

Université de Sherbrooke

Dépistage des infections du tractus urinaire par méthode moléculaire

Par

Laurie Vingataramin

Département de Microbiologie et Infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)
en Microbiologie et infectiologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Octobre, 2014

Membres du jury d'évaluation

Eric H.Frost, Ph.D., Microbiologie

Directeur de recherche

Brendan Bell, Ph.D., Microbiologie

Membre du jury interne

Claude Déry, Ph.D., dép.biologie, Faculté des Sciences

Membre du jury externe

© Laurie Vingataramin, 2014

À mes parents France et Léo et mes frères Johan et Noham, pour vos encouragements vos appuis à Kassy pour ta présence à mes cotés et Bruno.

« Pour réussir, retenez bien ces trois maximes : voir c'est savoir, vouloir c'est pouvoir, oser c'est avoir. »

Alfred de Musset

RÉSUMÉ

Dépistage des infections du tractus urinaire par méthode moléculaire

Par
Laurie Vingataramin

Département de Microbiologie et infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en Microbiologie et infectiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Chaque année, environ 175 millions de personnes souffrent d'infection du tractus urinaire (ITU) dans le monde. Pour diagnostiquer une ITU, une culture d'urine est réalisée mais nécessite un long délai. Pendant ce temps les patients sont souvent traités avec un antibiotique à large spectre qui peut entraîner des complications et contribuer à l'augmentation du nombre de bactéries résistantes. La plupart des échantillons reçus au laboratoire sont négatifs ($\leq 10^5$ ufc /mL) ou contiennent *Escherichia coli*. Nous avons mis au point une méthode de dépistage rapide des échantillons positifs afin de sauver des coûts et éviter des complications.

D'abord un protocole d'extraction d'ADNg a été élaboré avec la même efficacité pour tous les microorganismes. Cette méthode, appelé EtNa, chauffe le microorganisme dans une solution de 70 % éthanol et NaOH. Cette solution permet l'adsorption de l'ADN directement sur une colonne de silice afin de favoriser sa purification par un robot pipeteur. Elle a été comparée favorablement avec d'autres méthodes retrouvées dans la littérature et trousse commerciales, mais a l'avantage d'extraire les bactéries Gram positifs, Gram négatifs et levures avec une efficacité similaire et ce, avec un même protocole simple et sans produits chimiques toxiques.

La deuxième étape du projet a été de mettre au point une méthode pour dépister les microorganismes pouvant causer les ITU en utilisant la PCR en temps réel pour amplifier le gène d'ARNr 23S des bactéries et 28S des levures. Grâce à une stratégie innovatrice de dénaturation des sondes, le pathogène peut être détecté et partiellement identifié. Une valeur seuil permettant de distinguer les échantillons positifs a été évaluée et correspond à un C_p de 26 (10^5 ufc/mL). Un témoin interne est utilisé et permet de contrôler l'extraction et l'amplification. La méthode de dépistage a été éprouvée *in vitro* avec des souches de bactéries et levures, puis essayée avec quelques échantillons d'urines en provenance de la clinique. Puisque les résultats obtenus étaient très encourageants, l'analyse d'autres échantillons est importante pour faire une validation complète.

Mots clés : infection urinaire, bactéries, levures, PCR en temps réel, extraction d'ADN, urine, *ARNr 23S*, *ARNr 28S*.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xi
CHAPITRE 1	1
INTRODUCTION	1
1.1 Les infections du tractus urinaires (ITU).....	1
1.1.1 Introduction générale	1
1.1.3 Les pathogènes impliqués dans les infections urinaires et leurs facteurs de virulence	3
1.1.4 La candidurie	4
1.1.5 Les signes et symptômes dues à une infection urinaire.....	5
1.1.6 La bactériurie asymptomatique (BA).....	6
1.1.7 Les causes et facteurs de risqué de la BA.....	7
1.1.8 Les infections urinaires en chiffre.....	8
1.1.9 Méthodes actuelles du diagnostic des infections du tractus urinaire.....	9
1.1.10 Quelques automates présents sur le marché pour l'analyse des urines	12
1.1.11 La prise en charge	13
1.2 Techniques de détection des microorganismes.....	15
1.2.1 Réaction d'amplification en chaine par polymérase (PCR)	15
1.2.2 Les stratégies de quantification.....	18
1.2.3 Modes de détection	19
1.2.4 PCR multiplexe.....	21
1.2.5 Les techniques post-PCR.....	22
1.3 L'extraction d'ADN génomique	31
1.3.1 Les grandes étapes de l'extraction	31
1.3.2 Les protocoles d'extraction d'ADN les plus utilisés dans les laboratoires.....	33
1.3.3 Diagnostic des infections urinaires par méthodes moléculaires: recension des écrits	35

OBJECTIFS DU PROJECT	40
CHAPITRE 2	41
Article 1: A single protocol for extraction of gDNA from bacteria and yeast	41
2.1 Abstract	42
2.2 Introduction.....	42
2.3 Materials and methods	44
2.3.1 Bacterial Strains and Culturing Condition	44
2.3.2 Extraction Procedures	44
2.4 Results and discussion	47
2.5 Conclusion	52
2.6 Acknowledgments	53
References.....	54
Supplementary material	56
CHAPITRE 3	59
Article 2 Dépistage semi-quantitatif des bactéries et levures uropathogènes possibles par une seule réaction PCR en Temps réel.....	59
3.1 Résumé.....	60
3.2 Introduction.....	60
3.3 Matériel et méthode	62
3.3.1 Microorganismes	62
3.3.4 Conditions de PCR en temps réel	64
3.3.5 Témoin interne.....	65
3.4 Résultats.....	65
3.4.1 Température d'hybridation (T_m)	66
3.4.2 Valeur pour laquelle la bactériurie est significative.....	66
3.4.3 Essais <i>in vitro</i>	68
3.4.4 Essais sur des échantillons cliniques.....	69
3.5 Discussion.....	71
3.6 Remerciements.....	75
Références.....	76
CHAPITRE 4	79

Discussion	79
4.1 Mise au point d'une méthode d'extraction universelle	79
4.1.1 Purification de l'ADNg	82
4.1.2 Tampon de solubilisation de l'ADNg	83
4.1.3 EtNa extraction d'ADNg universelle	84
4.1.4 Une méthode d'extraction simple basée sur le PEG pour extraire rapidement l'ADNg des bactéries Gram + et Gram -	85
4.1.2 Une PCR en temps réel détectant et distinguant bactéries Gram positifs, Gram négatifs et levures.....	86
4.1.3 Courbe Étalon: valeur seuil	88
4.1.4 Témoin interne.....	89
4.1.5 Application du système à des échantillons cliniques	89
CHAPITRE 5	90
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	90
RÉFÉRENCES.....	92
ANNEXES	106

LISTE DES FIGURES

Article 1 : A single protocol for extraction of gDNA from bacteria and yeast.

Figure 1 Extraction efficiency of microorganisms at different concentrations.48

Figure 2 Effect of EDTA on silica column extraction.49

Figure S1 PCR efficiency. The PCR efficiency and amplification factor were measured according to Thermo Scientific guidelines56

Figure S2 Extraction efficiency of buffers with different detergents57

Article 2 : Dépistage semi-quantitatif des bactéries et levures uropathogènes possibles par une seule réaction PCR en Temps réel

Figure 1 Efficacité de l'extraction des micro-organismes à des concentrations différentes 67

Figure 2 Courbes de C_p et T_m obtenues avec le système de dépistage des ITU mis au point au laboratoire69

Figure 3 Distribution des 15 échantillons cliniques en fonction des différents tests.....70

Figure 4 Répartition des échantillons en fonction des C_p obtenus.....71

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Signes et symptômes accompagnant les infections du tractus urinaire	6
Tableau 2 Comparaison de deux automates permettant le dépistage des infections du tractus urinaire	13
Tableau 3 Comparaison de la technique standard pour la caractérisation des bactéries: la coloration de Gram vs le MALDI-TOF.....	28
 Article 1: A single protocol for extraction of gDNA from bacteria and yeast.	
Tableau 1 Microbial DNA extraction using different concentration of NaOH.....	47
Tableau 2 gDNA extraction efficacy of EtNa	50
Tableau 3 Comparison of gDNA extraction methods by real time PCR.....	51
Tableau S1 Increased Tris-HCl concentration in solution buffer prevent PCR inhibition by inadvertent addition of EtNa solution.....	58
 Article 2: Dépistage semi-quantitatif des bactéries et levures uropathogènes possibles par une seule réaction PCR en Temps réel	
Tableau 1 Liste des amorces universelles utilisées pour le dépistage des micro-organismes responsables des infections du tractus urinaires	65
Tableau 2 Liste des sondes utilisées pour le dépistage des micro-organismes responsables des infections urinaires	65
Tableau 3 Prédiction des T_{ms} pour les différents micro-organismes pouvant être à l'origine d'une infection du tractus urinaire en fonction des différentes	67
Tableau 4 Comparaison des températures d'hybridation obtenues pour les différentes sondes avec les températures calculées	69

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNg	Acide désoxyribonucléique génomique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
BA	Bactériurie asymptomatique
BET	Bromure d'éthidium
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
CFU	<i>Colony forming unit</i>
CHUS	Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke
Cp	<i>Crossing point</i>
ddNTP	Didésoxyribonucléotide
dNTP	Désoxyribonucléotide
ECBU	Examen cytobactériologique des urines
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
EST	<i>Expressed Sequence Tags</i>
EtOH	Éthanol
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
HEG	Hexéthylène glycol
IST	Infection sexuellement transmissible
ITU	Infection du tractus urinaire
LB	<i>Lysogeny broth</i>
MADO	Maladies à déclaration obligatoire
NB	<i>Nutrient broth</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
pb	Paires de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	Polyéthylène glycol
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
SARM	<i>S. aureus</i> résistant à la méthicilline
SGB	Streptocoque du groupe B
T _M	<i>melting temperature</i>
ufc	Unité formant des colonies
UPEC	<i>Uropathogenic Escherichia coli</i>

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 LES INFECTIONS DU TRACTUS URINAIRES (ITU)

1.1.1 Introduction générale

Les infections urinaires sont répertoriées depuis le XVI^e siècle avant notre ère dans le papyrus d'Ebers, l'un des plus anciens traités médicaux qui nous soit parvenu. Elles ont été décrites par les Égyptiens comme étant une source de chaleur dans la vessie. À cette époque, les traitements recommandés étaient des décoctions d'herbe, des saignées et du repos. Des traitements efficaces ont fait leurs apparitions en 1930 avec la découverte des antibiotiques. Sont rassemblées sous le terme d'infections urinaires, les infections qui touchent une ou plusieurs parties du système urinaire qui comprend l'urètre, la vessie et les reins. L'infection urinaire est due à la colonisation du tractus urinaire par des agents infectieux menant à une réponse inflammatoire de l'urothélium. Le diagnostic des ITU est basé sur trois critères : (i) les symptômes cliniques, (ii) la détection d'un signe d'une infection urinaire, (iii) la détection et l'identification de microorganismes dans l'urine (Bent & Saint, 2002). Les ITU touchent toute la population sans exception, cependant les femmes restent les plus à risque compte tenu de leur configuration anatomique et sont touchées quatre fois plus que les hommes (Stapleton *et al.*, 2012). Les ITU font parties des infections bactériennes les plus communes aussi bien en communauté qu'en milieu hospitalier (Nicolle, 2008). Le protocole de référence pour le dépistage des infections urinaires est la culture d'urine (Broeren *et al.*, 2011). La culture d'urine donne les renseignements sur la présence ou non d'une bactériurie significative ainsi que l'identification du pathogène en cause et permet également dans certains cas, de déterminer une susceptibilité aux antibiotiques. Le point faible de ce test est la durée de l'obtention des résultats qui est de 2-3 jours (Broeren *et al.*, 2011).

Afin de soulager les patients, il est souvent prescrit une antibiothérapie empirique dans l'attente des résultats.

Par conséquent, la mise au point d'un système rapide automatisé de l'analyse des urines, permettrait de déterminer dans la même journée la présence ou non d'une bactériurie significative, ainsi que l'identification du pathogène impliqué. Un tel système permettrait également d'éviter la culture d'urine pour beaucoup d'échantillons négatifs et dans certains cas éviterait la prescription d'antibiotiques à des patients qui n'en n'ont pas besoin.

1.1.2 Les différents types d'infections urinaires

En fonction de la partie du tractus urinaire touchée nous distinguons trois types d'infections urinaires :

- La cystite, correspondant à une inflammation de la vessie due à la présence de germes. La plupart du temps, l'inflammation est provoquée par la prolifération de bactéries intestinales (Heytens *et al.*, 2011) qui gagnent d'abord le périnée puis remontent par voie ascendante jusqu'à la vessie. La cystite est de loin la forme la plus courante et touche particulièrement les femmes entre 20 et 50 ans étant donné la proximité du vagin et de l'anus ainsi que la faible longueur de l'urètre. Toutefois, les hommes peuvent également être touchés par une cystite due généralement à une prostatite. La prostate augmente de taille avec l'âge, diminuant l'efficacité de la vidange vésicale. De ce fait les hommes de plus de 50 ans seront plus à risques que les hommes plus jeunes. Chez l'enfant, les cystites sont souvent dues à des anomalies des voies urinaires. La cystite s'accompagne fréquemment de symptômes d'inflammation de l'urètre et peut alors être confondue avec une urétrite (Bruyere *et al.*, 2008; Heytens *et al.*, 2011).

- L'urétrite est une infection sexuellement transmissible (IST) courante chez les hommes, mais les femmes peuvent également en souffrir. Différents agents

infectieux peuvent causer l'urétrite. Les plus communs sont *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* (Leung *et al.*, 2002).

- La pyélonéphrite est un état plus grave, elle désigne l'infection bactérienne des voies urinaires hautes, le bassinet et le parenchyme rénal. Elle est généralement due à la complication d'une cystite non ou mal traitée entraînant la prolifération des bactéries de la vessie vers les reins. La pyélonéphrite peut aussi être causée par une obstruction des voies urinaires due à une tumeur de la vessie, un rétrécissement de l'urètre, une hyperplasie bénigne de la prostate, un syndrome de la veine ovarique chez la femme enceinte ou des calculs urinaires. Dans 3 % des cas, une septicémie peut atteindre et infecter le rein. Cependant elles sont 20 à 30 fois plus rares que les cystites (Ragnarsdottir & Svanborg, 2012).

Les ITU peuvent aussi être asymptomatiques (Beerepoot *et al.*, 2012), ce qui complique les traitements. Elles se traduisent par la présence de microorganismes dans l'arbre urinaire, sans signes cliniques. Une ITU est dite récurrente s'il y a rechute après l'arrêt du traitement, ou qu'il survient plus de trois infections urinaires par année (Beerepoot *et al.*, 2012). Elles peuvent être également dues à des malformations anatomiques, des maladies des reins ou de la vessie ou le port d'une sonde urétrale.

1.1.3 Les pathogènes impliqués dans les infections urinaires et leurs facteurs de virulence

Il faut noter qu'en temps normal, l'arbre urinaire est stérile (Norden *et al.*, 1968), (Chromek *et al.*, 2006) à l'exception de l'urètre distal qui est colonisé par une flore peu abondante, soit environ 10^2 unités formant des colonies/mL (ufc/mL) pour une urine prélevée au premier jet. La flore urétrale ou encore périnéale est composée de germes digestifs telles que les entérobactéries, entérocoques, les germes cutanés tels que les staphylocoques à coagulase négative et la flore génitale *Lactobacillus* chez la femme. Les infections urinaires sont dues aux bactéries présentes dans la flore normale intestinale.

Dans 75 % des cas, elles sont causées par *Escherichia coli* uropathogène (UPEC) qui est un colibacille Gram négatif, parfois encapsulé (Ronald, 2003). L'étude des antigènes de surface, c'est-à-dire des antigènes somatiques O de la paroi, des antigènes flagellaires H et éventuellement des antigènes capsulaires k permet de définir différents types sérologiques ayant un intérêt épidémiologique. Les UPEC possèdent aussi des antigènes d'adhésion (fimbrae) appartenant aux facteurs de virulence de la bactérie. Il a été suggéré récemment que les infections urinaires récurrentes peuvent être causées par *E. coli* qui résiderait dans une forme latente, ayant les mêmes propriétés qu'un biofilm dans la vessie (Anderson *et al.*, 2010; Wasfi *et al.*, 2012). La formation de biofilm par *E. coli* uropathogène a été démontrée *in vitro* et corrèle avec la présence de facteurs de virulences des souches UPEC tels que les allèles papC et papG ainsi que sfa/focDE (Naves *et al.*, 2008).

Les infections urinaires peuvent être causées également par *Proteus mirabilis* (Chen *et al.*, 2012) ou *Klebsiella sp* (Lin *et al.*, 2010) qui sont toutes, comme *E. coli*, des entérobactéries bacilles Gram négatif. À cette liste non s'ajoutent des cocci à Gram positif, tel que *Staphylococcus saprophyticus* (Hovelius & Mardh, 1984) ainsi que plusieurs autres bactéries beaucoup plus rares selon les pays.

Dans certains cas d'infections urinaires, l'agent pathogène est la levure, on parle alors de candidurie. (Kim *et al.*, 2011; Fisher *et al.*, 2011).

1.1.4 La candidurie

La candidurie est la présence de *Candida spp* dans les urines, généralement démontrée par leur l'isolement d'un échantillon. Elle est surtout fréquente en milieu hospitalier (Fisher *et al.*, 2011). Les facteurs de risque habituellement identifiés sont la présence d'un cathéter urinaire, le diabète ou la prise récente d'une antibiothérapie. L'âge avancé, le sexe féminin, l'hémopathie ou un traitement immunosuppresseur sont aussi associés à la candidurie. Si *Candida albicans* est l'espèce la plus fréquemment mise en évidence (jusqu'à 60% des isolats), d'autres espèces, en particulier *C. tropicalis* et *C. glabrata* représentent une part croissante des épisodes de candidurie et peuvent poser des

problèmes de prise en charge thérapeutique (Sahiner *et al.*, 2011). A la différence des infections urinaires bactériennes dont l'origine est le plus souvent par voie ascendante, les infections urinaires à *Candida* semblent être aussi bien d'origine hématogène qu'ascendante. Seulement 4 à 14% des patients ayant une candidurie ont des symptômes d'infection urinaire (Gonzalez-Pedraza Aviles *et al.*, 2006). La formation par certaines espèces de pseudo-filaments peut entraîner la constitution de « fungus ball », responsable d'une obstruction des voies urinaires.

Contrairement aux infections urinaires bactériennes, il n'existe aucun référentiel pour le diagnostic des infections urinaires candidosiques. Il est donc nécessaire d'interpréter les résultats biologiques en fonction de la situation clinique pour distinguer la contamination de la colonisation ou de l'infection.

La prise en charge des candiduries est très hétérogène (Savas *et al.*, 2006). Chez le sujet sain non sondé, la candidurie asymptomatique disparaît spontanément. Chez le patient sondé, l'ablation de la sonde permet la résolution de la candidurie près d'une fois sur deux. Il est recommandé de ne pas traiter ces patients sauf en cas de neutropénie, chez les nouveau-nés de faible poids, les patients greffés rénaux ou les patients qui doivent subir un geste sur les voies urinaires (Krcmery *et al.*, 1999). L'ablation des cathéters urinaires, lorsqu'elle est possible, ou leur remplacement, est la première étape de la prise en charge.

1.1.5 Les signes et symptômes dues à une infection urinaire

Les symptômes d'une infection urinaire vont dépendre de la localisation et de la gravité de l'infection. Le plus souvent, les manifestations cliniques sont : la douleur, une sensation de brûlure au moment d'uriner (dysurie), une urine trouble et/ou un besoin quasi continu d'uriner même lorsque la vessie est vide (Beerepoot *et al.*, 2012). Les principaux symptômes des différents types d'ITU sont synthétisés dans le tableau 1.

**TABLEAU 1 SIGNES ET SYMPTÔMES ACCOMPAGNANT LES INFECTIONS
DU TRACTUS URINAIRE**

SYNDROME	SIGNES ET SYMPTÔMES
Bactériurie asymptomatique	Aucuns
Cystite	Fréquence, urgence, dysurie, pression supra-pubienne moins fréquente, malaises, nycturie, incontinence.
Pyélonéphrite	Fièvre, urgence, dysurie, douleurs dorsales, frissons, malaise, nausées, vomissements, douleur abdominale, perte d'appétit.
ITU en présence de cathéters	Fièvre, frissons, malaises, Léthargie avec aucune autre cause identifiée, état mental altéré, hématurie sévère, inconfort pelvien.

1.1.6 La bactériurie asymptomatique (BA)

L'arbre urinaire étant normalement stérile à l'exception de l'urètre distal, la présence de germes dans l'urine est par définition une bactériurie (Cai *et al.*, 2012). Le terme BA est utilisé lorsqu'il y a présence de germes dans l'urine et absence de signes cliniques probants. Les BA sont fréquentes mais le plus souvent bénignes. Elles touchent le plus souvent les femmes enceintes, les personnes atteintes de diabète, les personnes âgées et les personnes possédant des cathéters vésicaux. Cependant les personnes moins à risques ne sont jamais testées. L'incidence des BA est de 3,5% et celle-ci augmente avec l'âge aussi bien chez les hommes que chez les femmes (Nicolle, 2009).

Même si elle est souvent silencieuse, la BA doit être dépistée et traitée dans certains cas. Chez les femmes enceintes dont la prévalence est de 2 à 20%, la BA peut conduire à une infection rénale (pyélonéphrite) (Kazemier *et al.*, 2012) chez la mère et peut contribuer

à la naissance de nouveau-nés de faible poids et à 20% d'accouchements prématurés (Lavigne *et al.*, 2011).

1.1.7 Les causes et facteurs de risqué de la BA

L'urine est un bon milieu de croissance pour plusieurs microorganismes. En temps normal, la vidange de la vessie est un moyen de défense naturel pour l'organisme contre la colonisation du tractus urinaire. Cependant, plusieurs facteurs favorisent la survenue des infections urinaires et leurs récives (El-Hefnawy *et al.*, 2011).

Chez les femmes, les ITU sont reliées à une faible consommation de liquide conduisant à une mauvaise vidange de la vessie, un manque de boissons, une mauvaise hygiène génitale (comme s'essuyer vers l'avant après avoir été à la selle) contaminant ainsi le méat urinaire par des bactéries (Lowe & Ryan-Wenger, 2012). Puisque le méat urinaire et l'anus sont proches, l'urètre est directement exposé à la flore périnéale. L'urètre est plus courte et plus large ce qui facilite le passage des germes des voies digestives et des voies génitales vers les voies urinaires hautes.

