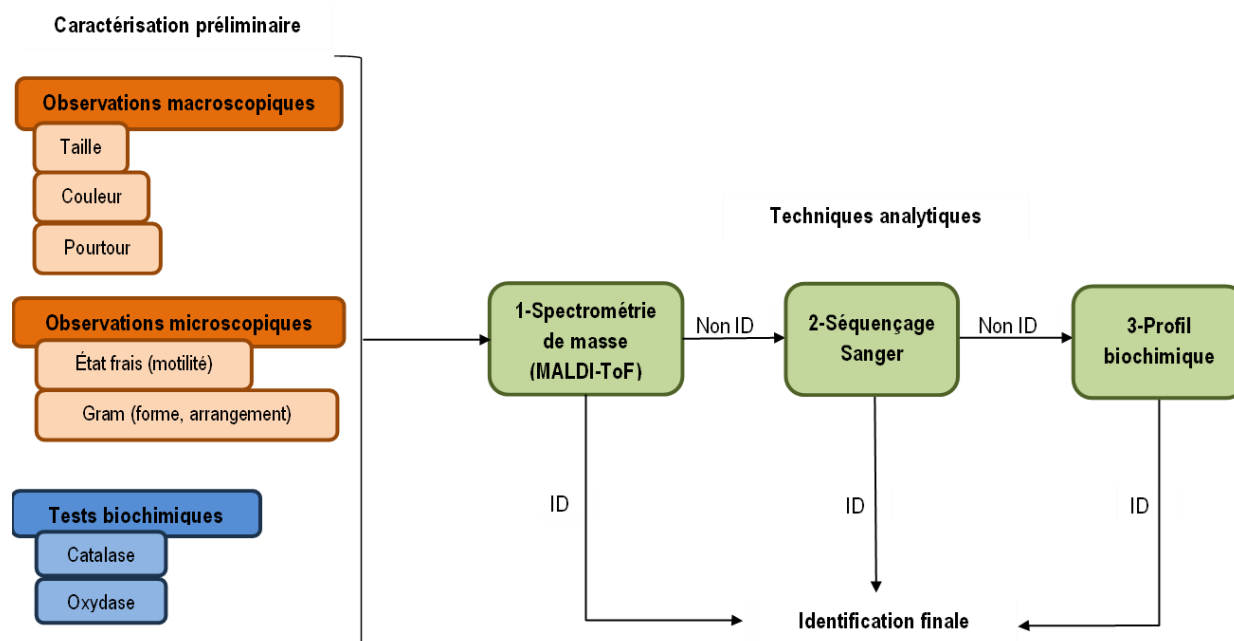


Figure 1. Représentation schématique du processus d'identification bactérienne.



TECHNIQUE ANALYTIQUE 1 - IDENTIFICATION BACTÉRIENNE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE MALDI-TOF

Principe

Le spectromètre de masse MALDI-ToF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight) permet l'identification des bactéries par l'analyse de leurs profils protéiques. Dans l'appareil, le mélange cristallisé de cellules bactériennes et de la matrice est ciblé par un faisceau laser. Les molécules du microorganisme sont alors désorbées et ionisées, ce qui leur permet d'être séparées en fonction de leur taille par accélération dans un champ électromagnétique. L'appareil mesure le ratio masse/charge de ces molécules en déterminant le temps qu'elles prennent pour traverser le tube de vol. Le profil protéique de la bactérie est ensuite comparé à une base de données contenant des spectres de référence, permettant à l'instrument de fournir une identification du microorganisme analysé.

SYSTÈME

Le système MALDI-ToF utilisé est le VITEK® MS de BioMérieux.

Les lames jetables possèdent un code-barre unique et contiennent 48 cibles, comprenant donc 3 sections de 16 cibles chacune. Le portoir de l'instrument peut recevoir un maximum de 4 lames à la fois, donc, au maximum, 192 analyses peuvent être faites simultanément.

Commentaires :

Typiquement, un même isolat occupera 4 cibles sur une lame. Celui-ci sera analysé en duplicata avec et sans ajout d'acide formique au niveau de la cible. L'acide formique agit à titre de prétraitement avant le dépôt de la matrice et semble permettre l'obtention d'une meilleure identification pour certains types de bactéries.

Veuillez-vous référer aux instructions du fabricant pour les consignes d'utilisation.

VALIDATION

Remarque : Différentes souches d'une même espèce ont parfois été testées (x). Selon les recommandations du fabricant, les souches ont été ensemencées sur milieu TSA et testées après 18-24 h d'incubation à 37°C.

La base de connaissances VITEK® MS de BioMérieux en vigueur au moment de la validation interne est la version 3.2.