Les relations sexuelles sont aussi responsables d'un bon nombre d'ITU, ce phénomène est décrit comme étant la « cystite de la lune de miel ». Les rapports sexuels entraînent une ouverture de l'urètre ce qui facilite l'entrée des germes du vagin vers les voies urinaires. La pression exercée sur le pubis peut aussi créer un appel de liquides vers la vessie. La grossesse entraîne plusieurs modifications tant sur le plan anatomique que sur le plan physiologique, ce qui rend les femmes enceintes plus à risques. En effet, lors de la grossesse, le volume de l'utérus augmente et entraîne une compression des voies urinaires provoquant une stase physiologique qui conduit à une diminution des défenses immunitaires des voies urinaires (Chenoweth & Saint, 2011; Weissenbacher & Reisenberger, 1993). Les problèmes gynécologiques tels que les syndromes prémenstruels, la vaginite et la ménopause sont autant de facteurs qui peuvent favoriser les cystites. Chez les hommes de 50 ans et plus, la cause la plus fréquente est la présence d'une hypertrophie de la prostate ou adénome prostatique qui comprime l'urètre et engendre une stase de

l'urine dans la vessie. L'inflammation fréquente de la prostate, la prostatite et une mauvaise vidange de la vessie sont responsables de stases de l'urine qui sont propices au développement des germes. Tous les obstacles à l'écoulement de l'urine sont des facteurs d'infection (van Vuuren *et al.*, 2012) à tout âge et pour les deux sexes. Les perturbations digestives telle que la constipation sont d'autres facteurs favorisant, puisque la stagnation prolongée de matières fécales dans le rectum est une source permanente d'infection (Fallahzadeh & Ghane, 2006).

1.1.8 Les infections urinaires en chiffre

Les infections du tractus urinaire sont considérées comme étant l'infection bactérienne la plus commune. Elles touchent 175 millions de personnes dans le monde (Russo & Johnson, 2003). Aux États-Unis, le coût relié aux infections urinaires s'estime à 3 milliards de dollars par année (Litwin *et al.*, 2005). Environ 8 millions d'ITU sont acquises en communauté chaque année et 80% d'entre elles sont causées par UPEC (Enderle *et al.*, 2013). Parmi les Gram positifs, les *Staphylococcus (S. saprophyticus)* sont responsable de 10 à 15% des ITU. Il faut noter que *S. saprophyticus* et UPEC coexistent souvent durant une bactériurie et engendrent des symptômes similaires. Les ITU représentaient 10,5 millions de visites en soins ambulatoires en 2007 aux États-Unis, soit 0,9% de toutes les visites ambulatoires. Près de 1/5 de ces visites ont eu lieu aux urgences (Schappert & Rechtsteiner, 2011). Cependant il est difficile de connaître l'incidence des ITU, dû au fait qu'elles ne sont pas à déclaration obligatoire. De plus, il est compliqué de diagnostiquer une ITU, puisqu'il faut à la fois la présence de symptômes et une culture positive de l'urine. L'ITU associée aux cathéters est l'infection nosocomiale la plus commune. Plus d'un million de cas sont répertoriés dans les hôpitaux chaque année, et le risque augmente avec la prolongation du port de la sonde. Le tractus urinaire est le second site d'infection nosocomiale après le tractus respiratoire. Dans la population vieillissante, l'ITU est la seconde forme d'infection la plus courante (Foxman, 2002). Le nombre d'épisodes d'infections urinaires est plus élevé entre 16 et 35 ans. 50 à 60% des femmes adultes ont déjà connu un épisode d'infection urinaire. Parmi celles-ci, 50% des cystites diagnostiquées sont attribuables aux relations sexuelles, 10% des femmes vont avoir une ITU chaque

année et 60% des femmes connaîtront une ITU au cours de leur vie. Les infections urinaires asymptomatiques augmentent avec l'âge de 2 à 7% (Foxman, 2010).

1.1.9 Méthodes actuelles du diagnostic des infections du tractus urinaire

Plusieurs méthodes ont été développées pour le diagnostic des ITU. Les méthodes les plus fréquemment utilisées sont décrites dans les sections suivantes

BANDELETTES RÉACTIVES DE DÉPISTAGE

Grâce à leur facilité d'emploi et à leur sensibilité, les bandelettes réactives de dépistage constituent un moyen unique de révéler de nombreuses maladies comme les maladies du rein, le diabète, les maladies du foie, les maladies hémolytiques et également les infections urinaires. Une bandelette urinaire est une tige en plastique sur laquelle sont fixées des plages réactives de chimie sèche, qui doit être trempée dans l'urine (Antwi *et al.*, 2008). La présence d'un paramètre positif au sein de l'urine se révèle par une modification de la couleur de la plage réactive. Les bandelettes sont lues à l'œil nu ou avec un lecteur qui lit et imprime automatiquement les résultats. Ces résultats sont semi-quantitatifs et sont exprimés en négatif ou positif ou en valeur d'échelle. Les paramètres lus sont divers et variés et indiquent la présence de leucocytes, de nitrites, de protéines, de sang, de corps cétoniques, de glucose, de bilirubine et d'urobilinogène. Ils indiquent également le pH et la densité. C'est surtout les plages de nitrites et de leucocytes qui sont utiles dans le diagnostic d'une infection urinaire. La détection des leucocytes dans l'urine se fait par le dosage de l'enzyme leucocyte estérase produite par les neutrophiles polynucléaires. La présence des nitrites témoigne d'une bactériurie et est due à la transformation des nitrates en nitrites par les bactéries possédant un nitrate réductase, telles que les entérobactéries. Un pH anormalement élevé, d'une protéinurie, certains métabolites ou de la vitamine C peuvent conduire à de faux négatifs (Winstock, 2009).

EXAMEN CYTOBACTÉRIOLOGIQUE DES URINES (ECBU)

L'examen cyto bactériologique des urines est un examen visant à rechercher la présence de cellules telles que les hématies ou les globules blancs, ainsi que la présence ou non de germes et de cristaux dans l'urine (Ducharme *et al.*, 2007). Cet examen est prescrit lorsqu'une infection urinaire est suspectée suite à des résultats positifs pour les nitrites et/ou les leucocytes obtenus avec le test par bandelettes. Cet examen va permettre de démontrer la présence ou non d'une infection du système urinaire et de déterminer la bactérie responsable après la mise en culture. Après avoir caractérisé la bactérie en cause, un antibiogramme permettra aux médecins de prescrire le meilleur antibiotique possible pour éradiquer le pathogène.

Les prélèvements urinaires pour la réalisation de l'ECBU sont idéalement réalisés le matin lors de la première miction, car la quantité de bactéries fluctue au fil de la journée selon le rythme d'évacuation de l'urine. Le matin est généralement le moment où la charge bactérienne est la plus importante, ce qui facilitera leur mise en culture. Dans le cas où ce ne serait pas possible, le prélèvement doit être fait au moins quatre heures après une miction pour permettre un temps de stase suffisant dans la vessie. L'objectif étant de recueillir l'urine vésicale, normalement stérile, en évitant sa contamination lors de la miction par la flore commensale qui colonise l'urètre et la région périnéale. Après une toilette soignée des organes génitaux externes, en écartant les grandes lèvres chez la femme et en rétractant le prépuce chez l'homme pour éviter la contamination, environ 50 mL d'urine sont recueillis en mi-jet suite à un premier jet d'environ 20 mL. Le prélèvement doit être fait avant toute prise d'antibiotique (Heytens *et al.*, 2011). Les conditions de transport et de conservation de l'urine doivent être adaptées pour éviter la multiplication des bactéries pouvant fausser l'interprétation (Jefferson *et al.*, 1975). Les urines ne peuvent pas être conservées plus de deux heures avant analyse à température ambiante, mais elles peuvent être conservées jusqu'à 24 h à + 4°C ou 48 h dans des milieux de transport stabilisateurs contenant de l'acide borique.

INTERPRÉTATION DES ECBU

Les prélèvements nécessitent plusieurs jours d'analyse avant d'obtenir les résultats complets. L'échantillon peut être observé directement au microscope avec ou sans coloration de Gram. Ceci permet de noter la présence de germes lorsqu'ils sont en quantité suffisante pour être vus, soit de l'ordre de 10^6 bactéries/mL (Caron & Humbert, 1992) et également de faire une cytologie qui permet d'évaluer les différentes cellules présentes. L'urine est ensuite mise en culture pendant 16 à 24 h pour permettre une énumération des germes. L'identification bactérienne et éventuellement un antibiogramme seront réalisés sur des colonies bactériennes isolées. Habituellement il faut compter 24 h pour l'identification et pour l'antibiogramme, soit un total de 48 h. Les résultats présentent l'énumération des hématies et des leucocytes en nombre/mm³, ainsi que la présence ou non de cristaux et de germes qui peuvent être quantifiés.

La cytotactériologie des urines normales ne comporte que quelques hématies ou leucocytes et moins de 100 bactéries/mL. La présence de germes indique une bactériurie. Une infection urinaire est diagnostiquée si la bactériurie est significative. C'est-à-dire lorsque la présence de bactéries dans l'urine ne peut être due à une contamination bactérienne lors du prélèvement de l'échantillon urinaire. Le seuil d'une bactériurie significative est classiquement 10^5 bactéries/mL (Nicolle *et al.*, 2005). Cependant ce seuil varie en fonction de l'infection urinaire considérée et surtout du mode de prélèvement, de l'âge et du statut immunitaire du patient. Une cystite aigüe, le nombre de bactéries doit être supérieur à 10^3 bactéries/mL et pour une pyélonéphrite aigüe, il doit être supérieur à 10^4 bactéries/mL.

Pour les bactériuries asymptomatiques chez la femme, l'analyse a lieu deux fois car le risque de contamination de l'urine lors du prélèvement est plus élevé que chez l'homme. Il doit y avoir plus de 10^5 bactéries/mL, deux fois, à un intervalle de 24 h. Chez l'homme le nombre doit être supérieur à 10^4 bactéries/mL. Chez les patients hospitalisés ayant une sonde urinaire, le seuil considéré est de 10^2 bactéries/mL d'urine (Andreu *et al.*, 2011; El-Hefnawy *et al.*, 2011; Nys *et al.*, 2006).

1.1.10 Quelques automates présents sur le marché pour l'analyse des urines

Le système UF-1000i (SySmex, Kobe, Japon) est basé sur la technologie de cytométrie en flux permettant l'analyse des urines. Ce système utilise un algorithme qui permet la détection quantitative des bactéries et des leucocytes en simultané, directement sur un échantillon d'urine. L'UF-1000i utilise des fluorochromes différents pour chaque élément pouvant être présents dans l'urine. De ce fait, chaque classe d'éléments produit un signal différent. Ce système est capable de faire l'analyse de 100 échantillons/heure (Lun *et al.*, 1999) réduisant d'au moins un jour le temps d'analyse. Il permet de déterminer tous les paramètres indicatifs d'une ITU, ce qui permet d'écarter les échantillons négatifs. L'étude de Kim, *et al.* (2007) a montré que le système avait une sensibilité de 81,1% et une spécificité de 83,3% pour une détection seuil de 160 bactéries/ μ L et permettait d'écarter 54,9% des échantillons qui sont négatifs avec 10 % de faux-négatifs. Cependant, UF-1000i n'est pas aussi efficace pour le dépistage des ITU causées par les levures; la sensibilité de détection est de 42,9% (Marschal *et al.*, 2012). De plus, ce système ne permet pas l'identification des micro-organismes en causes, donc la culture d'urine est encore requise pour les échantillons positifs, la culture d'urine et l'identification est encore requise (Kim *et al.*, 2007). Pour analyser 1577 échantillons d'urine, une équipe aux Pays-Bas a estimé un coût de 1821,90 \$. L'analyse de ces échantillons avait durée 158 minutes (Broeren *et al.*, 2011).

Un autre système, basé sur la propriété de la diffusion de la lumière par laser néphélométrie, Uro-Quick (Alifax, Padove, Italie) est capable de détecter l'activité de réplication des bactéries à partir d'un échantillon. La présence de microorganismes cause la déviation de la lumière ce qui donne un signal traduit en courbe de croissance par un logiciel. Ce système permet d'avoir le nombre de bactéries présentes dans l'échantillon en UFC/mL en 3 heures (Dimech & Roney, 2002). La sensibilité de ce système est de 83% et la spécificité est de 95% (Cermak *et al.*, 2009). Le principal avantage de cette méthode est la rapidité d'analyse : 74% des échantillons ayant une forte concentration en micro-organismes sont détectés en 3 heures. Cependant l'efficacité de détection est moindre pour

les échantillons ayant moins de microorganismes (entre 10^3 et $\leq 10^5$ ufc/mL). Tout comme le système UF-1000i, le système Uro-Quick doit être couplé à une méthode d'identification du microorganisme en cause. De plus, sa sensibilité de détection pour les infections urinaires causées par les levures est de 61,4% (Marschal *et al.*, 2012).

Une équipe Allemande a fait des estimations de ces systèmes sur l'économie de temps et d'argent, ainsi que sur le pourcentage de faux-négatifs écartés. L'étude a été basée sur l'analyse de 945 échantillons par le système Uro-Quick et 513 par le système UF-1000i. Les économies possibles ont été calculées sur le pourcentage d'échantillons d'urine négatifs pour lesquels il n'y aura pas de culture d'urine. L'économie d'argent est calculé pour 12 000 tests par année avec un coût de 1\$ par test et l'économie de temps est basée sur le fait qu'une culture d'urine dure environ 1,89 jours tandis que le temps requis pour l'UroQuick est de 4 heures et de 2 heures pour UF-1000i (Marschal *et al.*, 2012).

TABLEAU 2 COMPARAISON DE DEUX AUTOMATES PERMETTANT LE DÉPISTAGE DES ITU

	Économie d'argent par année pour 12 000 tests	Économie de temps par test (en jours)	Faux-négatifs
UF-1000i	\$8372	0,81	32/513 (6,2%)
UroQuick	\$9606	0,94	96/945 (10,1%)

1.1.11 La prise en charge

Comme pour beaucoup de maladies infectieuses, le traitement des infections urinaires se fait à l'aide d'antibiotiques. Cependant, l'intensité et la longueur du traitement vont varier selon la nature du germe responsable. En cas de cystites dues à *E. coli*, une grande variété d'antibiotiques peut être utilisée: l'amoxicilline qui est un antibiotique β -lactamine bactéricide de la famille des aminopénicillines, les nitrofurantoïnes, le sulfaméthoxazole,

les quinolones et la triméthoprine (Denes *et al.*, 2012; Wagenlehner *et al.*, 2011). Le choix de l'antibiotique est très souvent réalisé à partir des résultats d'analyse de laboratoire, c'est-à-dire un ECBU suivi d'un antibiogramme. Souvent, un antibiotique excrété dans l'urine sous forme active va être privilégié. Il sera ainsi concentré dans la vessie, site de l'infection. Dans les cas bénins, les symptômes de l'infection vont disparaître en moins de deux jours après le traitement. Si les symptômes persistent, il est nécessaire de revenir en consultation pour adapter un nouveau traitement. Dans le cas de douleurs intenses ou gênantes, des analgésiques peuvent être prescrits. Pour une infection urinaire grave, induisant une infection des reins (la pyélonéphrite), le traitement va faire appel à des doses d'antibiotiques beaucoup plus élevées, prises sous forme de comprimés ou injectées directement en intraveineuse. Le traitement peut être réalisé entièrement à l'hôpital où le patient sera maintenu en observation pendant plusieurs jours. En cas d'infection de la prostate, la prostatite, le traitement est lui aussi plus sévère et peut également avoir lieu à l'hôpital.

L'abus d'antibiotiques des années passées ont laissé des séquelles. Plusieurs bactéries ont développé des résistances aux antibiotiques ce qui rend difficile le traitement (de Lucas Collantes *et al.*, 2012). Dans le cas des infections urinaires, lorsque les bactéries résistent aux antibiotiques elles peuvent provoquer des cystites récidivantes et des prostatites chroniques chez l'homme. Leur traitement par la médecine actuelle n'est pas satisfaisant et la prise en charge doit passer par une remise en question de l'hygiène de vie afin d'espacer les crises ou d'atténuer la gêne.

Dans le cas des candiduries, l'apport des nouvelles molécules ou classes d'antifongiques reste limité. Le traitement antifongique de première intention est le fluconazole *per os* (Boedeker & Kilzer, 2001). Il existe quatre grandes familles d'agents antifongiques: les polyènes (amphotéricine B et dérivés) et les azolés qui agissent sur l'ergostérol de la membrane cellulaire fongique, la 5- fluorocytosine qui agit sur la synthèse protéique ainsi que les échinocandines qui, utilisés depuis peu inhibent la synthèse de la paroi fongique, sont plus efficaces et possèdent un large spectre d'action (Larru & Zaoutis,

2013). En cas de résistance, l'amphotéricine B déoxycholate peut être utilisée en intraveineuse pendant 1 à 7 jours.

1.2 TECHNIQUES DE DÉTECTION DES MICROORGANISMES

Depuis les dernières décennies, les microorganismes sont de plus en plus détectés grâce à des méthodes moléculaires avancées, permettant une identification précise et rapide. Dans les sections suivantes, une revue décrivant les techniques de détection est présentée, avec une emphase sur leurs avantages et limites.

1.2.1 Réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR)

LE PRINCIPE DE LA PCR

La PCR a été inventée en 1985 par Kary Mullis, qui lui a valu le prix Nobel de chimie en 1993 pour cette invention. C'est une technique de biologie moléculaire basée sur l'amplification *in vitro* d'acides nucléiques, qui permet d'amplifier une quantité d'ADN de façon exponentielle (Mullis & Faloona, 1987) À partir d'une copie d'ADN il est possible d'obtenir au bout d'un certain nombre de cycles d'amplification, plusieurs milliards de copies identiques. Pour ce faire, il est nécessaire d'avoir des oligonucléotides de 20 à 25 nucléotides appelés amorces, souvent au nombre de deux (sens et anti-sens), des désoxyribonucléotides (dNTPs), un mélange d'ions (Mg^{2+} , Na^+) et une *Taq* polymérase (Mullis & Faloona, 1987) La *Taq* polymérase est une ADN polymérase thermostable isolée de la bactérie *Thermus aquaticus*. Son activation nécessite un traitement à la chaleur allant de 30 secondes à 10 minutes à 95°C (Ishmael & Stellato, 2008). Cette étape permet aussi et surtout de dénaturer l'ADN. Le temps requis est fonction du poids moléculaire et du pourcentage en guanine et cytosine de l'acide nucléique utilisé. Chaque cycle de la PCR est composé de trois étapes : 1) la dénaturation de l'ADN par la chaleur qui permet la séparation des deux brins qui le composent, 2) l'hybridation des amorces de part et d'autre de la séquence cible et 3) une élongation des amorces par l'ADN polymérase faisant intervenir les dNTPs. Ces cycles sont répétés 20 à 50 fois permettant d'avoir une

multiplication exponentielle de la séquence cible (Poitras, 2002). Il existe deux grandes catégories de PCR qui se distinguent par la méthode de détection des produits, la PCR en point final et la PCR en temps réel.

LA PCR EN POINT FINAL

La PCR conventionnelle ou en point final, est la première à avoir été créée (Mullis & Faloona, 1987). Les produits de PCR obtenus sont séparés sur un gel d'électrophorèse en fonction de leur taille et sont détectés grâce à un colorant qui devient fluorescent lorsqu'intercalé dans l'ADN double brin, comme le bromure d'éthidium ou le GelRed®. C'est une PCR semi-quantitative basée sur l'intensité de la fluorescence des bandes pour déduire la quantité de matériel amplifié (Wong & Medrano, 2005; Valasek & Repa, 2005). La quantification de l'ADN est souvent importante. D'autres techniques de la biologie moléculaire permettent de confirmer l'identité de l'ADN amplifié tel que le « Southern Blot ». Cependant, ces méthodes sont difficiles, longues à mettre en place et manquent de sensibilité.

LA PCR EN TEMPS RÉEL

La PCR en temps réel utilise les principes de bases de la PCR en point final pour amplifier l'ADN, mais mesure la quantité d'ADN produit à chaque cycle de la réaction et non pas à la fin. L'utilisation du terme « en temps réel » signifie en même temps que l'amplification. Russel Higuchi fut l'un des premiers à faire l'analyse des cinétiques de la PCR en utilisant le bromure d'éthidium comme agent intercalant (Higuchi *et al.*, 1992). À chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à ce marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Aux premiers cycles, la quantité d'ADN est sous le seuil de détection. Suite à un nombre suffisant de cycles, il y a assez d'ADN produit pour donner une mesure de fluorescence plus grande que le bruit de fond. Le cycle où l'ADN devient détectable est appelé en anglais « Cycle Threshold » (ou Ct) ou parfois Cp pour « Crossing point » ou point de croisement. Ceci permet d'obtenir la quantification de l'ADN. Le Ct représente le

nombre de cycles nécessaires pour doubler la quantité d'ADN avant d'arriver à une quantité détectable. Plus il y a de matériel nucléaire au départ de la PCR, moins élevé sera le nombre de cycles requis pour atteindre un point où le signal d'émission de fluorescence sera plus élevé que le bruit de fond (Gibson *et al.*, 1996). La valeur du C_p peut être traduite en un résultat quantitatif en le comparant avec les valeurs de C_p générées avec des matrices de quantification connue (Bustin, 2000).

REVERSE TRANSCRIPTASE-PCR

Le terme RT-PCR est aussi utilisé pour désigner une PCR incluant l'enzyme reverse transcriptase. Cette technique est utilisée lorsque la matrice de départ est de l'ARN. L'ARN est transcrit en ADN complémentaire (ADNc) permettant son amplification par la PCR par la Taq polymérase. Cette technique permet de détecter et éventuellement quantifier les ARN messagers (ARNm) au niveau d'un organe tissu ou d'une cellule. Cette technique est plus sensible que les techniques couramment utilisées en laboratoire telles que le « Northern blot » et la protection à la RNase. L'utilisation de la RT-PCR permet également de construire des banques d'ADNc, ainsi que la construction de sondes d'ADN (Freeman *et al.*, 1999).

COURBE DE FUSION

À l'aide d'agents intercalants la PCR en temps réel permet l'identification spécifique des fragments d'ADN qui ont été amplifiés, en se basant sur leur température de fusion, *melting temperature* (T_m). Cette étape permet aussi de vérifier qu'il n'y ait qu'un seul produit de PCR amplifié. Elle est réalisée en soumettant les amplicons à une température progressant de 55°C à 95°C par palier de $\leq 0,1^\circ\text{C}$ en fonction de l'utilisateur. La mesure de l'intensité de fluorescence se fait en continu. La courbe de fusion représente la chute de fluorescence en fonction de la température.

1.2.2 Les stratégies de quantification

STRATÉGIE QUANTITATIVE

Il existe deux grandes stratégies de quantification : la quantification relative et la quantification absolue. La quantification relative¹ se fait par rapport à un gène de référence qui ne changera pas d'expression en fonction des conditions analysées. Les gènes les plus souvent utilisés sont des gènes dits « de ménage » tels que *rpoB* (codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase), *gapdh* (codant pour la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase), *gst* (codant pour le glutathion-s-transférase) ou le gène de l'actine chez les eucaryotes. Ce sont des gènes considérés comme stables, ils vont compenser d'éventuels biais de PCR qui peuvent provenir de la variation dans la quantité et la qualité des échantillons, le rendement de l'extraction, les erreurs de pipetage et les variations de l'efficacité de la transcriptase inverse.

Dans le cadre de la quantification absolue (Lee *et al.*, 2008), un standard externe est utilisé, permettant de créer une courbe standard à partir de laquelle est calculée la concentration en molécules cibles de l'échantillon. Un témoin interne peut également être utilisé dans ce cas, tel qu'un ARN synthétique ajouté après l'extraction de l'échantillon pour contrôler d'éventuels effets inhibiteurs de la PCR et par conséquent détecter les faux négatifs.

STRATÉGIE SEMI-QUANTITATIVE

Le terme quantification semi-quantitative est utilisé lorsqu'il n'est pas possible de comparer les valeurs observées à des valeurs de références. Dans ce cas, les valeurs de C_p des différents échantillons sont comparées entre elles et classées selon la quantité d'ADN de départ : faible, moyenne ou élevée (Kersh *et al.*, 2013). Ainsi pour apprécier la différence entre deux échantillons, il est nécessaire de se baser sur le principe mathématique exponentiel. La valeur de C_p dépend de l'efficacité de l'amplification.

¹ <http://www.gene-quantification.info/>

Lorsqu'une efficacité maximale d'amplification montre une différence de 3,3 entre deux Cp, cela signifie que l'échantillon qui a le plus petit Cp contenait dix fois plus de matériel de départ que l'autre échantillon ($2^{3,3} = 10$).

La méthode semi-quantitative donne un ordre de grandeur entre différents échantillons et non une valeur précise.

1.2.3 Modes de détection

LES AGENTS INTERCALANTS

Dans le cas d'une PCR en point final, les gels contiennent du bromure d'éthidium (BET) (Waring, 1965; Higuchi *et al.*, 1992), agent intercalant de l'ADN couramment utilisé comme marqueur d'acides nucléiques dans les laboratoires de biologie moléculaire. Lorsque l'ADN est exposé à des rayonnements ultraviolets, il devient fluorescent. Ayant la faculté de se lier à l'ADN, il possède un effet mutagène important, ce qui en fait un agent très nocif pour la santé des utilisateurs. D'autres produits moins nocifs pour la santé, font leur apparition sur le marché tel que le GelRedTM (Biotium,CA) que nous utilisons dans notre laboratoire.

L'agent intercalant le plus utilisé actuellement est le SYBR Green I qui fait parti de la famille des cyanines asymétriques. Cependant son mécanisme de liaison reste encore mal défini. Il se fixe sur tout type d'acides nucléiques double brin permettant ainsi la fluorescence, mais peut aussi se fixer avec moins d'intensité à l'ADN simple brin. Le SYBR Green présente une mutagénicité non nulle mais très inférieure au bromure d'éthidium, tout en étant plus sensible que ce dernier. Le SYBR Green I complexé à l'ADN absorbe les rayons à une λ_{max} de 497 nm et émet à une λ_{max} de 520 nm. Le SYBR Green I, couramment utilisé peut aussi être remplacé par de nouvelles générations de fluorophores liant l'ADN tel que l'EvaGreen® (Biotium, CA) (Karlsen *et al.*, 1995; Kiltie & Ryan, 1997).

LES SONDÉS

Il existe quatre technologies de sondes différentes : (i) TaqMan ou sonde d'hydrolyse, (ii) FRET ou hybridation de 2 sondes, (iii) Molecular Beacons, (iiii) sondes Scorpions.

- Les sondes TaqMan (Shigemura *et al.*, 2005) sont des sondes d'hydrolyse dépendantes de l'activité 5'-3'exonucléasique de la *Taq* polymérase. Elles seront hydrolysées par la *Taq* polymérase si elles sont hybridées à leur séquence cible sur l'amplicon en cours de réplication durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR. Elles possèdent en 5' un fluorochrome émetteur et en 3', ou à l'intérieur de la sonde, un fluorochrome suppresseur. Suite à l'hydrolyse, le fluorochrome émetteur se trouve suffisamment loin du fluorochrome suppresseur et émet un signal qui est proportionnel au nombre de sondes hydrolysées.
- Les sondes FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) (Poitras & Houde, 2002) sont composées de deux sondes qui s'hybrident sur l'amplicon à quelques bases l'une de l'autre. L'une porte en son extrémité 3' un fluorochrome accepteur de la longueur d'onde utilisée pour induire la fluorescence et émet à une longueur d'onde qui est absorbée par le fluorochrome en 5' de la sonde voisine. Cette dernière émet la fluorescence à une longueur d'onde plus élevée qui sera détectée par l'appareil. Les sondes sont choisies avec minutie afin qu'elles s'hybrident sur la cible en étant séparées de moins de dix nucléotides. Les sondes s'hybrident à l'intérieur de l'amplicon formé par les amorces. Elles sont dites « sondes d'hybridation » contrairement aux « sondes d'hydrolyse » TaqMan. Lorsque les sondes ne sont pas hybridées, un transfert d'énergie se fait rarement depuis le fluorochrome donneur vers le fluorochrome accepteur induisant un bruit de fond qui devient un véritable signal lorsque les sondes s'hybrident sur leur cible et le transfert devient efficace.

- Les sondes Beacons (balise moléculaire) (Poitras & Houde, 2002) sont des sondes d'hybridation dont les extrémités sont complémentaires, portant un fluorochrome à chaque extrémité, un émetteur et un suppresseur tout comme pour les sondes Taqman. Étant repliées en épingle à cheveux à l'état libre, elles n'émettent pas de fluorescence en raison de la proximité des deux fluorochromes. Lorsque les sondes sont hybridées, l'éloignement suffisant des deux fluorochromes permet l'émission d'un signal. Tout comme les sondes FRET, les sondes restent intactes en fin de réaction et permettent de faire des courbes de dénaturation.
- Les sondes Scorpions (Poitras & Houde, 2002) est une variante des sondes molecular Beacons avec une structure en épingle à cheveu, un suppresseur de fluorescence suivi d'une molécule d'hexéthylène glycol sur laquelle est fixée une amorce. La une molécule d'hexéthylène glycol (HEG) permet d'éviter la réplification de la sonde par l'ADN polymérase. Le fluorochrome émetteur est porté par l'extrémité 5' de la sonde moléculaire Beacon. L'amorce permet d'intégrer la sonde dans le nouvel amplicon pendant la PCR. La structure en épingle à cheveu est complémentaire aux premières bases de la cible et en s'hybridant avec la cible, le fluorochrome émetteur est éloigné du suppresseur.

1.2.4 PCR multiplexe

La PCR en multiplexe (Chamberlain *et al.*, 1988) permet d'amplifier plusieurs cibles à la fois, avec au moins deux paires d'amorces et ce, en une seule réaction. La mise au point des conditions d'amplifications est un défi puisque les conditions doivent être optimales pour chacune des paires d'amorces étant donné que l'expérience est réalisée dans un seul tube. Le choix du couple d'amorces doit être rigoureux afin de trouver la bonne température d'alignement ainsi qu'une durée d'élongation suffisante. De plus, chaque

produit d'amplification doit avoir une taille peu différente de celle des autres pour obtenir à peu près la même efficacité de PCR, mais la différence doit être suffisante pour qu'ils soient distinguables s'ils sont utilisés sur un gel d'agarose ou des capillaires. La PCR multiplexe peut se faire en point final ou en temps réel. Dans ce dernier cas, les différents produits sont détectés par des sondes différentes. Elle permet cependant la réduction du coût, du temps de la réalisation et de l'analyse des résultats.

1.2.5 Les techniques post-PCR

LES MICRO-PUCES À ADN

Les puces à ADN ou microarray permettent de mesurer la variation d'expression d'un gène entre deux conditions expérimentales (Schena *et al.*, 1995). C'est une micro-surface en verre, silicium ou plastique où sont fixés de nombreuses sondes d'ADNs différents, en rangées, sur laquelle sont hybridées des molécules d'acides nucléiques dénaturés. Bien qu'il existe d'autres méthodes pour ce type d'analyses tel que le Northern blot ou la RT-PCR, l'avancée majeure des puces à ADN a été d'augmenter l'échelle et de permettre l'analyse simultanée de l'ensemble de tous les transcrits d'un génome. Cette technologie a été utilisée (Schena *et al.*, 1995) dans le but de préciser le diagnostic et pronostic des maladies ainsi que l'orientation thérapeutique dans le cas de nombreuses pathologies. La première partie consiste à fabriquer une micro-puce, chaque point correspondant à un gène du génome considéré. L'ADN de ce gène est amplifié par PCR puis déposé au niveau des points sur des surfaces recouvertes de polylysine. Lorsque la goutte, concentrée en ADN, sèche, l'ADN adhère à la surface. Les acides nucléiques fixés sur les puces à ADN sont appelés sondes et peuvent être de l'ADN génomique (ADNg) ou des gènes exprimés (*Expressed Sequence Tags* ou *EST*). Chaque puce peut contenir des milliers de points. Les sondes sont dénaturées et peuvent ainsi s'hybrider avec le brin cible complémentaire. La deuxième étape consiste à extraire l'ARNm de deux lots de cellules à tester (A et B) qui ont été cultivées séparément. Les ARNm sont rétro-transcrits et amplifiés par RT-PCR en ADNc ainsi que marqués par une molécule fluorescente en fonction du lot : Cy3TM vert ou

Cy5TM rouge. Le mélange est déposé dans le(s) puits, puis après rinçage de la surface les résultats sont observables².

Les niveaux d'expression des deux populations de cellules (A et B) sont analysés. S'il existe un brin d'ADN sonde complémentaire d'un brin d'ADNc cible, ils s'hybrident pour former de l'ADN double brin fluorescent. Cette hybridation est compétitive ; plus la concentration d'un ADNc cible est élevée, plus l'intensité sera élevée. Il s'agit toujours de l'observation de niveaux d'expressions relatifs entre deux populations de cellules, ici A et B. Les puits marqués en rouge correspondront aux gènes surexprimés dans la population B par rapport à A, ceux en vert, aux gènes sous-exprimés. Les puits jaunes quant à eux mettent en évidence les gènes dont le niveau d'expression est le même dans les deux populations. Ces étapes font appel à des techniques de traitement de l'image et utilisent des algorithmes mathématiques. Pour chaque spot, le logarithme (r) de l'intensité de fluorescence de la condition pathologique sur l'intensité de la condition de référence est calculée (rapport fluorescence rouge/fluorescence verte). Ce rapport permet de déterminer l'expression différentielle d'un gène dans les deux échantillons biologiques étudiés : $\log_2(r)$. Si $\log_2(r) > 2$ il n'y a pas de surexpression d'un gène dans une population par rapport à l'autre, si $< 0,5$ il y a sous-expression. Les micro-puces à ADN sont actuellement utilisées dans trois types d'applications : (i) la comparaison des profils d'expression génique entre des cellules présentant des phénotypes différents, par exemple la comparaison de cellules issues de tissus sains vs tissus malades, permettant d'identifier les gènes dérégulés dans le cadre de la maladie, (ii) la comparaison des profils d'expression génique au cours du temps, permettant par exemple de comprendre la division cellulaire et enfin, (iii) l'analyse des profils d'expression génique et leurs corrélations permettant de découvrir de nouvelles interactions entre les protéines.

Cette technique présente cependant quelques désavantages : elle est dispendieuse puisqu'elle nécessite du matériel de pointe, le génome entier de l'organisme étudié doit

2

http://books.google.ca/books?id=bpjJZLhJ8tMC&printsec=frontcover&hl=fr&source=gbs_ge_summary_r&ad=0#v=onepage&q&f=false

avoir été séquencé, la fonction des gènes suffisamment connue et la concentration d'ARNm n'est pas nécessairement représentative de l'activité de la protéine correspondante.

Cette technique est également utilisée dans le domaine de la microbiologie et du dépistage des infections (Bednar, 2000; Blader, Manger *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 1999). Une équipe de l'Université de Caroline du Nord a utilisé cette technique pour déterminer le microbiote intestinal des enfants sains. Cette étude a été menée dans le but de faire la comparaison du microbiote chez les jeunes enfants entre 1 et 4 ans et chez l'adulte. Pour se faire, ils ont utilisé des HITChip, des micro-puces phylogénétiques conçues par la compagnie Agilent Technologies® (Palo Alto, CA) sur lesquelles sont fixés plus de 4800 oligonucléotides ciblant les régions V1 et V6 de l'ARN ribosomal (*ARNr*) 16S. Ils ont également utilisé la PCR quantitative pour estimer la proportion de microorganismes présents (Ringel-Kulka *et al.*, 2013). Une autre équipe a mis au point et validé une micro-puce spéciale : la BactoChip, qui permet d'identifier et de quantifier plusieurs bactéries en même temps. Elle permet l'identification de 21 genres bactériens différents (Ballarini *et al.*, 2013).

LE SÉQUENÇAGE

En 1980, Frederick Sanger reçoit un deuxième prix Nobel de chimie pour sa méthode de séquençage qui portera d'ailleurs son nom. Cette avancée a permis la détermination de séquences d'ADN et par conséquent l'identification de leur provenance. Le principe de base consiste à établir la succession de nucléotides qui composent l'ADN. Le séquençage utilise des ADN polymérases capables de synthétiser un brin complémentaire à partir d'un brin matrice grâce à l'ajout de désoxyribonucléotides (dNTP) alternant avec des didésoxyribonucléotides (ddNTP) qui termine les réactions (Sanger, 1981). Si la méthode est ingénieuse elle souffre de beaucoup de limitations : la préparation de l'échantillon d'ADN sans la fragmentation en petit morceaux et l'utilisation simultanée de 4 réactions, une pour chaque nucléotide. L'introduction d'améliorations techniques comme la combinaison des 4 réactions en une et l'automatisation sur des appareils ont permis la séquençage de génomes bactériens complets. (Fleischmann *et al.*, 1995)

LE SÉQUENÇAGE « NEXT GENERATION »

Plusieurs machines ont fait leur apparition sur le marché depuis et ont révolutionné le séquençage. Ces plateformes ont permis la parallélisation des réactions de séquençage, synonyme d'une baisse de coût et d'une grande rapidité. La méthode de Sanger demandait d'abord de générer des brins de différentes tailles d'ADN auxquels étaient associés des fluorophores, ce qui permettait de décoder la séquence. Avec les nouvelles plateformes, l'ADN est reconstitué directement en déterminant quels éléments y sont intégrés. Pour ce faire, ces technologies partent d'une séquence d'ADN simple brin comme dans la méthode de Sanger. Il existe deux plateformes : la plateforme 454 qui combine l'amplification de l'ADN par PCR en émulsion et le pyroséquençage développé par la compagnie Roche Diagnostics. L'ADN est d'abord fragmenté mécaniquement par nébulisation. Dans le milieu de séquençage, un seul nucléotide est ajouté à la fois. Si le nucléotide attendu pour continuer la synthèse du brin complémentaire est celui présent dans le milieu, il sera alors incorporé et grâce aux enzymes présentes, émettra un signal lumineux qui sera traduit par le séquenceur. Sinon, l'appareil essayera un après l'autre les autres nucléotides. La suite de la séquence sera déterminée de la même façon. L'autre plateforme : Solexa de la compagnie Illumina, opte pour une stratégie plus proche de celle de Sanger. Les quatre nucléotides associés à des fluorophores différentes qui agissent comme bloqueurs qui empêchent la continuation de la synthèse, sont ajoutés au milieu de séquençage. Après l'ajout, le nucléotide ajouté est identifié par sa fluorescence puis la fluorophore est enlevée pour permettre la détermination du nucléotide suivant. La séquence est alors allongée d'une seule base à la fois (Bartram *et al.*, 2011; Sims *et al.*, 2014; Swanson *et al.*, 2014; A. Wang *et al.*, 2014).

Pour réaliser une identification de microorganismes par séquençage, il faut au préalable isoler une colonie sur gélose, faire l'extraction de l'ADN et amplifier un gène cible par PCR. Ce dernier sera ensuite séquencé. La séquence obtenue est comparée avec l'ensemble des séquences de références accessibles *via* différentes bases de données. Les gènes cibles sont ceux fréquemment utilisés pour la phylogénie et la classification taxonomique tels que l'ADN ribosomal (ADNr) 16S pour les bactéries ou les régions TS1-

ITS2 pour les levures (Dunne *et al.*, 2012). Il est également possible, grâce au séquençage « next generation », d'identifier et quantifier toutes les bactéries dans une population en amplifiant l'ADN total, puis en procédant au séquençage de l'ARNr *16s* (Salipante *et al.*, 2013).

GÉNÉRALITÉS SUR LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE

La spectrométrie de masse est une technique (Gaskell, 1985; Schulten, 1982) de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer et d'identifier des molécules d'intérêts par la mesure très précise de leur masse. Le principe de la spectrométrie de masse consiste en la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge. L'ion ainsi obtenu est appelé ion moléculaire et permet la détermination de la masse du composé. Plusieurs ruptures de liaisons chimiques au sein de la molécule ont lieux et forment également des ions fragments caractéristiques. Les ions fragments vont être séparés en fonction de leur masse sur charge (m/z) par l'application d'un champ magnétique et/ou électrique puis collectés par un détecteur. L'ensemble de ces ions fragments et des ions moléculaires sont représentés dans un spectre de masse et permettent l'identification de la structure moléculaire. Le spectromètre de masse comporte cinq parties principales :

- Un système d'introduction qui fait pénétrer l'échantillon dans le spectromètre de masse. Une source d'ionisation qui permet la production d'ions en phase gazeuse suivie d'un ou plusieurs analyseurs qui séparent les ions produits en fonction du rapport m/z . Il existe plusieurs sources d'ionisation, les plus utilisées sont (i) l'ionisation à impact électronique (IE), (ii) l'ionisation chimique (IC), qui sont des ionisations dites dures utilisées pour les petites molécules volatiles et thermostables, (iii) l'ionisation par bombardement d'ions ou d'atomes rapides (LSIMS ou FAB), ionisation assez douce pour les molécules < 6000 Da, (iv) l'ionisation par électro nébulisation (electrospray ES ou ESI) et (v) la désorption/ionisation laser assistée par Matrice (MALDI). Ces deux derniers types sont généralement utilisés pour des biomolécules.

- Un analyseur qui trie les ions fragments en fonction du rapport m/z par l'application d'un champ magnétique et ou électrique. Il existe des analyseurs basses résolutions tels que le quadropôle (Q), le piège à ions 3D (IT) ou linéaire (LIT) et des analyseurs hautes résolutions permettant de mesurer la masse exacte des analytes tels que le temps de vol (TOF), la résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FT-ICR) et l'Orbitrap.
- Un détecteur qui va compter les ions et amplifier le signal.
- Un ensemble informatique de traitement des données qui permet de convertir les différents signaux en spectre de masse.

Le MALDI-TOF

Le MALDI-TOF est une application (Chernushevich *et al.*, 2001; Hortin, 2006; Roepstorff, 2000; Welker *et al.*, 2002) de la spectrométrie de masse qui emploie un spectromètre utilisant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol (TOF= *Time-Of-Flight*). La séparation des molécules par cette technique est plus douce qu'avec les autres méthodes. Les molécules de grandes tailles peu volatiles et sensibles à la chaleur peuvent être ionisées sans être dégradées. La méthode MALDI-TOF s'applique aux biomolécules plus fragiles comme les peptides, les protéines, les glycoprotéines et les oligonucléotides.

- *Les applications du MALDI-TOF pour le dépistage des infections urinaires*

Une équipe espagnole (March Rossello *et al.*, 2013) a mis au point un protocole pour l'identification des bactéries par MALDI-TOF à partir d'échantillons d'urine positifs avec le système Sysmex UF-1000i (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) présenté précédemment. Dans cette étude, seulement les échantillons contenant plus de 1000 UFC/mL et un seul type de microorganisme a été pris en compte. Ils ont toléré jusqu'à 100

UFC/mL de bactéries contaminantes lorsque étalées sur gélose. Ils ont conclu que lorsque le système Sysmex UF-1000i détecte $\geq 1 \times 10^7$ bactéries/mL, l'identification des bactéries peut se faire directement à partir d'un échantillon d'urine avec une sensibilité de 87,5%, entre 10^5 et 10^7 bactéries/mL. Une pré-incubation de l'échantillon dans un milieu nutritif tel que du BHI (Brain Heart Infusion) est nécessaire pendant au moins 4 h pour avoir une quantité adéquate de bactéries pour l'analyse et permet d'obtenir une sensibilité de 91,7%.

Une autre équipe, (Burillo *et al.*, 2014) a combiné la coloration de Gram avec la technologie du MALDI-TOF pour réaliser un diagnostic rapide des infections urinaires. Ils ont recueillis 1000 échantillons d'urine de patients avec une ITU suspectée, parmi lesquels 207 étaient positifs et contenaient un seul type de microorganisme. Les principaux résultats comparatifs sont synthétisés dans le tableau 3.

TABLEAU 3 COMPARAISON DE LA TECHNIQUE STANDARD POUR LA CARACTÉRISATION DES BACTÉRIES: LA COLORATION DE GRAM VS LE MALDI-TOF

	Coloration de Gram	MALDI-TOF
Sensibilité	81,3%	79,2%
Spécificité	93,2%	73,5%
Valeurs prédictives positives	81,3%	-
Valeurs prédictives négatives	93,2%	-
Rapport de vraisemblance positif	11,91	2,99
Rapport de vraisemblance négatif	0,20	0,28
Précision	90,0%	78,3%

Le fait de combiner les deux techniques directement sur les échantillons d'urine, permet de prédire en moins d'une heure la présence ou l'absence de bactériurie et de déterminer le microorganisme en cause. Cependant, cette technique possède quelques limites : une quantité suffisante de bactéries dans l'échantillon est nécessaire pour être identifiées par MALDI-TOF. L'identification des levures et de certains streptococci n'est pas optimale. Dans le cas des infections urinaires polymicrobiennes, l'équipe de Wang *et al.* (2013), a observé que dans le cas de la présence de deux microorganismes différents il fallait qu'ils soient à un ratio de 1:1 ou 1:2, pour être identifiés (Wang *et al.*, 2013).

LA TECHNOLOGIE LUMINEX

Il s'agit d'une nouvelle technologie basée sur la cytométrie en flux à laquelle sont alliés deux lasers ainsi que des microbilles en polystyrène de 5,6 μm de diamètre (Luminex Analyzer TM, Luminex Corporation, Austin, USA) (Fulton *et al.*, 1997). Lors de la fabrication de ces microbilles, deux fluorochromes sont incorporés à un ratio précis afin de les différencier en 100 types différents. Ils seront liés de façon covalente à différentes molécules, des antigènes, anticorps ou encore des sondes nucléiques caractéristiques d'allèles particuliers *via* des groupements carboxylates. La quantité de molécules pouvant être fixée est de 1 à $2 \cdot 10^6$ molécules. Il peut y avoir jusqu'à 100 différents types de microbilles dans un même puits d'une plaque 96 puits d'analyse ce qui laisse augurer de grandes capacités d'analyse (Joos *et al.*, 2002).

Les billes sont mélangées au début de l'analyse et aspirées dans une veine liquide grâce à une sonde. À la sortie de la veine liquide, les billes sont excitées par un jeu de deux lasers. Un laser rouge à diode 633 nm qui excite les fluorochromes incorporés aux billes permet l'identification de chacune des billes. Un laser vert qui excite le fluorochrome qui est couplé à la molécule reporter et permet de détecter l'interaction antigène-anticorps ou sonde-amplicon qui se produit à la surface de la bille après l'addition d'un conjugué marqué d'un fluorochrome émettant dans le vert. La fluorescence est détectée par un photomultiplicateur à la sortie de la veine liquide. Les billes sont détectées et comptées

jusqu'à 100 fois, soit au moins 10 000 évènements (Keij & Steinkamp, 1998; Kettman *et al.*, 1998).