Groupe	Résultats d'identification		Commentaire	
	Correct	Incorrect	ID attendue	ID obtenue
Cocci à Gram positif				
<ul style="list-style-type: none">• <i>Enterococcus faecalis</i> (3)• <i>Enterococcus saccharolyticus</i> (1)• <i>Kocuria rhizophila</i> (1)• <i>Micrococcus luteus</i> (4)• <i>Pediococcus acidilactici</i> (2)• <i>Staphylococcus aureus</i> (3)• <i>Staphylococcus epidermidis</i> (3)• <i>Streptococcus mutans</i> (4)• <i>Staphylococcus saprophyticus</i> (2)• <i>Streptococcus agalactiae</i> (1)• <i>Streptococcus anginosus</i> (1)• <i>Streptococcus pneumoniae</i> ^(a) (4)	29/29	-	-	-



Autres				
<ul style="list-style-type: none">• <i>Aerococcus viridans</i> (2)• <i>Arcanobacterium haemolyticum</i> (1)• <i>Brevibacterium epidermidis</i> (1)• <i>Brevundimonas diminuta</i> (1)• <i>Budvicia aquatica</i> (1)• <i>Burkholderia cepacia</i> (2)• <i>Chryseobacterium indoltheticum</i> ^(b) (2)• <i>Dermabacter hominis</i> (1)• <i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i> (1)• <i>Edwardsiella tarda</i> (1)• <i>Kocuria rosea</i> (2)• <i>Leclercia adecarboxylata</i> (1)• <i>Myroides odoratus</i> (2)• <i>Nocardia brasiliensis</i> (1)• <i>Oerskovia turbata</i> (1)• <i>Oligella urethralis</i> (1)• <i>Pedobacter heparinus</i> ^(b) (2)• <i>Rhodococcus hoagii</i> (1)• <i>Shingobacterium spiritivorum</i> (1)• <i>Sphingomonas trueperi</i> (1)• <i>Streptomyces griseus</i> (1)	25/27	2/27	<i>Myroides odoratus</i> (2)	No ID ^(f)
Total	109/116	7/116		

(a) Incubation prolongée à 48 heures.

(b) Espèce non présente dans la base de connaissances VITEK® MS V3.2. donnant un résultat adéquat de non-identification.

(c) *Corynebacterium minutissimum* n'est pas incluse dans la base de connaissances VITEK® MS V3.2. BioMérieux affirme que le test d'espèces non trouvées dans la base de données peut entraîner un résultat non identifié ou une mauvaise identification.

(d) Les espèces *Enterobacter cloacae* et *Enterobacter asburiae* ne peuvent pas être différenciées par le VITEK® MS, comme indiqué dans la base de connaissances VITEK® MS V3.2. D'autres systèmes ou tests d'identification seraient nécessaires afin de les différencier.

(e) Les espèces *Shigella sonnei* et *Shigella flexneri* peuvent être identifiées comme *Escherichia coli* puisque le VITEK® MS ne permet pas de différencier ces espèces, comme indiqué dans la base de connaissances VITEK® MS V3.2.

(f) Malgré que *Myroides* spp. apparaisse dans la base de connaissances VITEK® MS V3.2, il existe une limitation pour l'espèce *Myroides odoratus*, qui n'est pas présente dans cette version de la base de données.



TECHNIQUE ANALYTIQUE 2 - IDENTIFICATION BACTÉRIENNE PAR SÉQUENÇAGE DE TYPE SANGER

Principe

La technique de séquençage consiste d'abord à extraire et purifier l'ADN du microorganisme à identifier. Dans un premier temps, un segment d'ADN précis, appelé cible moléculaire, est amplifié par PCR. Ensuite, une dénaturation de cette cible moléculaire permet de séparer les deux brins d'ADN. Avec des amorces de séquençage, une réaction de polymérisation est effectuée sur chacun des brins dénaturés, en utilisant une ADN polymérase et des nucléotides dNTPs et ddNTPS dits de « terminaison ». Ces derniers sont marqués d'un fluorophore et ne peuvent pas établir de liaison phosphodiester avec le nucléotide suivant. Lorsqu'un ddNTP s'ajoute aléatoirement à la séquence d'un brin nouvellement synthétisé, cela cause l'arrêt de la polymérisation. Des brins de tailles différentes sont ainsi obtenus, marqués d'un fluorophore en leur position terminale. De façon automatique, par le séquenceur, les fragments amplifiés sont ensuite séparés en fonction de leur taille par électrophorèse et lus au moyen d'un détecteur de fluorescence, permettant d'identifier le type de nucléotide se trouvant en position terminale de chacun des brins. L'appareil fournit un chromatogramme qui permet de reconstituer la séquence d'ADN de la cible moléculaire initialement amplifiée. Cette séquence est utilisée pour interroger des bases de données, où elle est comparée aux séquences d'ADN de divers microorganismes référencés.