Le Luminex™ est un automate qui reste dispendieux ce qui nécessite d'avoir un grand nombre d'exams pour le rentabiliser. Il est sensible aux variations de température de ce fait il nécessite une pièce dont la température est contrôlée en permanence ainsi qu'une re-calibration aux deux semaines. Les billes doivent être manipulées le plus possible à l'abri de la lumière car elles sont très sensibles. Le temps moyen de lecture par puits varie de 30 secondes à 1 minute 30. L'un des avantages est le multiplexage qui offre la possibilité d'avoir jusqu'à 100 différents types de billes dans le même puits (Joos *et al.*, 2002). Les applications actuelles de la technologie Luminex™ sont diverses et variées : génétique, immunologie, histocompatibilité. En microbiologie également, plusieurs équipes ont déjà utilisé cette technologie.

- *Les applications de la technologie Luminex™ en microbiologie*

L'équipe de Smith *et al.*, (1998) a utilisé la technologie Luminex™ pour déterminer et quantifier des acides nucléiques du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), du virus de l'hépatite C et des Herpès Simplex Virus (Smith *et al.*, 1998). L'équipe de Dunbar *et al.*, (2003) ont couplé aux microsphères des sondes de capture spécifiques du gène de l'ARNr 23S de certaines bactéries (*E. coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* et *Campylobacter jejuni*) ce qui a permis de détecter 10^3 à 10^5 copies du génome de chaque bactérie. La même équipe a aussi couplé des anticorps aux billes de façon à détecter des protéines bactériennes. Les protéines ont été révélées grâce à des anticorps biotinylés qui reconnaissent eux-mêmes la streptavidine couplée à un fluorophore rouge (phycoérythrine) (Dunbar *et al.*, 2003). Les microorganismes sont détectables à un taux de ≤ 1000 microorganismes/mL. Plusieurs applications cliniques homologuées par Santé Canada, la FDA ou la Commission Européenne sont disponibles³.

³<http://www.luminexcorp.com/Products/Assays/ClinicalDiagnostics/>

1.3 L'EXTRACTION D'ADN GÉNOMIQUE

L'extraction et la purification des acides nucléiques sont les premières étapes dans la plupart des études de biologie moléculaire et dans toutes les techniques d'ADN recombinant. La qualité et la pureté des acides nucléiques comptent parmi les facteurs les plus critiques pour l'analyse en PCR.

Il existe plusieurs protocoles qui suivent approximativement les mêmes principes : (i) la lyse des cellules, (ii) l'élimination des protéines, (iii) l'élimination des autres acides nucléiques, (iv) la concentration de l'ADN et (V) la précipitation à l'alcool. Le but étant de récupérer le plus d'ADN possible, le retrait des inhibiteurs et des nucléases et de maximiser la qualité de l'ADN. L'extrait peut ensuite être amplifié par PCR, séquencé et utilisé dans les analyses par enzymes de restriction, l'hybridation de type *Southern*, la construction d'une librairie d'ADN génomique et bien d'autres applications.

1.3.1 Les grandes étapes de l'extraction

LA LYSE

La lyse correspond à la désintégration de la membrane d'une cellule biologique par un agent physique, chimique ou biologique afin de libérer les protéines et/ou les acides nucléiques. Elle permet de produire des lysats cellulaires (Fredricks *et al.*, 2005; Kauffmann *et al.*, 2004; Krsek & Wellington, 1999; Muller *et al.*, 1998).

La procédure de lyse idéale est souvent un compromis de techniques et doit être suffisamment rigoureuse pour briser les matériaux de départ, mais assez douce pour préserver l'acide nucléique intact. Les procédures de lyse les plus courantes utilisent un ou plusieurs des traitements suivants en séquence ou simultanément :

- La rupture mécanique par billes de silice, la lyse hypotonique, le choc thermique, la sonication.
- Les traitements chimiques par des détergents et tensioactifs, des acides ou des bases, des solutions organiques, des agents chaotropiques ou encore par la réduction des thiols.

- Des traitements enzymatiques : lysozyme, protéinase K, lysostaphine, lyticase.

Souvent, la rupture de la membrane et l'inactivation des nucléases intracellulaires sont couplées, évitant ainsi la dégradation précoce des acides nucléiques. En effet, certaines solutions d'extraction peuvent contenir un détergent permettant la solubilisation des membranes et un sel chaotropique permettant l'inactivation des nucléases. Les détergents et tensioactifs permettent la solubilisation des lipides des membranes cellulaires. Les enzymes vont hydrolyser les protéines ou les glycosides. Des agents de chélation, tel que l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA), sont souvent utilisés lors de cette étape. Ils chélatent les ions divalents nécessaires pour le fonctionnement des désoxyribonucléases, empêchant la dégradation de l'ADN libéré. Suite à la lyse cellulaire et l'inactivation des nucléases, il est nécessaire de se débarrasser des débris cellulaires et autres constituants, ainsi que des produits utilisés pour briser les cellules, pouvant inhiber la PCR ou les enzymes nécessaires pour les étapes suivantes. Pour se faire, il existe plusieurs techniques telles que des techniques de filtrages de type chromatographie sur colonne ou couche mince ou encore de précipitation.

PURIFICATION ET CONCENTRATION DE L'ADN

Les méthodes de purification des acides nucléiques combinent souvent plusieurs méthodes telles que l'extraction/précipitation, la chromatographie, la centrifugation et la séparation par affinité (Kieleczawa, 2006).

L'extraction par solvant est souvent utilisée pour éliminer les contaminants d'acides nucléiques. Par exemple, la combinaison du phénol et du chloroforme permet de dénaturer et d'éliminer les protéines. La précipitation par l'isopropanol ou l'éthanol est généralement utilisée pour concentrer les acides nucléiques et éliminer les sels. Dans le cas où la quantité d'acide nucléique est faible, des véhicules inertes tel que le glycogène peuvent être ajoutés améliorant ainsi la précipitation. Il existe aussi une méthode dite de « relargage » faisant intervenir de fortes concentrations de sels qui permettent une précipitation sélective. En jouant sur le pH, il est également possible de faire précipiter sélectivement les protéines.

Hormis les techniques chimiques, il existe plusieurs types de chromatographies applicables pour purifier les acides nucléiques : la chromatographie d'exclusion, d'échange d'ions, d'absorption sélective ou de liaison par affinité. La chromatographie d'exclusion ou encore tamisage moléculaire, vise à séparer les molécules en fonction de leur masse moléculaire. La phase stationnaire est composée de billes perforées. Selon la taille des perforations, les molécules sont facilement séparées grâce à leurs masses moléculaires. Ainsi, les petites molécules vont traverser les pores par diffusion, tandis que les grosses molécules sont exclues et éluées rapidement.

- La chromatographie échangeuse d'ions telle que la technologie CHELEX 100 de la compagnie Bio-Rad, est basée sur la séparation des différents constituants en fonction de leur charge nette. Elle a recours à l'interaction électrostatique entre une molécule cible et un groupe fonctionnel sur la matrice de la colonne. Les acides nucléiques chargés négativement peuvent être élués des colonnes d'échange d'ions grâce à de simples tampons de sel.
- Dans la chromatographie d'affinité, les acides nucléiques sont fixés sélectivement par adsorption sur des silices ou du verre en présence de certains sels chaotropiques, tandis que les autres molécules biologiques sont éluées. L'ADN et/ou l'ARN est ensuite élué par un tampon ou une eau faible en sels.

La centrifugation sélective est également une puissante méthode de purification, l'ultracentrifugation isopycnique en gradients de chlorure de césium (CsCl) à des forces centrifuges très élevées a longtemps été utilisée pour la purification de plasmides (Cole, 1971).

1.3.2 Les protocoles d'extraction d'ADN les plus utilisés dans les laboratoires

La technique de référence (Chomczynski & Sacchi, 2006) d'extraction de l'ADN depuis les 50 dernières années est la méthode au phénol/chloroforme, aussi appelée la

méthode organique, puisque c'est la méthode la plus efficace pour extraire de grande quantité d'ADN de haut poids moléculaire utilisable en RFLP (*restriction fragment length polymorphism*). De plus, cette méthode peut être utilisée pour différents types d'échantillons. Cependant cette méthode possède aussi des désavantages. Elle est longue à réaliser, l'extrait est facilement contaminé et les manipulateurs sont fortement exposés à des produits chimiques dangereux.

Elle commence par une lyse des cellules ou tissus, en général par broyage, suivi d'une extraction par des détergents qui vont disperser les bicouches lipidiques des membranes et dénaturer les protéines. L'utilisation de la protéinase K permet la digestion des protéines. Par la suite, l'utilisation de certains solvants organiques tel que le phénol additionné ou non de chloroforme et d'alcool iso-amyle permet d'éliminer les protéines. Une fois dénaturées, ces dernières vont former un précipité à l'interface phénol/eau tandis que l'ADN sera en solution dans la phase aqueuse. L'ADN est ensuite précipité par addition d'éthanol ou d'isopropanol, collecté par centrifugation et dissous dans un tampon de conservation.

L'autre méthode de référence est la méthode décrite par Boom *et al.* en 1990. C'est une méthode d'extraction sur phase solide permettant d'isoler l'ADN provenant d'une grande variété d'échantillons différents. Le principe est basé sur l'absorption des acides nucléiques par les particules de silice en présence de sels chaotropiques. Ils utilisent le guanidinium isothiocyanate qui permet à la fois la lyse de la cellule, l'inactivation des nucléases et la liaison de l'ADN à la silice. En présence des sels chaotropiques, l'ADN va se lier à la silice plutôt qu'aux molécules d'eau. Ainsi, les contaminants présents dans l'échantillon tels que les protéines, lipides et glycosides peuvent être retirés par lavage avec une solution à forte concentration de sels. Les sels sont ensuite retirés par lavages avec de l'éthanol à 70%. Puis l'ADN est élué dans une solution de faible force ionique ou dans de l'eau.

Il est possible d'extraire l'ADN de 12 échantillons différents par heure et le taux de rendement peut être supérieur à 50% avec des colonnes⁴, et encore plus avec les automates.

⁴<http://www.qiagen.com/ca/resources/resourcedetail?id=67893a91-946f-49b5-8033-394fa5d752ea&lang=en>

L'extraction d'ADN par billes de silice est devenue la méthode de base pour de nombreux laboratoires, puisqu'elle est rapide et produit un extrait d'ADN de grande qualité. Cependant, la provenance d'échantillons telle que la gomme à mâcher par exemple, peut interférer avec la membrane de silice. L'extraction Chelex (de Lamballerie *et al.*, 1992) est l'une des techniques d'extraction les plus anciennes et utilise une résine chélateuse d'ions. C'est une méthode peu coûteuse, rapide, ayant un faible taux de contamination et ne faisant intervenir aucun produit chimique dangereux. Cependant, elle est inefficace pour les échantillons de sang, la pureté de l'ADN produit est faible et non utilisable pour le RFLP. Le principe consiste à ajouter 5% d'une suspension Chelex après avoir incubé l'échantillon avec de la protéinase K. L'échantillon est ensuite chauffé à 100°C, le mélange est centrifugé afin de culoter le Chelex et le surnageant est utilisable directement pour une PCR.

1.3.3 Diagnostic des infections urinaires par méthodes moléculaires: recension des écrits

L'analyse bactériologique des infections urinaires étant l'une des analyses les plus effectuées au sein des laboratoires cliniques dans le monde, nombreuses équipes ont travaillé sur le sujet.

Il existe plusieurs automates et spectromètres de masse sur le marché contribuant au dépistage des infections du tractus urinaire dont le système UroQuick (Alifax, Padova, Italie) basé sur la théorie de la dispersion de la lumière, le système BACSYS-40i (Sysmex, Kobe, Japon) et le système UF-1000i (Sysmex) basé sur la technologie de cytométrie en flux. Une équipe a comparé la sensibilité et la spécificité de ces trois systèmes avec la méthode standard, la culture d'urine. Ils ont analysé 2230 échantillons d'urines provenant d'un centre hospitalier universitaire Allemand. En ciblant les patients hospitalisés ils ont augmenté leurs chances d'avoir une variété plus importante de pathogènes pouvant être impliqués dans les troubles urinaires. Cette étude a prouvé qu'en comparaison avec la culture d'urine, les systèmes automatisés avaient une sensibilité de 73 à 80,9% et une spécificité de 61,8 à 92,8%. La sensibilité de détection des bactéries fréquemment retrouvées dans les infections urinaires telles que les bacilles Gram - (infections acquises en

communauté) était proche de 90% mais pour les autres pathogènes tels que les levures et Gram +, elle était très faible. Ils en ont conclu que les systèmes disponibles pourraient aider dans le dépistage des infections urinaires classiques qui surviennent en majorité dans les cliniques, mais pas dans le cas des infections urinaires nosocomiales (Marschal *et al.*, 2012).

La biologie moléculaire est de plus en plus impliquée dans la détection des microorganismes depuis l'arrivée de la PCR. En 2010, Lehmann *et al.*, ont mis au point une PCR en temps réel pour aider au diagnostic des infections urinaires. Leur objectif était d'évaluer à partir d'une étude prospective, la faisabilité de l'identification des pathogènes urinaires par PCR en temps réel, en comparant les résultats avec les résultats obtenus par la culture d'urine. 301 échantillons de 189 patients ayant une infection urinaire suspectée ont été collectés de façon prospective. La culture d'urine était effectuée sur géloses CLED, MacConkey, extrait de malt, suivi d'une identification microbiologique du pathogène pour les géloses où il y avait croissance, soit pour 98 échantillons. En parallèle, tous les échantillons ont été analysés par PCR en temps réel et identifiés grâce à des sondes d'hybridations. Parmi les échantillons négatifs avec les bandelettes urinaires, 15 d'entre eux ont présenté une amplification positive. 17 échantillons avec une amplification négative ont montré une croissance sur gélose, parmi lesquels 10 échantillons contenaient des pathogènes non détectés par les différentes sondes d'hybridations. La sensibilité et la spécificité pour la détection des échantillons contaminés étaient respectivement de 90% et 87%. De façon générale, 95% des infections mono-bactérienne et 57% des multi-bactériennes ont été détectées en concordance avec les deux méthodes. Ils ont pu prouver que la détection des uropathogènes par PCR en temps réel était possible grâce à l'utilisation d'une paire d'amorces ciblant l'*ARNr 16S* et de plusieurs réactions de PCR utilisant une sonde différente à la fois. Bien que la rapidité soit au rendez-vous, le fait de réaliser plusieurs réactions augmente considérablement le coût de l'analyse, car le prix des sondes et des réactifs de PCR est relativement élevé. Cette méthode étant basée sur l'identification des pathogènes, aucune information sur la quantité de bactéries présentes n'est donnée. L'absence de cette information ne permet pas de discriminer les échantillons dont la bactériurie est significative ou pas (Lehmann *et al.*, 2010).

En avril 2013, une équipe (Hansen *et al.*, 2013) a mis au point une PCR en temps réel semi-quantitative utilisant un Cp seuil permettant l'identification moléculaire des infections du tractus urinaire. Ils ont fait correspondre une valeur de Cp à la valeur seuil 10^3 UFC/mL qui confirme la présence d'une infection urinaire. Pour ce faire, l'équipe a ciblé l'*ARNr 16S* pour identifier la plupart des uropathogènes en utilisant des sondes spécifiques pour *E. coli*, *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus sp.*, *S. aureus*, *Enterococcus sp.* et *Streptococcus sp.* L'analyse de 330 échantillons d'urine et leurs résultats ont été comparés avec la culture d'urine. Leur étude a permis de choisir le nombre 25 comme Cp seuil : un $Cp \geq 25$ signifie une absence d'infection urinaire et un $Cp \leq 25$ signifie la présence d'infection urinaire. Avec ce Cp seuil, la sensibilité et la spécificité de leur méthode est de 97% et 80% respectivement. 78% des échantillons étaient mono-microbiens. L'identification des uropathogènes dans ces cas était de 99%. Avec cette méthode, les résultats sont disponibles en 4 heures, cependant ils nécessitent quatre réactions différentes : 1) sonde universelle, *Pseudomonas spp.* *E. coli*, 2) *P. aeruginosa*, 3) *Staphylococcus spp.*, *S. aureus*, *Enterococcus spp.*, et 4) *Streptococcus spp.*

Plus récemment, une équipe américaine de l'Université du Texas (Enderle *et al.*, 2013) a réussi à quantifier les bactéries uropathogènes présentes dans les échantillons d'urine en utilisant la PCR en temps réel. Ils ont étudié les infections urinaires à *E. coli* ou *S. saprophyticus* dans un modèle murin. Des urines de souris saines ont étéensemencées sur gélose LB, comme témoin négatif. Les colonies ayant poussé ont été identifiées par ribotypage du gène *16S* et considérées comme étant des contaminants. En parallèle, ils ont pu infecter des souris avec l'une des deux bactéries à l'étude pour qu'elles développent une infection urinaire. Ces échantillons (n=10) ont été analysés par la PCR en temps réel. L'extraction de l'ADNg était réalisée par une trousse de la compagnie Thermo Labsystems (Finlande) adapté à l'automate BioSprint 96 (Qiagen, Valencia, CA, USA). Pour réaliser la PCR ils ont créé deux paires d'amorce et deux sondes : une paire d'amorces spécifiques pour *E. coli* uropathogène avec une sonde de type TaqMan ciblant l'hémolysine D et une autre paire d'amorces pour *S. saprophyticus* avec une sonde qui cible le gène de transport TrK. Ils ont cloné ces gènes et une série de dilution de ces clones a permis de réaliser une

courbe standard utilisée pour chaque réaction permettant ainsi la quantification des bactéries présentes dans les échantillons d'urine. La limite de détection était de 10 copies dans 80% des réactions (n=10) pour *E. coli* et 70% pour *S. saprophyticus*. Dans cette méthode, l'extraction de l'ADNg des microorganismes et la PCR en temps réel sont automatisées et permettent l'analyse de 200 urines en 3 heures.

L'étude était basée seulement sur deux microorganismes alors que les infections urinaires peuvent être dues à une multitude de pathogènes. De plus, tout comme les études précédentes, l'identification du pathogène s'est faite en deux réactions, augmentant ainsi le coût de l'analyse. Cependant, le fait de pouvoir quantifier les bactéries de façon précise est un atout, étant donné que l'information est capitale et permet de discriminer les échantillons ayant une bactériurie significative des autres échantillons.

Un recensement principalement des applications de la PCR pour notre sujet d'étude a été réalisé cependant, cette technique est appliquée dans d'autres types d'infections dont quelques exemples suivent. L'équipe d'Avolio *et al.* (2014), a mis en avant les avantages d'utiliser le diagnostic moléculaire dans le dépistage des septicémies chez les patients. L'outil utilisé était le LightCycler Septifast de la compagnie Roche Diagnostics, basé sur la technologie de la PCR en temps réel avec une détection par sondes des divers pathogènes pouvant être retrouvés dans le sang. Ils ont réalisé une étude prospective sur 830 adultes. Au bout de 15 h en moyenne, ils étaient capables de diagnostiquer plus de 50% des patients positifs avec une spécificité de 96% et une VPP de 94 % (Avolio *et al.*, 2014). La méthode de référence utilisée est la culture de sang qui s'avère être la méthode de référence des hôpitaux depuis longtemps. Cependant cette méthode est longue : 1 à 5 jours sont nécessaires avant d'obtenir le résultat. De plus, dans plus de 50% des cas, un échantillon censé être positif sort négatif (Avolio *et al.*, 2014). Cette technologie peut également être utilisée pour le dépistage des herpes virus dans le liquide céphalorachidien (Ryncarz *et al.*, 1999), c'est d'ailleurs ce protocole qui est actuellement utilisé au CHUS. Srinivasan *et al.* (2012) ont passé en revue 299 études portant sur le dépistage des bactéries en cause de la méningite par l'amplification de l'*ARNr 16S*. Cette méta-analyse a permis de mettre en avant les avantages et l'efficacité de l'utilisation de cette technique. En effet, la sensibilité

de la technique, toutes analyses confondues, est de 92% et la spécificité est de 94%. Elle permet un traitement plus rapide et approprié, nécessaire étant donné le taux de mortalité causé par cette infection (Srinivasan *et al.*, 2012).

OBJECTIFS DU PROJET

Aucune des études réalisées antérieurement n'a permis la détection de différents microorganismes, y compris les levures, impliqués dans les infections urinaires et ce en une seule PCR. L'objectif principal de ce projet est de mettre en place une stratégie pour automatiser l'analyse des urines dans le cadre du dépistage des infections urinaires. Plus précisément, les travaux décrits dans ce mémoire ont pour objectifs de :

- 1) Développer une méthode permettant l'extraction de l'ADNg de tous les microorganismes pouvant être présents dans l'urine et ce, grâce à un seul protocole. Ce protocole doit pouvoir être utilisé par un robot pipetteur. L'extrait obtenu doit pouvoir être utilisable directement dans une PCR.
- 2) Développer une méthode de détection moléculaire par la PCR en temps réel pour détecter toutes les bactéries ou levures pouvant être présentes dans une bactériurie chez l'humain. Cette méthode doit également identifier de façon spécifique *E. coli*, puisqu'il est le pathogène le plus fréquemment retrouvé dans une infection urinaire ainsi que *S. agalactiae*, important pour les femmes enceintes.

CHAPITRE 2

ARTICLE 1: A SINGLE PROTOCOL FOR EXTRACTION OF GDNA FROM BACTERIA AND YEAST

Auteurs de l'article: Laurie Vingataramin, Eric.H Frost

Statut de l'article: [soumis à Biotechniques]

Avant-propos: Le travail de cette recherche décrit les travaux de Laurie Vingataramin quant aux expérimentations en laboratoire, l'analyse des résultats ainsi que l'écriture de la première version du manuscrit. Les travaux et la rédaction ont été dirigés et encadrés par Eric Frost.

Résumé : La lyse des micro-organismes à l'aide de thiocyanate de guanidine est la méthode de base la plus utilisée depuis deux décennies, même si elle exige un prétraitement pour lyser la paroi des bactéries autres que les Gram -. Nous avons développé une méthode rapide et peu coûteuse pour extraire l'ADN génomique provenant de tous les micro-organismes incluant les levures, pour une vaste gamme de concentrations. Cette méthode que nous avons appelé EtNa est basée sur une lyse alcaline, chaude et à l'éthanol. Le mélange peut être immédiatement centrifugé ce qui permet d'obtenir un ADNg semi-purifié utilisable en PCR ou le mélange peut être directement déposé sur une colonne de silice pour une étape de purification supplémentaire.

2.1 ABSTRACT

Guanidine thiocyanate breakage of microorganisms has been the standard initial step in genomic DNA (gDNA) extraction of microbial DNA for two decades despite its requirement for pretreatments in order to extract DNA from microorganisms other than Gram negative bacteria. We report a quick and low cost genomic DNA extraction protocol called EtNa that is efficient for bacteria and yeast over a broad range of concentrations. EtNa is based on a hot alkaline ethanol lysis. The solution can be immediately centrifuged to yield a crude gDNA extract satisfactory for PCR or the solution can be directly applied to a silica column for purification.

2.2 INTRODUCTION

Molecular biology techniques such as PCR, mass spectrometry, and sequencing are being developed to speed up the detection and analysis of microorganisms (1). DNA extraction methods, although central to these procedures, have seen little progress since the introduction of guanidine thiocyanate treatment and silica column purification (2). Although this procedure is satisfactory for extraction of DNA from Gram negative bacteria, enzymatic or mechanical pretreatments are necessary to extract Gram positive or acid fast bacteria and yeasts (3, 4). This is particularly problematic when different types of microorganisms may be present such as in blood or urine, and especially when it is important to extract them with equal efficiency so as not to bias relative populations in studies of microbiota. Previous studies have shown that differences in the structure of the cell wall are at the basis of these problems. The thicker layer of peptidoglycan in the cell walls of Gram-positive bacteria makes them more difficult to break than Gram-negative bacteria (5). Yeast, mycobacteria and spores also have more complicated cell walls than Gram-negative and Gram-positive bacteria and are even more difficult to break. Clinical samples may contain all these types of microorganisms. For many of these microorganisms, the DNA yield and quality can vary considerably depending on the DNA extraction method

used (6) and thus different methods or conditions must be employed simultaneously for each sample.

Different strategies have been attempted to enhance guanidine thiocyanate lysis of microorganisms including mechanical, enzymatic and chemical treatments alone or in combination. Probably the most universal protocols use mechanical lysis with beads followed by silica column purification (3, 4, 7). Such treatments, however, can shear genomic DNA into small fragments that limit the size of potential PCR amplicons and may also create a bias when different sized amplicons are envisioned (8). This problem becomes more complex when samples contain unknown amounts of different types of microorganisms, because different types of beads and times of beating may be required for different microbes and even different numbers of microbes (9).

Chemical and enzymatic lysis protocols are usually specific for different types of microorganisms and may also be more time-consuming because they require several steps including enzymatic digestion (10). Many procedures employ toxic substances like guanidine thiocyanate that must be safely disposed of, or ionic detergents like SDS that can react with the sample and must be removed or neutralized to avoid inhibition of subsequent PCR.

We describe a procedure here that is based on an unpublished technique developed by Eric Frost and Sylvie Deslandes to extract *Staphylococcus aureus* DNA to be screened for the presence of the *mecA* gene. Their procedure has been used in the clinical microbiology laboratory of the Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (CHUS) since 2004. Eric Frost and Marie-Pierre Guay also used this procedure to successfully extract DNA from *Mycobacterium tuberculosis* for PCR analysis. It involved suspending pelleted bacteria in 61% ethanol, 0.1 M NaOH and heating for 10 minutes at 70°C. The single-stranded DNA released was then pelleted in a microfuge and resuspended for PCR. The present report describes improvements to this procedure that allow it to break Gram negative and Gram positive bacteria as well as yeasts and to use it as a first step in DNA purification on silica columns. We compare this procedure with commercial kits and research methods including our adaptation of Chomczynski's (11) alkaline polyethylene glycol strategy. This procedure

that we have called EtNa (Et for ethanol and Na for NaOH) does not require any hazardous chemicals, ionic detergents, enzymes or mechanical steps but is effective for bacteria and yeast.

2.3 MATERIALS AND METHODS

2.3.1 *Bacterial Strains and Culturing Condition*

Bacteria and yeast were obtained from the ATCC (Manassas, Virginia, USA): *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299), *Proteus mirabilis* (ATCC 12453), *Streptococcus agalactiae* (ATCC 12326), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Candida albicans* (ATCC 60193), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 204508). They were grown overnight on sheep blood agar (Oxoid, Nepean, ON, Canada) at 37°C. One colony was then suspended in Nutrient Broth (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) and incubated at 37°C to a density corresponding to McFarland standard 2.0 (Thermo Scientific, Ottawa, ON, Canada). The number of bacteria (CFU/ml) was confirmed by the plate count method.

2.3.2 *Extraction Procedures*

EtNa gDNA extraction. Bacteria in 100 µL of broth or saline were added to a 1,5 mL microcentrifuge tube. 455 µL of 240 mM NaOH, 2.7 mM EDTA, 74% ethanol were added to the tube and mixed gently to give final concentrations of 200 mM NaOH, 2.25 mM EDTA, 61% ethanol. The tube was then heated to 80°C for 10 min, and centrifuged at 13 000 rpm for 10 min. The supernatant was removed and 100 µL of an optimized suspension solution (see Supplementary Material) containing 0.1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1% Triton-X-100, and 0.5% Tween-20 was added to solubilise the denatured DNA and called an EtNa crude extract. Alternatively, after heating, the mixture was added directly to a QiaAmp DNA mini column (Qiagen, Toronto, Canada) for purification of gDNA. EtNa extraction replaced AL or ATL mediated bacterial lysis and allowed binding

to the column. Subsequent washing steps, starting with buffer AW-1, were followed according to the manufacturer's instructions. The purified gDNA was eluted in 100 μ L of TE and called an EtNa pure extract. A detailed protocol will be posted on the *BioTechniques* web site.

Alkaline polyethylene glycol (PEG) based methods. As in the original method (11), 100 μ L of a reagent composed of 60 g PEG 200 in 0.93 mL 2 M KOH and 39 mL of H₂O was added to 1-10 μ L of liquid or 1-10 mg of solid sample. The mixture was incubated for 15 minutes at room temperature for Gram-negative bacteria, and 10 min at 70°-90°C for Gram-positive bacteria. **Modified PEG-NaOH gDNA extraction** was also performed in a 1.5 mL tube containing 100 μ L of bacteria in broth culture or from a colony suspended in saline. It was centrifuged at 8000 rpm for 4 min. 90 μ L of the supernatant was withdrawn, and the bacteria were suspended in the remaining 10 μ L. 90 μ L of a PEG-NaOH reagent solution composed of 60 mL of PEG 200, 5 mL NaOH 2 M and 25 mL of H₂O. The mixture was heated at 80°C for 10 min and shaken briefly before use. One μ l samples were used directly for PCR in 15 μ L reactions. A detailed protocol will be posted on the *BioTechniques* web site.

LiOAc-SDS gDNA extraction (12). Broth grown microorganisms were centrifuged and the supernatant removed or bacterial or yeast colonies were picked from culture plates, and suspended in 100 μ L of 200 mM LiOAc, 1% SDS solution. After incubation at 70°C for 15 min and the addition of 300 μ L 96% ethanol, the samples were mixed by brief vortexing, then centrifuged for 3 min at 13 000 rpm. The supernatant was withdrawn, and the pellet was dissolved in 100 μ L of TE. Cell debris were spun down by centrifugation for 1 min at 13 000 rpm and 1 μ L of the supernatant was used for PCR.

QiAamp DNA mini kit® (Qiagen, Toronto, ON, Canada) Manufacturers' recommendations were followed for all organisms which included initial treatment in ATL buffer, either without pretreatment (Gram negative bacteria) or after treatment with Lysostaphin (Gram-positive bacteria) or Lyticase (Yeast).

ChargeSwitch® gDNA Mini kit (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) was used according to the manufacturer's recommendations with separation of magnetic beads manually using a magnetic rack.

Primers. Part of the *rRNA 16S* gene from bacteria was amplified with primers 16SUni783F (5'AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA-3'), and 16SUni1094R (5'-ACTTAACCCAACATCTCACGACAC-3')(13) The primers used to amplify the partial *rRNA 28S* gene from yeast were 28SUni185F 5'-TGGGTGGTAAATTCCAACCGCA-3'), 28SUni 270F (5'CAAAGTTCTTTTCATCTTTCCWTCAC-3')(14) Primers were purchased from IDT (IDT, Coralville, Iowa, USA).

Real time PCR. Each extract was tested on the LC480 real-time PCR thermocycler (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). PCR reactions were performed in 15 µL final volume with 0.5 µM of each primer, 1 µL of gDNA extract and 7.5 µL of LightCycler® 480 DNA SYBR Green I Master kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). PCR cycling conditions were 1 cycle at 95°C for 5 min, 40 cycles of 95°C for 10 s, 55°C for 20 s, 72°C for 45 s, followed by a melting curve: 95°C for 5 s, 65°C for 30 s, 55°C for 30 s and then a gradual increase until 95°C. A negative control containing all the components of the reaction mixture without the DNA sample and a positive control containing 1 µL of an *E. coli* DNA extract that had been amplified successfully previously were included in each run. This procedure was validated by amplifying a dilution series of *E. coli* DNA extracted by EtNa without column purification. A PCR efficiency of 98.5% with an amplification factor of 1.98 was observed (calculated according to Thermo Scientific Company - <http://www.thermoscientificbio.com/webtools/qpcrefficiency/>) (see Supplementary Figure 1)

Statistical analysis. All experiments were performed at least in triplicate and averages of values are recorded in Tables and Figures. Statistical comparisons were performed using the Student t-test.

2.4 RESULTS AND DISCUSSION

In order to break yeasts, we increased the heating temperature to 80°C from 70°C in the original procedure and tested different concentrations of NaOH in 61% ethanol (See Table 1). 0.2 or 0.25 M NaOH appeared to break yeasts as well as the Gram positive and Gram negative bacteria tested. In subsequent experiments we used 0.2 M NaOH

Table 1. Microbial DNA extraction using different concentrations of NaOH.

	NaOH concentration			
	0.1 M	0.2 M	0.25M	0.3M
<i>C. albicans</i>	23.6*	19.3	18.9	21.6
<i>E. coli</i>	17.9	15.8	15.6	18.2
<i>S. epidermidis</i>	17.4	16.5	16.2	19.5

* Cp values obtained by PCR using 1 µL samples of DNA extracted from 100 µL samples containing 10⁶ rRNA equivalents of *C. albicans*, or 10⁷ rRNA equivalents of *E. coli* or *S. epidermidis* with either 0.1 M, 0.2 M, 0.25 M or 0.3 M NaOH in 61 % ethanol

In order to ensure that heating microorganisms for 10 minutes at 80°C in 0.2 M NaOH did not degrade the DNA or leave residues that would inhibit PCR, tenfold dilutions of different microorganisms were extracted with the standard EtNa crude procedure (see Figure 1), Even when 10³ microorganisms per mL were extracted, no reduction in PCR efficiency was noted. The procedure extracted gDNA equally well from 10⁹ bacteria per mL.

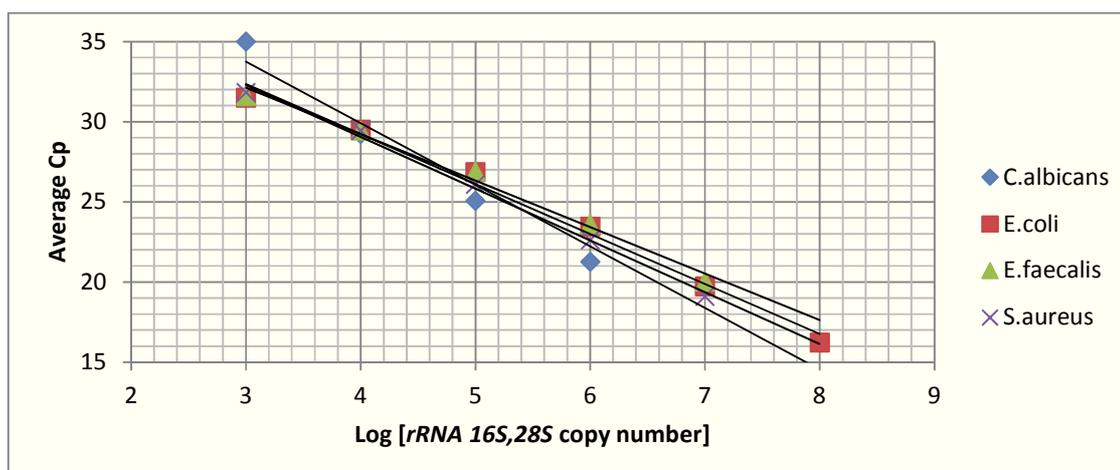


Figure 1. Extraction efficiency of microorganisms at different concentrations.

Tenfold dilutions in Nutrient broth of overnight cultures of microorganisms were extracted with EtNa crude. One μ l samples were subjected to PCR to obtain Cp values.

The EtNa extraction procedure would be much more useful if it could be combined with silica based extraction and eventually automated. Since silica column wash buffers contain 70% ethanol (or more accurately 67%), similar to the EtNa solution, and they do not elute DNA, we attempted to bind nucleic acids to the column by directly adding the EtNa extraction solution after heating the nucleic acids. Initial experiments showed that column extraction was much less efficient than manual extraction, but we observed that addition of EDTA to the extraction solution to a final concentration of 2.75 mM allowed efficient recovery on silica columns (see Figure 2).

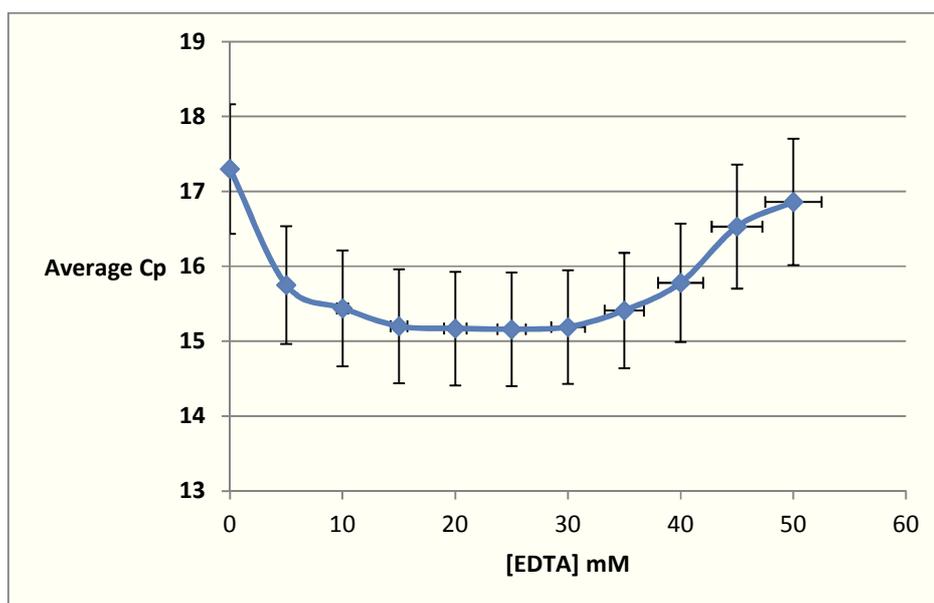


Figure 2. Effect of EDTA on silica column extraction. DNA was extracted from 100 μ l samples containing 10^7 rRNA equivalents of *E. coli* with EtNa containing 0 to 5.5 mM of EDTA. The sample was directly applied to a silica column (QIAamp DNA mini kit $\text{\textcircled{R}}$), washed according to the manufacturer's recommendations and DNA eluted in the manufacturer's elution buffer. One μ L samples were subjected to PCR to obtain Cp values.

Cp values were obtained by real time PCR for several different microorganisms representing Gram negative bacteria, Gram positive bacteria and yeasts after EtNa pure extraction including silica column purification. Using the *E.coli* Cp value as a reference for 1.4×10^9 copies of the rRNA gene and calculating expected Cp values based on an amplification factor of 1.98, we observed concordance of Cp values with variation of about 1 Cp which would indicate a variation in relative titres between 0.5 and 2 times the expected values. (see Table 2).

Table 2. gDNA extraction efficacy of EtNa for different types of microorganism.

Microorganisms	<i>rRNA 16S,28S</i> copy number ⁵	Bacterial	number of rRNA copies/mL	Cp	Comparison with <i>E. coli</i>
		number CFU/mL			
<i>E. faecalis</i>	6	1,2.10 [□]	7,2.10 ⁸	16,73	-2.5
<i>E. coli</i>	7	2,0.10 [□]	1,4.10 ⁹	13,25	0
<i>P. aeruginosa</i>	4	1,5.10 [□]	6,0.10 ⁸	15	-0.75
<i>S. agalactiae</i>	7	2,0.10 [□]	1,4.10 ⁷	20,45	0
<i>P. mirabilis</i>	7	2,0.10 ⁷	1,4.10 ⁷	21,25	-1
<i>S. aureus</i>	5	1,0.10 [□]	5,0.10 ⁷	19,68	-1.2
<i>C. albicans</i>	140	2,0.10 ⁶	2,8.10 ⁷	18,02	+1
<i>S. cerevisiae</i>	140	1,3.10 ⁶	1,82.10 ⁸	17	-0.5

Genomic DNA was extracted from various microorganisms with the EtNa pure method. Efficacy of extraction was evaluated by amplification of the *rRNA 16S* gene for bacteria and *28S rRNA* gene for yeast by real time PCR and comparison of the Cp obtained from an equivalent number of *E. coli 16S rRNA* gene equivalents.

EtNa crude and EtNa pure were compared with various DNA extraction methods including the commercial kits QiaAmp DNA mini kit and ChargeSwitch gDNA Mini kit that are based on guanidine thiocyanate breakage and silica column purification, as well as with LiOAc-SDS and alkaline PEG procedures. All of the methods extracted bacterial DNA successfully, but only EtNa and LiOAc-SDS successfully extracted gDNA from yeast (see Table 3).

⁵ <http://patricbrc.org/portal/portal/patric/Home>

Table 3. Comparison of gDNA extraction methods by real time PCR

	Cp		
	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>C. albicans</i>
EtNa	13,92	14,78	18,77
EtNa pure	15,34	15,71	18,84
LiOAc-SDS	14,80	14,75	19,96
Alkaline PEG	20,22	18,92	32,83
Modified PEG	14,47	15,75	28,4
QIAamp DNA mini kit ®	13,02	17,8	34,55
Charge Switch®	12,88	17,27	33,2

Several gDNA extraction methods were compared with EtNa crude and EtNa pure for 100 µL samples containing 10⁷ rRNA equivalents of *C. albicans*, or 10⁸ rRNA equivalents of *E. coli* or *S. epidermidis*.

The slightly higher Cp values observed for EtNa pure in comparison with EtNa crude are probably the result of the expected recovery suggested by the manufacturer of QiaAmp DNA mini kits.

Over the past 25 years, most protocols for breaking micro-organisms and purifying their nucleic acids have relied on treatment with guanidinium thiocyanate after enzymatic or mechanical weakening of Gram positive or yeast cell walls (but without pre-treatment for Gram negative bacteria) and then purification on silica columns (2). Replacing one of these two elements would thus require significant improvements. We describe such a potential, novel, microbe breaking strategy called EtNa that is efficient for all types of organisms and cells, without hazardous chemicals, rapid, and that can be integrated with silica column purification or used as a rapid crude extract for DNA amplification tests.

Probably the greatest advantage of EtNa is that the same protocol can be used for all types of micro-organisms at any concentration with similar efficiency. This is particularly important

for screening tests for human or other infections where the responsible organism is not known and may be a Gram negative or Gram positive bacteria or yeast. It will also be increasingly important to characterize the microbiota in numerous sites where again a variety of micro-organisms co-exist and where it is important to extract them with equivalent efficiency so that their relative abundance can be reflected by subsequent next generation sequencing of *rRNA 16S* or other genes. Indeed, it was also observed that EtNa worked with similar efficiency when extracting small (10^3 /ml) or large (10^9 /ml) numbers of micro-organisms.

The EtNa procedure does not require hazardous chemicals such as guanidinium thiocyanate nor phenol. It does not require ionic detergents that may interfere with the enzymes necessary for subsequent tests like PCR. It yields denatured single-stranded DNA and degrades RNA. Although inappropriate when downstream tests require RNA or double-stranded DNA, this is advantageous for PCR based procedures because it reduces the importance of the initial heating step necessary to denature DNA prior to PCR.

It has long been known that heat (15) or alkali (16) can be used to break down *E. coli* cell walls and extract plasmid DNA. We postulated that their combined use together with 61% ethanol to disrupt lipid membranes would enhance cell wall breakage and simultaneously precipitate the released DNA, allowing very rapid preparation of crude DNA extracts. This 61% ethanol would also create a chaotropic environment that would allow DNA to bind to silica. It was noted that addition of supplementary EDTA enhanced binding to silica. This discovery was indeed fortuitous because a microbial breakage procedure that could not be efficiently coupled with purification on silica would have only limited usefulness.

2.5 CONCLUSION

In conclusion, we have developed a quick low cost and reliable method for breaking yeast and bacterial cells prior to gDNA extraction. The EtNa reagent can be used to process a wide range of biological samples for PCR assay in clinical diagnostic and biomedical

research in less 25 min. Single-stranded DNA from this procedure can be used directly or further purified by directly binding it to silica columns from the EtNa solution. The EtNa method should be compatible with automation in sample processing robots.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

L.V.: conception of the study, acquisition of data, analysis and interpretation of data, drafting the article, critical revision; E.H.F.: conception of the study, analysis and interpretation of data, drafting the article, critical revision, general supervision.

2.6 ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Sylvie Deslandes for her role in developing the initial gDNA extraction used in the clinical microbiology laboratory of the CHUS and members of the clinical microbiology laboratory of CHUS for bacteria strains. Geneviève Giroux, Stéphanie Mauler, Karine Bourgade, Evelyne Benoit and Patrick Dextras-Paquette are thanked for helpful discussions and experimental support.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

REFERENCES

1. **Burillo, A., B. Rodriguez-Sanchez, A. Ramiro, E. Cercenado, M. Rodriguez-Creixems, E. Bouza.** 2014. Gram-stain plus MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) for a rapid diagnosis of urinary tract infection. *PLoS One.* **9**:e86915.
2. **Boom, R., J. Salimans, M. Jansen, L. Wertheim-van Dillen, M. van der Noordaa.** 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* **28**:495-503.
3. **Carbonero, F., M. Benefiel, C. Greenberg, E. Gaskins.** 2011. Microbial DNA extraction from intestinal biopsies is improved by avoiding mechanical cell disruption. *J. Microbiol. Methods.* **87**:125-127.
4. **Salonen, A., J. Jalanka-Tuovinen, J. Immonen, O. Rajilic-Stojanovic, M. Kekkonen, A. Palva, A. de Vos.** 2010. Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. *J. Microbiol. Methods.* **81**:127-134.
5. **Swidsinski, A., V. Verstraelen, H. Osowska, S. Doerffel.** 2008. Biostructure of fecal microbiota in healthy subjects and patients with chronic idiopathic diarrhea. *Gastroenterology.* **135**:568-579.
6. **O Cuiv, P., D. Jones, M. Klaassens, S. Worthley, L. Whitehall, L. Kang, S. McSweeney, S. Leggett, A. Morrison.** 2011. The effects from DNA extraction methods on the evaluation of microbial diversity associated with human colonic tissue. *Microb. Ecol.* **61**:353-362.
7. **Yuan, S., Cohen, B. Ravel, J. Abdo, Z. Forney.** 2012. Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA from the human microbiome. *PLoS One.* **7**:e33865.
8. **Liesack, W., H. Stackebrandt.** 1991. Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria. *Microb. Ecol.* **21**:191-198.
9. **Rantakokko-Jalava, K.** 2002. Optimal DNA isolation method for detection of bacteria in clinical specimens by broad-range PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40**:4211-4217.
10. **Hohnadel, M., L. Fijuljanin, D. Jouette, S. Chollet.** 2014. A new ultrasonic high-throughput instrument for rapid DNA release from microorganisms. *J. Microbiol. Methods.* **99**:71-80.