SYSTÈME

Pour l'identification bactérienne, la région génique ciblée est le gène codant pour l'ARN ribosomal (ARNr) 16S, soit la petite sous-unité du ribosome retrouvé chez les procaryotes (Bactéries et Archées). Le séquençage du gène de l'ARNr 16S est vastement reconnu et utilisé dans la classification et l'identification des bactéries, et ce, pour les raisons suivantes :

- Ce gène est présent chez toutes les bactéries, peu importe le genre et l'espèce.
- Ce gène contient des régions conservées et hypervariables.
 - Les régions conservées permettent de concevoir des amorces quasi universelles qui peuvent être utilisées pour l'identification d'une vaste diversité de bactéries.
 - Les régions hypervariables permettent de différencier ces bactéries, afin d'établir leur genre et parfois, leur espèce.
- Ce gène est relativement court (1500 paires de base (pb)).

Les étapes de PCR et de séquençage Sanger sont réalisées à l'aide du système intégré « 16S Direct workflow », qui inclue la trousse d'amplification « 16S Direct » et la trousse de séquençage « BigDye Direct » de Applied Biosystems.

- Cette trousse permet l'obtention de 2 amplicons (A et B) couvrant la quasi-totalité du gène codant pour l'ARNr 16S.
- Pour chaque bactérie à identifier, quatre (4) réactions de séquençage sont réalisées.
- L'appareil permet l'obtention des résultats de quatre (4) réactions de séquençage en aussi peu que 30 minutes, si opéré en mode court.

L'appareil utilisé est l'analyseur de séquence SeqStudio de Applied Biosystems.

Les séquences sont analysées avec le logiciel d'analyse de séquences MicrobeBridge.

Les bases de données utilisées pour analyser les résultats sont celles du NCBI 16S rRNA et du CDC MicrobeNet.

Commentaires :

Veuillez-vous référer aux instructions du fabricant pour les consignes d'utilisation.



VALIDATION

Remarque : La validation du système intégré « 16S Direct workflow » a été réalisée à l'aide d'une collection d'ADN préalablement extraits. Elle n'inclut donc pas l'étape d'extraction d'ADN employant le réactif Prepman Ultra mentionné dans le protocole du fabricant.

Critères d'identification bactérienne par séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S

Général	
Longueur du contig	≥ 500 pb
Query cover	≥ 90%
E-value	≤ 0
Identité	Niveau d'identification ^a
Si seule espèce ≥ 99 % Identité	Espèce
Si plus d'une espèce ≥ 99 % Identité	Genre
Si seul genre ≥ 97 %	Genre

Identification attendue	Niveau taxonomique d'identification obtenue (genre/espèce) pour les bases de données interrogées				Commentaires ^a
	NCBI 16S rRNA		CDC MicrobeNet		
	genre	espèce	genre	espèce	
Cocci à Gram positif					
<i>Enterococcus faecalis</i>		✓		✓	Résolution à l'espèce possible pour certaines espèces.
<i>Micrococcus luteus</i>	- b		✓		Beaucoup d'homologie au niveau du gène de l'ARNr 16S chez les <i>Micrococcus</i> spp.
<i>Pediococcus acidilactici</i>		✓		✓	Résolution à l'espèce possible pour certaines espèces.
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	✓		✓		Résolution limitée pour les espèces <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>S. capitis</i> et <i>S. caprae</i>
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	✓		✓		Résolution limitée pour les espèces <i>Staphylococcus saprophyticus</i> et <i>S. xylosus</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>		✓		✓	Résolution à l'espèce possible pour les espèces appartenant aux groupes de Lancefield.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	✓		✓		<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>S. pseudopneumoniae</i> et <i>S. mitis</i> ne peuvent pas être différenciées au niveau du gène de l'ARNr 16S.
Bâtonnets à Gram positif					
<i>Bacillus cereus</i>	✓		✓		<i>Bacillus cereus</i> et <i>B. anthracis</i> ne peuvent pas être différenciées au niveau du gène de l'ARNr 16S
<i>Bacillus subtilis</i>	✓		✓		Résolution à l'espèce impossible
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	- b		- b		Résolution à l'espèce limitée
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>		✓		✓	Résolution à l'espèce limitée
<i>Lactobacillus hominis</i>		✓	✓		Résolution à l'espèce possible pour certaines espèces.
<i>Lactobacillus salivarius</i>		✓		✓	Résolution à l'espèce possible pour certaines espèces.
<i>Listeria innocua</i>	✓		✓		<i>Listeria innocua</i> et <i>L. monocytogenes</i> ne peuvent pas être différenciées au niveau du gène de l'ARNr 16S
<i>Listeria monocytogenes</i>	✓		✓		<i>Listeria innocua</i> et <i>L. monocytogenes</i> ne peuvent pas être différenciées au niveau du gène de l'ARNr 16S