11. **Chomczynski, P., Rymaszewski.** 2006. Alkaline polyethylene glycol-based method for direct PCR from bacteria, eukaryotic tissue samples, and whole blood. *BioTechniques*. **40**:454, 456, 458.
12. **Looke, M., K. Kristjuhan.** 2011. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *BioTechniques*. **50**:325-328.
13. **Campbell, W.3rd., A.3rd, Heidecker, J. Krishnamani, R. Zahorchak, R. Stull.** 1995. Detection of *Pseudomonas* (*Burkholderia*) *cepacia* using PCR. *Pediatr. Pulmonol.* **20**:44-49.
14. **Baskova, L., C. Preuner, S. Lion.** 2007. The Pan-AC assay: a single-reaction real-time PCR test for quantitative detection of a broad range of *Aspergillus* and *Candida* species. *J. Med. Microbiol.* **56**:1167-1173.
15. **Holmes, DS., Quigley.** 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**:193-197.
16. **Birnboim, HC, Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523.

SUPPLEMENTARY MATERIAL**1. PCR efficiency**

The PCR efficiency and amplification factor were measured according to Thermo Scientific guidelines (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/qpcrreffiency/>) (See figure S1). The slope of the straight line $R^2 = 0,9943$ indicates a PCR efficiency of 98.5% and an amplification factor of 1.98.

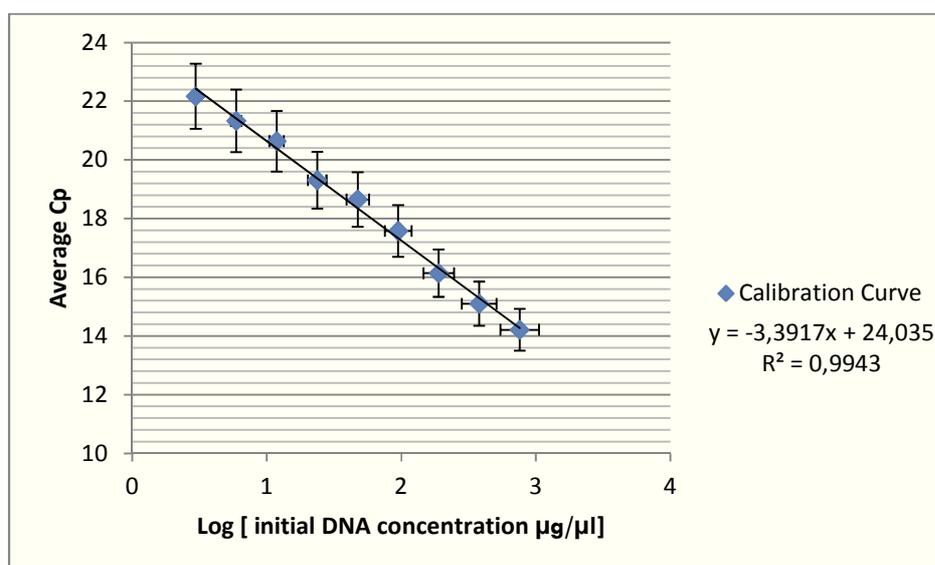


Figure S1. Validation of PCR conditions. Serial twofold dilutions of an EtNa extract of *E.coli* DNA were amplified by our PCR conditions. The PCR efficiency and amplification factor were measured according to Thermo Scientific guidelines (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/qpcrreffiency/>).

2. Solubilisation of precipitated DNA

Rapid solubilisation of DNA is important when DNA is to be used immediately for PCR. Several buffers were compared for efficiency of rapid versus 4°C overnight solubilisation of freshly precipitated DNA. Buffers containing 1% Triton-X-100 performed better than buffers with 0.5 % Tween 80 or without detergents (see figure S2). Overnight incubation was not necessary to solubilize freshly precipitated DNA.

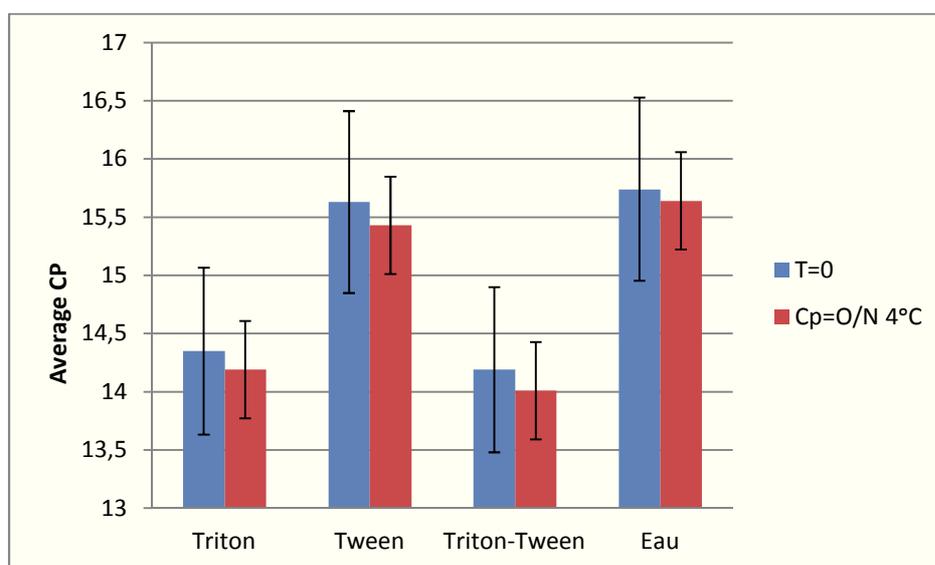


Figure S2. Extraction efficiency of buffers with different detergents. DNA was extracted from 100 μ l samples containing 10^7 rRNA equivalents of *E. coli* with EtNa and resuspended in water or solutions containing 1% Triton-X-100 or 0.5% Tween 80 or both detergents in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA. One μ l samples were taken immediately after resuspension or after incubation overnight at 4°C and subjected to PCR to obtain Cp value.

3. Increased buffer concentration to prevent PCR inhibition

Residual EtNa extraction buffer may not be efficiently removed from DNA pellets for fear of also removing the virtually invisible DNA pellet. Addition of 10 μ l of EtNa extraction solution to 100 μ l of solubilisation buffer resulted in PCR inhibition. Increasing the concentration of Tris-HCl to 50 mM in the solubilisation buffer prevented subsequent PCR inhibition even if 15 μ l of EtNa solution was added (See Table S1).

Table S1. Increased Tris-HCl concentrations in the solubilisation buffer prevent PCR inhibition by inadvertent addition of EtNa solution

	Cp	
	10mM Tris-HCl	50 mM Tris-HCl
	1 mM EDTA-Na ₂	1 mM EDTA-Na ₂ (New)
	pH 8	pH 8
0	21.8	18.9
5	22.4	18.7
10	25.6	19.1
15	28.6	20.4
20	35.0	30.0

* *E. coli* DNA, extracted by EtNa and purified with Qiagen columns, was added to solubilisation buffer containing 10 mM Tris-HCl and 1 mM EDTA or containing 50 mM Tris-HCl and 0.1 mM EDTA. Variable amounts of EtNa extraction solution was added to 100 μ l aliquots of the solubilisation buffers. Cp values were obtained by PCR using 1 μ l samples of the resulting solutions.

CHAPITRE 3

ARTICLE 2 DÉPISTAGE SEMI-QUANTITATIF DES BACTÉRIES ET LEVURES UROPATHOGENÈS POSSIBLES PAR UNE SEULE RÉACTION PCR EN TEMPS RÉEL

Auteurs de l'article: Laurie Vingataramin, Eric H. Frost

Statut de l'article: soumission prévue dans Journal of Microbiology

Avant-propos: Le travail de cette recherche décrit les travaux de Laurie Vingataramin quant aux expérimentations en laboratoire, l'analyse des résultats ainsi que l'écriture de la première version du manuscrit. Les travaux et la rédaction ont été dirigés et encadrés par Eric Frost.

Résumé : L'obtention des résultats suite à une culture d'urine qui est la méthode standard retrouvée dans les laboratoires de microbiologie, peut prendre jusqu'à 48h pendant lesquels le patient est traité avec des antibiotiques choisis de façon empirique par le médecin.

Cette étude présente une méthode semi-quantitative faisant intervenir la PCR en temps réel pour dépister les infections urinaires. Les bactéries et les levures sont identifiées grâce à des sondes ciblant respectivement l'*ARNr* 23S et l'*ARNr* 28S. Ce système permet de faire la distinction entre les bactéries Gram + et Gram -, l'identification d'*Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* ainsi que le dépistage des candiduries.

Une valeur seuil de 26 cycles (Cp) correspondant à 10^5 ufc/mL a été retenue. Pour un $C_p \leq 26$ la bactériurie est significative dans le cas d'infection urinaire.

C'est une étude prospective avec analyse des résultats de façon rétrospective. Les échantillons d'urines ont été analysés par PCR en temps réel en parallèle avec la méthode de culture d'urine effectuée par le laboratoire clinique de microbiologie du centre hospitalier de l'université de Sherbrooke (CHUS). Cette approche permet de dépister les infections urinaires et d'identifier les micro-organismes responsables en 3 h.

3.1 RÉSUMÉ

Le dépistage par culture peut prendre jusqu'à 48 h pendant lesquels le patient est traité avec des antibiotiques choisis de façon empirique par le médecin. Les méthodes moléculaires basées sur le PCR en temps réel sont plus rapides, mais exigent plusieurs réactions, tandis que l'analyse par MALDI-TOF ne donne pas de résultats quantitatifs.

Cette étude présente une méthode semi-quantitative faisant intervenir la PCR en temps réel pour dépister les bactéries et les levures impliquées dans les infections urinaires. Après l'extraction de l'ADN par notre procédure EtNa, les bactéries et les levures sont identifiées dans une seule réaction PCR multiplex grâce à des sondes ciblant respectivement l'*ARNr 23S* et l'*ARNr 28S*. Ce système permet de faire la distinction entre les bactéries Gram + et Gram -, l'identification d'*Escherichia coli*, de *Streptococcus agalactiae* ainsi que le dépistage des candiduries grâce à une stratégie innovatrice pour mesurer la température de dénaturation des sondes. Une valeur seuil de 26 cycles (Cp) correspond à 10^5 ufc/mL indique une infection urinaire positive.

Cette procédure inclut un témoin interne, *Saccharomyces cerevisiae* et a été expérimentée avec 15 échantillons d'urines. Elle permet de dépister les infections urinaires et d'identifier les micro-organismes responsables en 3 heures. Cette procédure pourra être adaptée pour le dépistage de micro-organismes d'autres types d'infection.

3.2 INTRODUCTION

Les méthodes de biologie moléculaire dont la PCR en temps réel sont de plus en plus utilisées pour le diagnostic clinique (1-3), mais elles visent généralement un micro-organisme à la fois. L'infection urinaire touche 175 millions de personnes par année dans le monde (4, 5) et peut être acquise aussi bien en communauté qu'en milieu hospitalier (6-8). Pour dépister une ITU, la méthode couramment utilisée est la culture d'urine (9). C'est une méthode quantitative permettant, en plus du dépistage, l'identification des micro-

organismes responsables et éventuellement une évaluation des sensibilités aux antibiotiques. Les échantillons d'urines sontensemencés sur deux géloses, 5% sang de mouton et MacConkey, suivi d'un antibiogramme dans le cas d'une infection urinaire récurrente ou nosocomiale. L'obtention des résultats peut prendre de 24 à 48 heures pendant lesquels on administre aux patients un antibiotique choisi de façon empirique. Plusieurs études ont démontré que pour certaines populations près de 80% des échantillons sont négatifs et alors l'antibiogramme est inutile (10-12). Les bandelettes réactives sont, de plus en plus utilisées pour le dépistage préliminaire des infections urinaires (13, 14). Ces dernières vont détecter la présence ou non de leucocytes et ou de nitrites dans l'échantillon témoignant ou non d'une infection urinaire. Bien qu'étant très rapide ce test manque de sensibilité et de spécificité (14). L'utilisation de techniques moléculaires pour l'analyse rapide des urines pourra éviter la culture d'urine pour de nombreux échantillons.

Récemment, plusieurs équipes se sont attaquées à la problématique du dépistage des infections urinaires en utilisant la PCR en temps réel avec des amorces et des sondes d'hybridations qui ciblent l'*ARNr 16S*. Cependant aucune équipe pour le moment, n'a réussi à avoir un système qui est semi-quantitatif, permettant l'identification des bactéries et des levures en une seule PCR (2, 15, 16). La PCR universelle ciblant l'*ARNr 16S* à l'aide d'amorces universelles a d'abord été développée pour des études phylogénétiques, car ce gène est universellement retrouvé chez les bactéries. Cette méthode a par la suite été appliquée en microbiologie clinique. Cependant d'autres cibles peuvent être utilisées tel que les ITS (17), l'*ARNr 23S* (18), *Heat Shock protein* (19), le choix de la cible dépend de l'objectif du projet et des sondes et amorces à créer. L'utilisation d'une PCR universelle est souvent un problème dû à la présence des bruits de fond causés par l'ADN contaminant provenant, soit d'ADN d'*E. coli* dans les enzymes tel que la *Taq polymérase* produite dans *E. coli* BL 21, ou encore d'autres bactéries dans l'eau et autres réactifs présent dans le mélange de la PCR. Il existe également des automates tels que l'UroQuick (Alifax,Padova, Italie) ou l'UF-1000i (Sysmex,Kobe,Japon) qui, grâce au principe de la cytométrie en flux, permettent de détecter de façon quantitative les bactéries et les leucocytes présentes dans l'urine (10, 20-22). Cependant, les micro-organismes ne sont pas identifiés. Bien qu'ayant une très bonne sensibilité pour le dépistage des infections urinaires causées par les bactéries

Gram - (90%), la sensibilité pour les bactéries Gram + et les levures est médiocre (20). Les automates peuvent être une alternative pour les infections urinaires classiques mais, pour les infections urinaires nosocomiales, il faudrait encore utiliser la culture d'urine. La spectrométrie de masse est, de plus, en plus utilisée en laboratoire pour le dépistage clinique. Le MALDI-TOF a été utilisé pour le dépistage des infections urinaires (23). Bien qu'on puisse identifier précisément le micro-organisme en cause, la quantification avec ce principe n'est pas possible et ne fonctionne pas pour les infections urinaires polymicrobiennes. L'aspect quantitatif est très important dans le cadre des ITU. Pour une infection urinaire classique c'est-à-dire un patient en santé autre qu'un enfant ou personne immunodéprimé, il faut qu'il y ait au moins 10^5 ufc/mL dans l'échantillon (24).

L'objectif de cette étude était de développer un système semi-quantitatif pour dépister et identifier les microorganismes typiquement présents dans les infections en utilisant une méthode de biologie moléculaire, la PCR en temps réel. Il était jugé important d'identifier plus précisément *E. coli*, la bactérie la plus souvent détectée dans les infections urinaires (25), et *S. agalactiae*, une bactérie souvent recherchée par méthodes moléculaires chez les femmes enceintes (26, 27). Après avoir essayé plusieurs paires d'amorces et sondes ciblant l'ARNr 16S, les objectifs en ciblant l'ARNr 23S, et l'ARNr 28S pour les levures ont été atteints. Un aspect important de ce système a été la détermination d'une valeur seuil obtenue par les Cp qui correspond à $\geq 10^5$ ufc/mL pour définir une bactériurie significative. L'autre objectif de cette étude était d'identifier rapidement le pathogène en cause. Les micro-organismes sont identifiés en fonction de la température de dénaturation (T_m) des sondes obtenue par les courbes de dénaturation.

3.3 MATÉRIEL ET MÉTHODE

3.3.1 Microorganismes

Les bactéries et les levures ont été obtenues de la compagnie ATCC (Manassas, Virginia). *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299), *Proteus mirabilis* (ATCC 12453), *Streptococcus agalactiae* (ATCC 12326), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus*

aureus (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Candida albicans* (ATCC 60193), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 204508) et cultivées sur des géloses non-sélectives. Pour les essais, les bactéries et les levures ont été cultivées pendant 16 à 24 h sur une gélose sang de mouton à 37°C. Une colonie a ensuite été suspendue dans un milieu Nutrient Broth et incubée à 37°C jusqu'à une densité qui correspond au McFarland 2 soit 6.10^8 ufc/mL. Le nombre de microorganismes (ufc/mL) a été confirmé par la méthode de dénombrement sur gélose. En parallèle, 100 µL de bouillon étaient utilisées pour l'extraction.

3.3.2 Éthique

L'étude a été approuvée par le Comité d'Éthique et de la Recherche du CHUS. Les patients adultes consultants pour des troubles urinaires à la clinique médicale de l'Université de Sherbrooke entre le 15 mai et le 15 juin 2014, souhaitant participer à l'étude étaient approchés par les infirmières. Ils devaient signer un formulaire de consentement éclairé, donnant l'autorisation d'utiliser leur échantillon d'urine. 93% des patients étaient des femmes. Les échantillons d'urine étaient conservés à 4°C et récupérés en ≤ 24 h. Certains ont été analysés par le laboratoire clinique de microbiologie du CHUS avant d'être analysés par notre système. La culture d'urine a été réalisée par les techniciennes du laboratoire clinique de microbiologie du CHUS.

3.3.3 Extraction d'ADNg

Cent µL d'échantillon clinique de patient ou de bouillon de micro-organismes *in vitro* étaient mélangés avec 455 µL d'une solution d'extraction EtNa (2,25mM EDTA- Na_2 , 61% EtOH, 200 mM NaOH). Le tout était chauffé à 80 °C pendant 10 minutes puis centrifugé pendant 10 minutes à 13 000 rpm. Le surnageant était retiré et le culot suspendu dans 100 µL de solution de Triton-Tween (10 mM de Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 0,01 % Triton X-100 et 0,002 % Tween 80) (Référence Vingataramin et Frost, soumis).

3.3.4 Conditions de PCR en temps réel

Les premières amorces et sondes utilisées ciblaient l'*ARNr 16S*. Ces amorces et sondes ont été dessinées dans notre laboratoire et produites par la compagnie IDT (Coralville, ID, USA). Une paire d'amorces universelles permettant d'amplifier l'*ARNr 16S* de toutes les bactéries a été utilisée ainsi qu'une sonde universelle et une sonde spécifique pour *E. coli* (voir Tableaux 1 et 2). Chaque PCR contenait 1 µL d'extrait d'ADNg dans 15 µL final de mélange de PCR. Le mélange contenait 7,5 µL de Probe Master (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) 0,7 µM d'amorces sens et 0,07 µM d'amorces anti-sens. Les sondes Universelle et *E. coli* étaient à 0,2 µM. Les conditions de PCR étaient les suivantes : 95°C 10 sec, 55°C 20 sec lecture de la fluorescence, 72°C 20 sec ; suivie d'une courbe de dénaturation : 95°C 5 sec, 55°C 1 min, 45°C à 95 °C à raison de 0,03°C/sec avec 5 acquisitions / °C. Les réactions de PCR ont été effectuées dans le Light Cycler®480 II (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). Ces sondes ne fonctionnaient pas. Elles ne donnaient pas de courbe de Cp et les courbes de T_m étaient inversées, l'*ARNr 23S* a alors été utilisé. Toutes les amorces et sondes ciblant l'*ARNr 23S* ont été dessinées dans notre laboratoire et produite par la même compagnie que précédemment. Une paire d'amorces universelle ciblant l'*ARNr 23S* pour amplifier l'ADNg de toutes les bactéries, une paire d'amorces universelle spécifique aux levures ciblant l'*ARNr 28S*. Chaque PCR contenait 1 µL d'extrait d'ADNg dans 15 µL final de mélange de PCR. Le mélange de PCR contenait 7,5 µL de Probe Master (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) 0,2 µM d'amorces sens et 0,07 µM d'amorces anti-sens ciblant l'*ARNr 23S*, 0,5 µM d'amorces sens et 0,1 µM d'amorces anti-sens ciblant l'*ARNr 28S*. Il y a une seule PCR par échantillon d'urine contenant en plus des 2 paires d'amorces 4 sondes différentes; I) sonde universelle *ARNr 23S*, II) *E. coli*, III) *S. agalactiae*, IV) Levure. Les sondes Universelle et *E. coli* sont à 0,1 µM et les sondes *S. agalactiae*, levures à 0,08 µM. Les conditions de PCR sont les suivantes : 95°C 10 sec, 67 °C 20 sec, 55°C 40 sec lecture de fluorescence, 72°C 40 sec; suivies d'une courbe de dénaturation : 95°C 5 sec, 45 °C 1 min, 45°C à 95°C à raison de 0,03°C/sec avec 5 acquisitions /°C. Les PCR sont effectuées dans le Light Cycler®480 II (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA).

TABLEAU 1 LISTE DES AMORCES UNIVERSELLE UTILISÉES POUR LE DÉPISTAGE DES MICRO-ORGANISMES RESPONSABLES DES INFECTIONS DU TRACTUS URINAIRES

16SUni37F	16S	universelles	5'-TGG CGG CAG GCC TAA CAC ATG CA-3'
16SUni339R1	16S	universelles	5'-AGT CTG GAC CGT GTC TCA GT-3'
Uni23S1926F	23S	universelles	5'-TAA GGT AGC GAA ATT CCT TGT CGG-3'
Uni23S2261R	23S	universelles	5'-GGM GAC CGC CCC AGT YAA AC-3'
28Suni 997F	28S	universelles	5'-AGG ATA GCA GAA GCT CG-3'
28Suni1154R	28S	universelles	5'-CCA CTA AAA GCT CTT CAT TCA-3'

TABLEAU 2 LISTE DES SONDÉS UTILISÉES POUR LE DÉPISTAGE DES MICRO-ORGANISMES RESPONSABLES DES INFECTIONS URINAIRES

16S59F	16S	Universelles	5'-FAM/ACA GGA AGC AGC TTG CTT CTT TGCTGA C/BHQ1/-3'
16S235f	16S	<i>E. coli</i>	5'-FAM/CTA GTA AGG TGG GGT AAC GGC TCA CCT AG/BHQ1/-3'
23Suniv2079R	23S	Universelles	5'-HEX/AGT AAA GGT TCA CGG GGT CTT TCC GTC/BHQ1/-3'
23Scoli2210R	23S	<i>E. coli</i>	5'-ROX/ACG GGC CAA GGT TAG AAC ATC AAA C/BHQ1/-3'
23Sstrep2136R	28S	<i>S. agalactiae</i>	5'-FAM/TAT CAT AGG CTC CTA CCT ATC CTG TAC/BIABkFQ/-3'
28Salbic1092Rb	28S	<i>Levures</i>	5'-FAM/TTG TCC ACG TTC AAT TAA GCA ACA AGG/BIABkFQ/-3'

3.3.5 Témoin interne

Cinq mL d'une culture liquide pur de *S. cerevisiae* contenant 10^6 ufc/mL ont été centrifugés pendant 5 min à 13 000 rpm, le culot était ensuite suspendu dans 50 mL de solution d'extraction EtNa. Ce tampon d'extraction était ensuite utilisé pour l'extraction de l'ADNg des micro-organismes présents dans les échantillons d'urines de façon à faire une extraction simultanée avec le témoin interne.

3.4 RÉSULTATS

Beaucoup d'études visant à dépister des bactéries par PCR en temps réel utilisent des amorces ciblant l'*ARNr 16S*, ce qui a également été fait au départ. Cependant l'*ARNr 16S* étant très similaire entre *E. coli* et les autres entérobactéries, cela laissait peu d'options pour créer des sondes spécifiques. Toutefois des sondes potentielles ont été

conçues, mais, la présence de séquences palindromiques faisait que les sondes prenaient des structures secondaires empêchant l'hybridation de la sonde à sa cible (Résultats non présentés). L'ARNr 23S a été choisi, il est plus long et permet d'avoir suffisamment de différences pour avoir une sonde spécifique pour *E. coli* et *S. agalactiae* ainsi que des régions conservées entre toutes les bactéries permettant d'avoir une sonde universelle, notamment dans la région entre nucléotides 1926 et 2261.

3.4.1 Température d'hybridation (T_m)

La sonde parfaitement homologe à sa cible, comme la sonde *E. coli* avec la bactérie *E. coli*, donne une T_m maximale de 68,9°C pour cet exemple. Cette même sonde avec d'autres bactéries dont la séquence n'est pas identique vont présenter des T_m plus faibles dépendant du nombre et de la nature des différences. Par exemple, *P. mirabilis* a 3 différences (0 transition, 3 transversions) et donne une T_m de 65,4, tandis que *Salmonella enterica* sérotype Typhi présente 2 différences (1 transition, 1 transversion) et donne une T_m de 57,8. *S. aureus* avec 11 différences (4 transversions, 8 transitions) est si différente que la sonde n'hybride pas avec l'amplicon de cette bactérie. Il est ainsi possible de différencier les micro-organismes. Les températures de dénaturation ont été calculées au préalable pour chaque sonde par le logiciel HyTher®⁶ en ajustant la concentration pour les ions divalents à 0,03 μ M et monovalents à 0,5 μ M. Le tableau 3 sert de référence pour déterminer les T_m s des amplicons correspondant aux micro-organismes pouvant être présents dans l'échantillon. Puisque la lecture de la sonde a eu lieu à 55°C, les organismes dont la température d'hybridation était inférieure à cette température ne seront pas détectés lors de l'amplification.

3.4.2 Valeur pour laquelle la bactériurie est significative

De la saline a été inoculé de façon à avoir de 10^8 à 10^3 copies d'ARNr 16S ou 28S dans 100 μ L, puis une extraction de type EtNa a été effectuée sur chaque échantillon.

⁶ <http://ozone3.chem.wayne.edu/cgi-bin/login/login/showLoginPage.cgi?>

L'expérience a été faite en triplicata pour chacun des échantillons. 1 μ L de chaque extrait d'ADNg a été ensuite amplifié comme indiqué précédemment et des courbes de Cp ont été obtenues.

Ces courbes ont permis de connaître la valeur de Cp qui correspond à 10^5 ufc/mL et sert de valeur seuil. La valeur retenue est 26 c'est-à-dire que pour tout $Cp \leq 26$ la bactériurie est significative (voir figure 1).

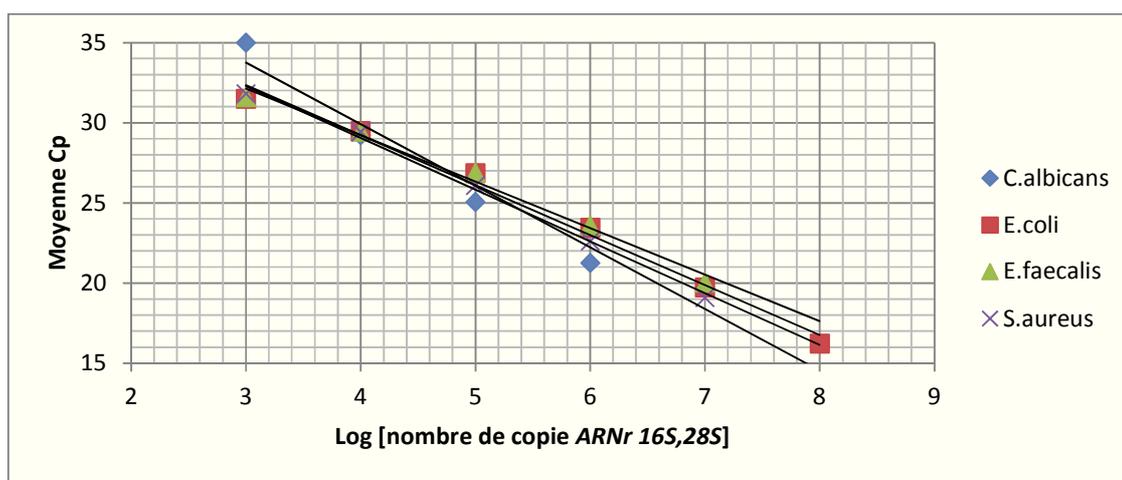


Figure 1 Efficacité de l'extraction et l'amplification des microorganismes à des concentrations différentes. Des bouillons nutritifs contenant des microorganismes après incubation pendant une nuit ont été extraits avec l'EtNa brut. 1 μ L de chaque extrait a été soumis à une PCR pour obtenir des valeurs de Cp.

TABLEAU 3 PRÉDICTION DES T_MS POUR LES DIFFÉRENTS MICRO-ORGANISMES POUVANT ÊTRE À L'ORIGINE D'UNE INFECTION DU TRACTUS URINAIRE EN FONCTION DES DIFFÉRENTES SONDES

	23Suniv2079R	23Scoli2210R	23Sstrep2133R		28Salbic1092Rb
<i>S. boydii</i>	71.0	62.0	39.5		
<i>S. sonnei</i>	71.0	62.0	39.5		
<i>E. coli</i>	71.0	68.9	39.5		
<i>S. typhi</i>	71.0	57.8	39.5		
<i>S. typhimurium</i>	71.0	57.8	39.5		
<i>K. oxytoca</i>	71.0	57.8	39.5		
<i>K. pneumoniae</i>	71.0	61.7	39.5		
<i>P. mirabilis</i>	71.0	65.4	39.5		
<i>A. hydrophila</i>	71.0	61.2	39.5		
<i>P. aeruginosa</i>	71.0	61.2	39.5		
<i>S. aureus</i>	66.4	-	60.0	<i>A. fumigatis</i>	-
<i>S. epidermidis</i>	66.4	-	60.0	<i>R. carinii</i>	-
<i>S. saprophiticus</i>	61.0	-	62.5	<i>C. neoformans</i>	-
<i>E. faecalis</i>	61.0	-	60.9	<i>S. cerevisiae</i>	61.2
<i>E. faecium</i>	61.0	-	62.4	<i>C. glabrata</i>	67.3
<i>S. pyogenes</i>	61.0	-	56.9	<i>C. tropicalis</i>	67.3
<i>S. agalactiae</i>	61.0	-	64.0	<i>C. albicans</i>	67.3
<i>S. pneumoniae</i>	61.0	-	58.0	<i>C. parapsilosis</i>	67.3
<i>C. trachomatis</i>	65.4	-	-	<i>T. vaginalis</i>	-
<i>N. gonorrhoeae</i>	70.7	-	-	Human	-
<i>M. genitalium</i>	68.1	-	-	<i>S. haematobium</i>	-
<i>M. hominis</i>	58.9	-	-		
<i>U. urealyticum</i>	62.1	-	-		

3.4.3 Essais *in vitro*

Des essais sur plusieurs micro-organismes connus à l'avance ont été réalisés. La figure 2 montre les courbes de Cp et de T_m obtenues avec les amorces universelles et les différentes sondes. L'utilisation des sondes a permis la distinction des différents micro-organismes grâce à leur T_m en n'identifiant spécifiquement que le microbe avec une homologie parfaite. Les courbes de Cp donnaient une valeur semi-quantitative de la quantité de bactéries présentes, ce qui a permis de savoir si oui ou non la bactériurie était significative ce qui atteste d'une infection positive. Le tableau 4 montre les résultats obtenus pour les différentes sondes. La présence d'ADN contaminant était apparente, notamment dans la Figure 2 C où les Cps faibles sont visibles.

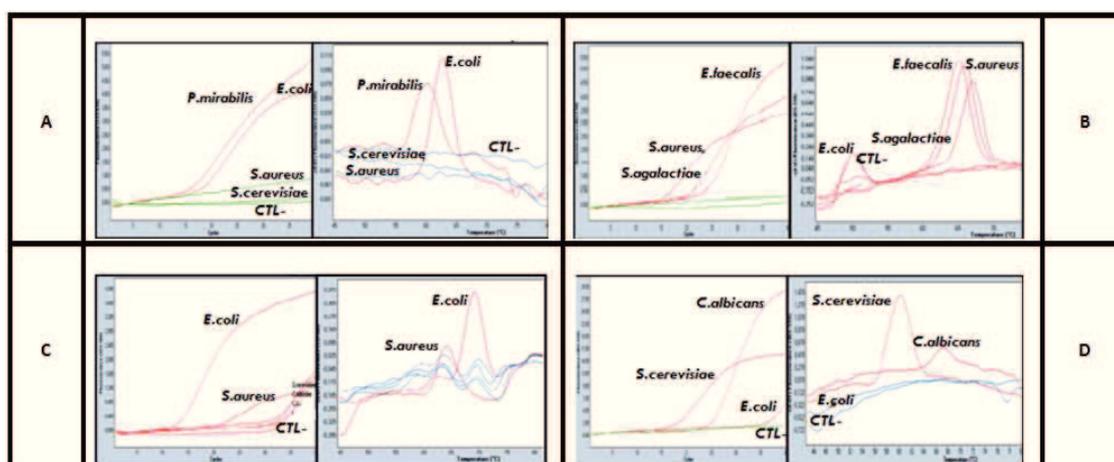


Figure 2 Courbes de C_p et T_m obtenues avec le système de dépistage des ITU mis au point au laboratoire Dépistage des micro-organismes avec A) La sonde *E. coli*, B) La sonde *S. agalactiae*, C) La sonde Universelle, D) La sonde Levure.

TABLEAU 4 COMPARAISON DES TEMPÉRATURES D'HYBRIDATION OBTENUES POUR LES DIFFÉRENTES SONDES AVEC LES TEMPÉRATURES CALCULÉES

	23Scoli2210R			23Sstrep2133R			23SUniv2079R			28Salbic1092R		
	Cps	Tm attendues	Tm obtenues	Cps	Tm attendues	Tm obtenues	Cps	Tm attendues	Tm obtenues	Cps	Tm attendues	Tm obtenues
<i>E. coli</i>	18,73	68,9	62,7				13,78	71	69,2			
<i>S. aureus</i>				16,13	60	65	21,34	66,4	64			
<i>P. mirabilis</i>	18,13	61,2	60,4				17,64	71	69,4			
<i>E. faecalis</i>				21,52	60	65,73	19,7	61	60,2			
<i>S. agalactiae</i>				15,2	64	66,2	16,3	61	63,27			
<i>S. cerevisiae</i>							32,52		50,1	18,48	61,2	60,8
<i>C. albicans</i>							33,33		50,1	25,84	67,3	67,7
CTL-							32,74		50,1			

3.4.4 Essais sur des échantillons cliniques

73% des échantillons reçus ont subi une culture d'urine par le laboratoire de microbiologie du CHUS, les autres échantillons ont été analysés par bandelettes urinaires ou par le thermocycleur Cobas (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). Le

thermocycleur Cobas® est en temps réel et permet le dépistage de la *Chlamydia trachomatis*, et *Neisseria gonorrhoeae*.

Parmi les résultats obtenus pour les échantillons ayant subi une culture d'urine (voir figure 4) on note la présence des micro-organismes *Enterococcus sp.* et *C. albicans*. Bien qu'ils aient été identifiés, il faut savoir que le nombre présent dans ces échantillons était $\leq 10^5$ ufc/mL. Par conséquent, l'échantillon possédait une bactériurie non significative pour être pris en compte par notre technique. Les échantillons qui n'ont pas subi de culture d'urine ont également été analysés par la PCR. Il est intéressant de noter que pour les échantillons analysés par bandelette urinaire et avec la PCR pour *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae*, on a détecté la présence d'*E. coli* avec un Cp ≤ 26 (voir échantillon 4 et 10 de la figure 4).

Un Cp d'environ 29 (voir figure 4) est noté pour l'amplification du témoin interne qui se fait en même temps que l'amplification de l'extrait d'ADNg qui était présent dans l'échantillon d'urine. Le Cp relativement constante du témoin interne prouve que l'extraction de l'échantillon et la PCR se sont déroulés dans de bonnes conditions et la PCR était exempte d'inhibition.

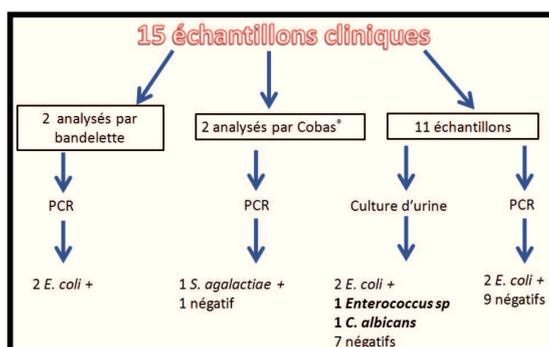


Figure 3 Distribution des 15 échantillons cliniques d'urines en fonction des différents tests. *Enterococcus sp.* et *C. albicans* charge bactérienne $\leq 10^5$ ufc/mL donc ITU négative.

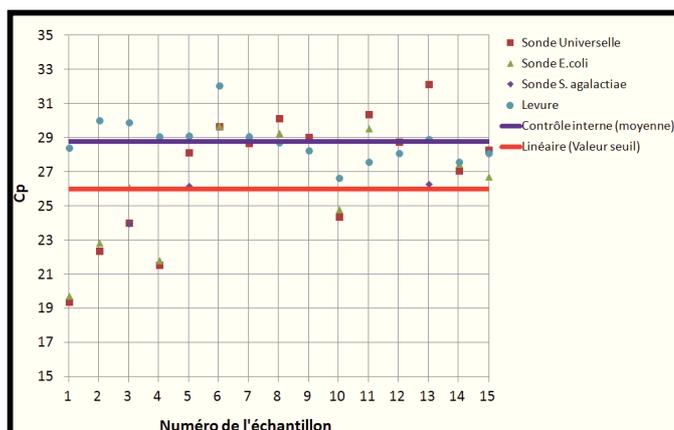


Figure 4 Répartition des échantillons en fonction des Cp obtenus

3.5 DISCUSSION

Dans le but d'avoir les résultats plus rapidement de l'analyse d'urines d'un patient soupçonné d'avoir une infection urinaire, nous avons mis au point une PCR en temps réel, pour aider au diagnostic. Une réaction en chaîne par polymérase multiplexe semi-quantitative a permis l'amplification et la détection concomitante des bactéries et de levures en une seule réaction par échantillon. Les urines sans bactéries ou levures pourront ainsi être identifiées en quelques heures et éviter une culture et surtout un traitement. Grâce à la sonde spécifique pour *E. coli*, les bactériuries causées par cette bactérie, de loin le plus fréquemment observées en cliniques, pourront également être positivement identifiées.

Souvent un antibiotique est choisi de façon empirique pour soulager un patient rapidement lors d'une infection possible, cependant cette procédure peut comporter des risques. En effet, l'utilisation d'un antibiotique non adapté peut entraîner des effets secondaires (28). Il est également connu que l'utilisation non appropriée des antibiotiques conduit à l'apparition de résistances chez les bactéries (29).

Notre méthode permet la détection de la plupart des bactéries et levures responsables des infections chez l'homme. Beaucoup d'études utilisent l'*ARNr 16S* pour des études phylogénétiques, ici le gène ciblé est l'*ARNr 23S* pour les procaryotes et *28S* pour les

levures. Les études antérieures n'ont pas su obtenir des T_m pour mieux caractériser les résultats positifs, alors elles ont du utiliser une multitude de sondes. Notre méthode permet d'avoir à la fois des courbes de C_p et des courbes de T_m avec des sondes d'hydrolyse et des amorces utilisées à des concentrations asymétriques. L'amorce qui fabrique le brin colinéaire à la sonde et qui dégrade la sonde pour créer le signal est moins concentré que la sonde. Ainsi quand il est épuisé il reste encore de la sonde, ce qui permet l'utilisation de cette sonde pour l'hybridation avec son brin complémentaire, fabriqué par l'autre amorce qui est en plus forte concentration. Cette méthode est appelée le Taq T_m Probing.

L'aspect quantitatif est très important pour ce genre d'infection, car pour une ITU classique le nombre de micro-organismes présent doit être $\geq 10^5$ ufc/mL pour que la bactériurie soit significative (30).

Des courbes étalons ont permis de connaître la valeur de C_p qui correspond à 10^5 ufc/mL et sert de valeur seuil. La valeur retenue est 26 c'est-à-dire que pour tout C_p inférieur ou égale à 26 la bactériurie est significative (voir figure 1).

Il est important de contrôler l'extraction et l'amplification des acides nucléiques, surtout pour des analyses réalisées dans un laboratoire clinique, avec un témoin interne (Références). Un témoin interne a été ajouté dans le tampon utilisé pour l'extraction de l'ADNg pour contrôler simultanément l'extraction et le processus de la PCR. Le témoin interne choisi est *Saccharomyces cerevisiae* car, il est connu que la paroi des levures (31) est beaucoup plus difficile à lyser que la paroi des bactéries Gram + et Gram -. Par conséquent si on obtient l'ADNg de *S. cerevisiae* il n'y a aucune raison pour que l'ADNg des bactéries et autres levures pouvant être présent dans l'échantillon ne puisse pas être obtenues. Le témoin interne permet également de vérifier si l'amplification de PCR s'est bien déroulée. La sonde est spécifique pour *C. albicans*, pathogène pour l'homme et pour *S. cerevisiae* non pathogène. Un T_m de 67,3°C pour *C. albicans* versus 61,2°C pour *S. cerevisiae* sont observées ce qui évite toute confusion. De plus, le témoin interne est ajouté à une concentration inférieure à 10^5 ufc/ml pour donner un C_p supérieur à 26 et ne pas se confondre avec une infection.

Les résultats pour le dépistage et l'identification des micro-organismes obtenue avec notre système ont été comparés avec les résultats obtenus par le laboratoire clinique de microbiologie du CHUS avec la méthode standard. Avec la méthode élaboré, les résultats sont disponibles au bout de 3 h et contrairement à d'autres études, ce système permet la distinction des bactériuries symptomatique, asymptomatique et des candiduries et ce, grâce à une réaction par échantillon.

Ce système permet d'éviter la culture d'urine pour près de 90% des échantillons soit 40-60% d'échantillons dont la quantité de micro-organismes présente n'est pas significative, 20-30% d'infections urinaires due à *E. coli* (car ils recevront un traitement standard pour *E. coli* et un antibiogramme ne sera demandé que si le traitement échoue) et 10% d'échantillons contenant des bactéries Gram + (car habituellement les bactéries Gram + ne sont pas identifiées). De surcroit, l'utilisation d'une sonde spécifique pour le Streptocoque du groupe B (SGB) permet de dépister les femmes enceintes pour une infection urinaire et permet de savoir si elles sont porteuses du SGB. Il est très important de dépister les femmes enceintes pour le SGB car ce dernier peut être transmis au nourrisson et être responsable de la pneumonie, méningite et septicémie néonatale (32, 26). Une étude a démontré que 30 à 50% des nouveau-nés atteints d'une infection précoce à SGB manifestaient des problèmes à long-terme, parfois très sérieux tels qu'un retard des fonctions mentales, la quadriplégie ou des problèmes de surdité (33) d'où l'importance de dépister la mère.

Une différence entre le T_m attendue et le T_m obtenue a été notée, cependant cela ne pose pas de problème pour la distinction et l'identification des micro-organismes autre que celle visées spécifiquement (*E. coli* et *S. agalactiae*), car ce T_m ne permet l'identification précise de ces microbes et il faudra les identifier par la culture. Un contrôle positif avec *E. coli* et *S. agalactiae* doit être testé avec chaque série d'analyses afin d'identifier leur T_m pour l'analyse. La différence entre le T_m obtenue et le T_m attendue peut s'expliquer par les conditions ioniques, la présence de détersif, ou encore la conformation secondaire que peut prendre l'amplicon. Bien que les conditions entrées dans le logiciel HyTher[®] soient les

plus précises possibles, l'utilisation de mélanges fabriqués par une compagnie fait que les composants, conditions et concentrations présentes ne sont pas connus avec précision.

Il est vrai que l'analyse des échantillons est plus dispendieuse en utilisant la PCR en temps réel couplée avec des sondes, cependant cette méthode permet d'éviter la culture pour près de 90% des échantillons, le temps technique est moindre ce qui permet de faire des économies considérables. Le coût de notre méthode est d'environ 2\$ par échantillon comprenant à la fois l'extraction ainsi que l'analyse par PCR versus 0,5\$ pour les boîtes de Pétri et tubes utilisés pour la culture d'urine. Une version commerciale coutera sans doute au tour de 6\$ à 10\$ comme les analyses de *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* également vendues pour des débits d'analyse élevés. Présentement le laboratoire clinique du CHUS utilise le VITEK 2® de la compagnie BioMérieux pour identifier les bactéries et faire l'antibiogramme pour un coût d'environ 6\$ par échantillon. L'utilisation d'automates commerciaux oblige souvent à utiliser des troussees commerciales de la même compagnie qui sont souvent très dispendieuses ce qui augmente considérablement les coûts de l'analyse.

Il n'est pas encore possible de faire une PCR à prix raisonnable pour le dépistage des ITU, mais l'utilisation de la PCR couplé avec notre méthode TaqT_m probing et notre méthode d'extraction maison EtNa permettra de diminuer le temps technique, les coûts et de devenir compétitif avec beaucoup d'automates. Notre système ne permet pas de détecter les résistances aux antibiotiques pour le moment. Pour cette étape, la culture de micro-organismes peut être encore requise. Toutefois l'utilisation de ce système permet d'avoir les résultats dans la même journée et de traiter de façon adaptées le patient et ce sans délais. Même si le système a fait ses preuves sur des échantillons *in vitro* et sur quelques échantillons cliniques, le nombre d'échantillons cliniques obtenus est trop faible et par conséquent pas représentatif pour faire une conclusion sur la sensibilité spécificité et efficacité de la méthode. Il est impossible actuellement d'affirmer que ce système peut remplacer la culture d'urine utilisée au laboratoire clinique de microbiologie. Cependant les résultats préliminaires obtenus sont encourageants et laissent penser que le système à un

bon potentiel et pourrait être une alternative pour améliorer ou compléter le diagnostic des ITU permettant de prescrire dans la même journée un antibiotique de choix aux patients.

3.6 REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient la clinique médicale de l'université de Sherbrooke pour sa précieuse participation à l'étude, les techniciennes du laboratoire clinique de microbiologie du CHUS pour nous avoir aidés dans le projet en nous réservant les échantillons d'urines, Stéphanie Mauler, Geneviève Giroux, Evelyne Benoit, Patrick Dextras-Paquette et Karine Bourgade, pour leurs supports pour les expériences et discussions.