Bâtonnets à Gram négatif					
<i>Acinetobacter baumannii</i>	✓		✓		Résolution à l'espèce limitée
<i>Aeromonas hydrophila</i>	✓		✓		s. o.
<i>Alcaligenes faecalis</i>	✓		✓		Résolution à l'espèce limitée pour les isolats environnementaux
<i>Citrobacter freundii</i>	✓		✓		Résolution à l'espèce limitée
<i>Enterobacter cloacae</i>	✓		✓		Résolution à l'espèce limitée
<i>Escherichia coli</i>	-		-		<i>Escherichia coli</i> et <i>Shigella sonnei</i> ne peuvent pas être différenciées au niveau du gène de l'ARNr 16S
<i>Klebsiella aerogenes</i>	- b		- b		Résolution à l'espèce limitée. <i>K. aerogenes</i> est très apparentée à d'autres <i>Klebsiella</i> spp.. <i>Enterobacter</i> spp., ainsi qu'à certaines <i>Raoultella</i> spp.
<i>Providencia stuartii</i>		✓		✓	Résolution à l'espèce limitée
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	- b		- b		Résolution à l'espèce limitée
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	✓		✓		Résolution à l'espèce limitée
<i>Shigella sonnei</i>	-		-		<i>Escherichia coli</i> et <i>Shigella sonnei</i> ne peuvent pas être différenciées au niveau du gène de l'ARNr 16S
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	✓			✓	Résolution à l'espèce possible pour certaines espèces.
Autres					
<i>Burkholderia cepacia</i>	✓		✓		Résolution à l'espèce limitée, considérer rapporter comme <i>Burkholderia cepacia</i> complex.
<i>Myroides odoratus</i>	✓		- b		Résolution à l'espèce limitée
<i>Pedobacter heparinus</i>		✓	✓		s. o.
<i>Rhodococcus hoagii</i>	✓			✓	Résolution à l'espèce possible pour certaines espèces.
<i>Streptomyces griseus</i>	✓		✓		Résolution à l'espèce limitée

^a Indications provenant du CLSI

^b Selon le CLSI, le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S devrait permettre d'identifier le genre.

s. o. Sans-objet, il n'y a pas d'indication pour ce genre.



TECHNIQUE ANALYTIQUE 3 - IDENTIFICATION BACTÉRIENNE PAR PROFIL BIOCHIMIQUE

Principe

L'identification des bactéries en fonction de leurs propriétés biochimiques est plus précisément basée sur la capacité du microorganisme inconnu à utiliser diverses sources de carbone et à résister à différents réactifs chimiques inhibiteurs. Une suspension bactérienne standardisée de l'isolat à identifier est utilisée pour inoculer une microplaque qui contient déjà divers nutriments et réactifs. Après incubation, la capacité du microorganisme à croître dans chacun des puits sera révélée par un changement de couleur de l'indicateur colorimétrique. Le patron de puits colorés est ensuite observé visuellement et saisi de façon manuelle dans le logiciel. Ce patron est comparé à une base de données contenant des patrons de référence, permettant au système de fournir une identification de la bactérie analysée.

SYSTÈME

Les analyses biochimiques se font en plaques 96 puits et utilisent le système Gen III de Biolog, comprenant le logiciel MicroLog M.

Commentaires :

Veillez-vous référer aux instructions du manufacturier pour les consignes d'utilisation.



RÉFÉRENCES

Biolog. (s.d.). *Gen III Test Panel*. <https://www.biolog.com/products/microbial-identification-microplates/gen-iii-test-panel/>

Biomérieux. (s.d.). *VITEK® MS Plus*. <https://www.biomerieux.ca/fr/product/vitek-ms-plus>

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018). *Interpretative criteria for identification of bacteria and fungi by targeted DNA sequencing* (2^e éd). CLSI.

ThermoFisher Scientific. (2019). *The 16S Direct Workflow: Microbial identification using 16S gene sequencing on the SeqStudio Genetic Analyzer and Analysis with MicrobeBridge Software*. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/GSD/Application-Notes/16s-gene-direct-workflow-microbridge-app-note.pdf>