RÉFÉRENCES

1. **Avolio, M, Diamante, P, Modolo, ML, De Rosa, R, Stano, P, Camporese, A.** 2014. Direct Molecular Detection of Pathogens in Blood as Specific Rule-In Diagnostic Biomarker in Patients With Presumed Sepsis - Our Experience on a Heterogeneous Cohort of Patients With Signs of Infective SIRS. *Shock*. .
2. **Enderle, JL, Miller, AL, Pyles, RB.** 2013. Quantification of Bacterial Uropathogens in Preclinical Samples Using Real-Time PCR Assays. *Curr. Microbiol.* .
3. **Rozales, FP, Machado, AB, DE Paris, F, Zavascki, AP, Barth, AL.** 2013. PCR to detect Mycobacterium tuberculosis in respiratory tract samples: evaluation of clinical data. *Epidemiol. Infect.* 1-7.
4. **Russo, TA, Johnson, JR.** 2003. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to Escherichia coli: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect.* **5**:449-456.
5. **Foxman, B, Brown, P.** 2003. Epidemiology of urinary tract infections: transmission and risk factors, incidence, and costs. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **17**:227-241.
6. **Peleg, AY, Hooper, DC.** 2010. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N. Engl. J. Med.* **362**:1804-1813.
7. **Ronald, AR, Nicolle, LE, Stamm, E, Krieger, J, Warren, J, Schaeffer, A, Naber, KG, Hooton, TM, Johnson, J, Chambers, S, Andriole, V.** 2001. Urinary tract infection in adults: research priorities and strategies. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **17**:343-348.
8. **Bhat, RG, Katy, TA, Place, FC.** 2011. Pediatric urinary tract infections. *Emerg. Med. Clin. North Am.* **29**:637-653.
9. **Andreu, A, Cacho, J, Coira, A, Lepe, JA.** 2011. Microbiological diagnosis of urinary tract infections. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **29**:52-57.
10. **Broeren, MA, Bahceci, S, Vader, HL, Arents, NL.** 2011. Screening for urinary tract infection with the Sysmex UF-1000i urine flow cytometer. *J. Clin. Microbiol.* **49**:1025-1029.
11. **Okada, H, Sakai, Y, Miyazaki, S, Arakawa, S, Hamaguchi, Y, Kamidono, S.** 2000. Detection of significant bacteriuria by automated urinalysis using flow cytometry. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2870-2872.

12. **Jolkkonen, S, Paattiniemi, EL, Karpanoja, P, Sarkkinen, H.** 2010. Screening of urine samples by flow cytometry reduces the need for culture. *J. Clin. Microbiol.* **48**:3117-3121.
13. **Duerden, BI, Moyes, A.** 1976. Comparison of laboratory methods in the diagnosis of urinary tract infection. *J. Clin. Pathol.* **29**:286-291.
14. **Antwi, S, Bates, I, Baffoe-Bonnie, B, Critchley, J.** 2008. Urine dipstick as a screening test for urinary tract infection. *Ann. Trop. Paediatr.* **28**:117-122.
15. **Lehmann, LE, Hauser, S, Malinka, T, Klaschik, S, Stuber, F, Book, M.** 2010. Real-time polymerase chain-reaction detection of pathogens is feasible to supplement the diagnostic sequence for urinary tract infections. *BJU Int.* **106**:114-120.
16. **Hansen, WL, van der Donk, CF, Bruggeman, CA, Stobberingh, EE, Wolffs, PF.** 2013. A real-time PCR-based semi-quantitative breakpoint to aid in molecular identification of urinary tract infections. *PLoS One.* **8**:e61439.
17. **Gray, TJ, Kong, F, Jelfs, P, Sintchenko, V, Chen, SC.** 2014. Improved identification of rapidly growing mycobacteria by a 16S-23S internal transcribed spacer region PCR and capillary gel electrophoresis. *PLoS One.* **9**:e102290.
18. **Yadegar, A, Alebouyeh, M, Lawson, AJ, Mirzaei, T, Nazemalhosseini Mojarad, E, Zali, MR.** 2014. Differentiation of non-pylori *Helicobacter* species based on PCR-restriction fragment length polymorphism of the 23S rRNA gene. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **30**:1909-1917.
19. **Huang, CH, Chang, MT, Huang, L, Chua, WS.** 2014. Molecular discrimination and identification of *Acetobacter* genus based on the partial heat shock protein 60 gene (hsp60) sequences. *J. Sci. Food Agric.* **94**:213-218.
20. **Marschal, M, Wienke, M, Hoering, S, Autenrieth, IB, Frick, JS.** 2012. Evaluation of 3 different rapid automated systems for diagnosis of urinary tract infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **72**:125-130.
21. **Milagro, A, Moles, B, Seoane, A, Navascues, J, Blasco, M, Garcia-Moya, JB.** 1999. UTIscreen versus UROQUICK: two semiautomatic systems for bacteriuria detection. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **17**:398-400.
22. **van der Zwet, WC, Hessels, J, Canbolat, F, Deckers, MM.** 2010. Evaluation of the Sysmex UF-1000i(R) urine flow cytometer in the diagnostic work-up of suspected urinary tract infection in a Dutch general hospital. *Clin. Chem. Lab. Med.* **48**:1765-1771.
23. **Burillo, A, Rodriguez-Sanchez, B, Ramiro, A, Cercenado, E, Rodriguez-Creixems, M, Bouza, E.** 2014. Gram-stain plus MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption

Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) for a rapid diagnosis of urinary tract infection. *PLoS One*. **9**:e86915.

24. **Nicolle, LE, Bradley, S, Colgan, R, Rice, JC, Schaeffer, A, Hooton, TM, Infectious Diseases Society of America, American Society of Nephrology, American Geriatric Society.** 2005. Infectious Diseases Society of America guidelines for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults. *Clin. Infect. Dis.* **40**:643-654.

25. **Behzadi, P, Behzadi, E, Yazdanbod, H, Aghapour, R, Akbari Cheshmeh, M, Salehian Omran, D.** 2010. A survey on urinary tract infections associated with the three most common uropathogenic bacteria. *Maedica (Buchar)*. **5**:111-115.

26. **Le Doare, K, Heath, PT.** 2013. An overview of global GBS epidemiology. *Vaccine*. **31 Suppl 4**:D7-12.

27. **Atkins, KL, Atkinson, RM, Shanks, A, Parvin, CA, Dunne, WM, Gross, G.** 2006. Evaluation of polymerase chain reaction for group B streptococcus detection using an improved culture method. *Obstet. Gynecol.* **108**:488-491.

28. **Elhanan, G, Sarhat, M, Raz, R.** 1997. Empiric antibiotic treatment and the misuse of culture results and antibiotic sensitivities in patients with community-acquired bacteraemia due to urinary tract infection. *J. Infect.* **35**:283-288.

29. **McQuiston Haslund, J, Rosborg Dinesen, M, Sternhagen Nielsen, AB, Llor, C, Bjerrum, L.** 2013. Different recommendations for empiric first-choice antibiotic treatment of uncomplicated urinary tract infections in Europe. *Scand. J. Prim. Health Care*. **31**:235-240.

30. **Arinzon, Z, Shabat, S, Peisakh, A, Berner, Y.** 2012. Clinical presentation of urinary tract infection (UTI) differs with aging in women. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **55**:145-147.

31. **Lipke, PN, Ovalle, R.** 1998. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J. Bacteriol.* **180**:3735-3740.

32. **Feitosa, DC, da Silva, MG, de Lima Parada, CM.** 2009. Accuracy of simple urine tests for diagnosis of urinary tract infections in low-risk pregnant women. *Rev. Lat. Am. Enfermagem*. **17**:507-513.

33. **Foxman, B.** 2003. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Dis. Mon.* **49**:53-70.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

L'ITU est considérée comme l'infection bactérienne la plus fréquente (Nicolle, 2013). Cependant il est difficile de connaître précisément l'incidence car elle ne fait pas partie des Maladies à déclarations obligatoires MADO. L'ITU représente 10,5 millions de visites ambulatoires aux États-Unis parmi lesquels 21,3% sont des visites aux urgences (Foxman, 2014). 50% des femmes développeront une ITU au cours de leur vie (Foxman, 2010) car, elles y sont plus vulnérables. Hormis les femmes, les enfants, les personnes avec des malformations du rein ou de l'arbre uréthro-vésical, les femmes enceintes, les personnes âgées, les personnes portant des sondes, cathéters, les diabétiques, les personnes immunosupprimées sont également des groupes à risques. Ce qui fait que l'ITU est l'infection la plus commune et représente 25% de toutes les infections (Foxman, 2003). Les coûts impliqués pour les ITU acquis en communautés sont importants : environ 1,6 milliard par année sont imputés au budget de la santé aux États-Unis (Foxman, 2014). Bien que le taux de mortalité associé à l'ITU soit faible, la fraction des septicémies ou septicémies sévères causées par une ITU est respectivement de 0,25 et 0,12 (Alberti *et al.*, 2005). Pour éviter de telles complications, un traitement de choix, sans délais, est nécessaire. Cependant due au temps requis pour identifier le pathogène en utilisant la méthode standard qui est la culture d'urine, il est souvent prescrit un traitement empirique pour soulager rapidement le patient. Dans le cas où le traitement prescrit n'est pas approprié, certaines complications peuvent apparaître.

4.1 MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE D'EXTRACTION UNIVERSELLE

La première étape du projet a été de mettre au point une méthode d'extraction qualifiée d'universelle, car capable d'extraire l'ADNg des bactéries Gram -, Gram + et des levures et ce, avec une efficacité similaire. La méthode mise au point est appelée EtNa, c'est une méthode alcaline, Na symbolisant le NaOH, avec une précipitation à l'éthanol donc Et pour l'éthanol. La symbolique du volcan EtNa suggère aussi la chaleur de la lave et

dans notre procédure il faut chauffer le mélange à 80°C. Dans le tampon d'extraction mis au point dans notre laboratoire l'agent alcalin utilisé est le NaOH qui aide à lyser la paroi cellulaire. Cependant lors de cette procédure, le NaOH va également rompre les liens hydrogènes entre les bases d'ADN ce qui fait qu'on obtient un ADNg simple brin. L'obtention d'ADNg simple brin peut être contraignante pour certaines méthodes, comme la digestion aux enzymes de restriction, mais cela est avantageux pour son utilisation en PCR. En effet, l'une des premières étapes de la PCR consiste à augmenter la température dans le but de dénaturer l'ADN. L'ADN étant déjà dénaturé fera que cette étape sera plus rapide qu'avec un ADN double brin. Le NaOH va également dégrader l'ARN, ce qui fait que EtNa n'est pas appropriée pour l'extraction de l'ARN. L'ajout de 70% d'éthanol au mélange permet la précipitation et le dessalage de l'ADN, mais aussi contribue à la déshydratation de la paroi des microorganismes améliorant l'action du NaOH. Les acides nucléiques sont hydrophiles donc solubles dans l'eau et interagissent ensemble de façons électrostatiques. Cependant, l'ADN est très peu soluble dans l'éthanol. Par conséquent en présence de 70% d'éthanol l'ADN sort de la solution et les sels solubles restent dans le surnageant. L'éthanol va déranger la bicouche lipidique et le pH alcalin va dénaturer les protéines permettant la libération de l'ADNg. On obtient alors un extrait semi-purifié.

Dans le but d'avoir la méthode la plus efficace possible, plusieurs paramètres ont été variés dont la température à laquelle le mélange a été chauffé. Deux températures ont été testées, 70°C qui est la température la plus souvent utilisée dans les protocoles d'extraction et 80°C. Les meilleurs résultats ont été obtenus en chauffant le mélange à 80°C.

La méthode EtNa est utilisable pour de nombreux échantillons cliniques. Cependant l'absence d'étapes de purification pour certains échantillons peut être un problème dû aux inhibiteurs de la PCR pouvant être présent dans les extraits tels que les selles ou le sang (Demeke & Jenkins, 2010). Cette méthode a été utilisée pour la mise au point du dépistage du SARM et du ERV par méthode moléculaire. Des bouillons de culture supplémenté en selles étaient extraits sans étape de purification pour ces échantillons suite à une analyse par la PCR en temps réel un Cp de 35 était observé. Avec l'étape de purification, pour les mêmes échantillons un Cp de 28 était obtenu.

L'intégrité et la pureté de l'ADN provenant des microorganismes sont primordiales pour certaines analyses biologiques par la PCR qui est de plus en plus utilisée pour le diagnostic clinique (Avolio *et al.*, 2014; Rozales, *et al.*, 2013; Tachikawa *et al.*, 2013). Il existe plusieurs protocoles permettant l'extraction de l'ADNg provenant des microorganismes respectant ces critères. Cependant, il faut souvent adapter la méthode utilisée aux microorganismes présents dans l'échantillon. Pour certains dépistages tels que le dépistage des patients porteurs du *SARM*, cela ne cause pas de problème car, le type de bactéries recherchées est connu au préalable. Mais, dans le cas d'une ITU, une septicémie ou une pneumonie plusieurs microorganismes peuvent être en cause, donc l'utilisation de ces procédures ne convient pas. Depuis environ 2 décennies, deux procédures ont dominé l'extraction et ont été la base pour de nouvelles procédures commerciales. En 1987, P. Chomczynski a mis en place un protocole d'extraction de l'ARN permettant également l'extraction de l'ADN et des protéines dans certaines conditions. Cette méthode appelée extraction thiocyanate-guanidinium phénol-chloroforme permet l'obtention des extraits en 4 heures. L'extraction se fait en phase liquide, une phase aqueuse supérieure contenant l'ADN et l'ARN, une phase organique inférieure contenant le phénol et le chloroforme et une interphase contenant protéines, polysaccharides et lipides. Le thiocyanate de guanidinium qui est ajouté à la phase organique est un agent chaotrope et permet la dénaturation des protéines. Suite à cela, les acides nucléiques se retrouvent dans la phase aqueuse et les protéines à l'interphase ou en phase organique. Le pH de la solution est ajusté au préalable en fonction de l'acide nucléique ciblé car à pH acide, l'ADN est aussi retenu dans l'interphase (Chomczynski & Sacchi, 1987). L'autre méthode permet l'obtention de l'ADN. Le principe repose sur la capacité des agents chaotropes à lyser les cellules, inactiver les nucléases et permettre la liaison de l'ADN sur des billes de silices (Boom *et al.*, 1990). L'atout de cette méthode est qu'elle permet l'obtention d'un extrait purifié. Cependant, ces méthodes sont fastidieuses et ne permettent pas d'extraire l'ADN des levures, ce qui est un problème pour les infections pouvant être causées par ces pathogènes. L'extraction d'ADN des bactéries Gram + exige aussi un protocole différent de celui des bactéries Gram -.

Les méthodes d'analyse du génome ont été beaucoup améliorées ces dernières années cependant il y a eu très peu de progrès concernant les méthodes d'extraction de l'ADN qui est une étape majeure pour beaucoup d'analyses utilisant les principes de biologie moléculaire. Les différents microbiotes présents chez l'humain sont composés de plusieurs microorganismes différents. L'étude de ces microbiotes nécessite une méthode d'extraction d'ADNg qui a la même efficacité d'extraction pour tous les microorganismes. En effet, l'utilisation d'une méthode d'extraction ayant une efficacité d'extraction différente en fonction des microorganismes introduirait des biais dans l'analyse tels que la proportion et le type de microorganismes réellement présents (Flores *et al.*, 2012).

La méthode EtNa est une méthode simple d'utilisation, qui n'implique pas de produits nocifs qui seraient difficilement utilisable au laboratoire clinique, le prix par extrait est modique, une étape de purification permet à la fois d'écarter les inhibiteurs souvent présents dans les échantillons cliniques et l'automatisation et surtout permet la lyse et l'obtention de l'ADN g de tous les microorganismes avec une efficacité similaire.

4.1.1 Purification de l'ADNg

Une étape de purification sur colonne de silice a été utilisée. L'utilisation de billes de silices pour la purification des acides nucléiques a été décrit en premier par Boom, 1990. Le principe repose sur la propriété de l'ADN à se lier sur les billes de silices en présence de sels chaotropes. L'utilisation de sels chaotropes peut être dangereuse. Par exemple, la mise en contact du guanidine de thiocyanate avec de l'eau de javel forme du cyanure qui est un composé volatil et très toxique. De ce fait, l'utilisation de ces sels peut être contraignante dans un laboratoire clinique de microbiologie ou l'eau de javel est souvent utilisée pour inactiver les microorganismes.

L'un des objectifs du projet était aussi d'avoir une méthode d'extraction qui serait automatisable. Donc l'extraction EtNa a été utilisée avec des billes de silices. L'utilisation d'agents chaotropes avec la méthode EtNa, la modification du pH, la température et plusieurs autres paramètres ont été essayés sans aboutir à des résultats concluants. Au bout de plusieurs essais, il a été remarqué que l'ajout d'une certaine concentration d'EDTA-Na₂

au mélange de NaOH éthanol permettait également la liaison de l'ADN aux billes de silices, malheureusement le mécanisme n'est pas connu.

En plus de permettre d'écartier les éventuels inhibiteurs de PCR et la perte du culot, l'utilisation de colonne de silice permet l'automatisation de la méthode d'extraction par un robot pipetteur possédant une chimie ouverte. L'automatisation d'une telle méthode permettrait une diminution des erreurs et des tendinites évitant ainsi de changer les techniciennes de banc de travail aux deux semaines. L'utilisation de techniques contenant plusieurs étapes de centrifugation est une contrainte dans les laboratoires cliniques où plusieurs centaines d'échantillons doivent être analysés par jours. Le volume à centrifugé est souvent dans un contenant (tube vissé, micro-tube...) qui nécessite une ouverture et fermeture en plus des pipetages à répétitions ce qui n'est pas ergonomique.

Il va de soi que les techniques nécessitant des étapes de centrifugation sont également difficiles à automatiser, car à ce jour il n'existe aucun automate avec une centrifugeuse intégrée.

Il existe à l'heure actuelle plusieurs trousse commerciales d'extraction d'ADNg utilisable sur un robot tel que le NucliSENS® easyMAG® de la compagnie Biomérieux, qui permet l'extraction de l'ADNg, cependant dans le cas d'une ITU il faudrait faire trois fois l'extraction, c'est-à-dire une extraction de type +, Gram - et levure ce qui multiplie les coûts de l'analyse par trois et ces trois extraits doivent être analysés ce qui multiplie encore les coûts. L'utilisation de la méthode EtNa est donc une révolution et permet de contourner tous ces problèmes car une extraction unique par échantillon est nécessaire. La méthode d'extraction EtNa a été testée sur des bouillons bactériens, sur des échantillons contenant des selles, sur des virus et des échantillons d'urines.

4.1.2 Tampon de solubilisation de l'ADNg

Lorsqu'un extrait d'ADN est immédiatement utilisé pour d'autres expériences ou analyses, il est nécessaire qu'il soit solubilisé rapidement, car l'extrait est utilisé tout de

suite après l'extraction. Certains tampons de solubilisation nécessitent une nuit à 4°C pour la solubilisation du culot. Si le culot n'est pas solubilisé complètement cela peut fausser nos résultats de PCR car la quantité d'ADN prélevé ne sera pas la quantité réellement présente.

Selon les expériences du Dr Frost et de Mme Deslandes, le laboratoire clinique du CHUS utilisait une solution contenant 1 % de Triton-X-100 et 0,5 % de tween-20 qui sont deux détergents non ioniques. Le triton-X-100 permet de briser les associations protéine-lipide, lipide-lipide mais pas protéine-protéine et ne dénature pas non plus les protéines. Le Tween 20 est un surfactant composé d'une partie lipophile et apolaire qui retient les matières grasses et une partie hydrophile qui est polaire. Il permet la solubilisation de deux phases non miscibles. Cette solution comprend également une solution de Tris-HCl et EDTA-Na₂ pour maintenir le pH à 8. Toutes ces propriétés mises ensemble font que le tampon de solubilisation Triton-Tween (T-T) permet une solubilisation rapide du culot d'ADNg.

Toutefois il a été remarqué que la présence de 5 à 10 µL de la solution d'extraction lors du retrait du surnageant perturbait la PCR. Pour éviter cette inhibition, la solution a été modifiée de manière à ce qu'elle ait un plus grand pouvoir tampon. En augmentant la concentration du Tris-HCl de 5 fois et en diminuant de 10 fois la concentration d'EDTA-Na₂, un volume contaminant de 20 µL de solution d'extraction EtNa n'inhibe pas significativement la PCR. En utilisant l'étape de purification, l'ADNg est efficacement solubilisé par les tampons utilisés pour récupérer l'ADN des colonnes de silice.

4.1.3 EtNa extraction d'ADNg universelle

Pour apprécier l'efficacité de la méthode d'extraction EtNa, elle a été comparée à plusieurs méthodes d'extraction retrouvée dans la littérature mais aussi des kits commerciaux. Les Cps obtenus après amplification par PCR en temps réel ont été utilisés comme témoin d'une efficacité similaire. Il a été considéré qu'ils ne devront pas varier par plus de 1,5 cycles. Plus la charge de microorganismes de départ est élevée plus la valeur de Cp est faible et pour une même charge de microorganismes au départ le Cp doit être

quasiment le même si l'extraction est aussi efficace. Si des variations de plus de 1,5 sont observées entre les Cp cela voudrait dire que l'efficacité n'est pas la même.

L'extraction avec la trousse commerciale QiAamp DNA mini kit de la compagnie Qiagen® et ChargeSwitch de la compagnie Lifetechnologies® donnent des Cps similaires en comparant leur efficacité d'extraction pour les bactéries Gram - ou, en utilisant le protocole suggéré pour les bactéries Gram +.

Contrairement au kit de la compagnie Qiagen® ou autre, un seul protocole EtNa donne des Cps similaires, peu importe le microorganisme étudié, y compris les levures. La méthode EtNa à l'avantage d'être peu coûteuse, d'utiliser des réactifs peu nocifs qui peuvent être utilisés sans aucun problème dans un laboratoire clinique contrairement à l'extraction faisant intervenir la guanidine isothiocyanate ou le phénol-chloroforme. L'extrait est obtenu en moins de 20 minutes et prêt à être utilisé dans une PCR.

4.1.4 Une méthode d'extraction simple basée sur le PEG pour extraire rapidement

l'ADNg des bactéries Gram + et Gram -

Cette méthode d'extraction est basée sur la méthode mise au point par P. Chomczynski et al., (Chomczynski, P. *et al.*, 2006) faisant intervenir un mélange alcalin additionné de polyéthylène glycol 200 (PEG 200).

Telle que présenté dans l'article, cette méthode ne comporte pas d'étape de centrifugation. Cependant, pour 100 µL d'échantillon de départ il faut mettre 10 fois plus de tampon d'extraction ce qui peut être une contrainte pour l'analyse d'échantillons cliniques car, l'échantillon est trop dilué. Dans certaines infections, la charge de microorganismes présents est faible et la dilution d'un tel échantillon suivi d'une amplification par PCR peut empêcher sa détection. Ce manque de sensibilité pose un problème surtout dans le cas où l'infection ne dépend pas du nombre présent mais, de la présence ou de l'absence de microorganismes. Telle que décrit dans la littérature, cette méthode doit être adaptée selon le microorganisme étudié. Il faut savoir que la température et le temps d'incubation dépendent du type de bactéries Gram + ou Gram -, ce qui est

contraignant pour le dépistage des infections pouvant être causées par plusieurs types de pathogènes. Une étape de centrifugation a été introduite au début de l'expérience et augmenté de 5 fois la concentration de l'agent alcalin, le NaOH soit 100 mM au lieu de 20 mM. Le mélange est chauffé à température et temps fixe soit 10 minutes à 80°C.

Ces modifications ont permis d'avoir un seul protocole permettant l'extraction à la fois des bactéries Gram + et des Gram -, mais reste inefficace sur les levures. L'avantage de cette méthode est que même si on a introduit une étape de centrifugation le fait de retirer que 90 µL du surnageant sur 100 µL évite la perte du culot et il n'y a pas d'autres étapes de centrifugation. L'extrait obtenu est directement utilisable pour une PCR. Il aura été sans doute possible de centrifuger de plus grands volumes d'échantillon initialement et ainsi concentrer l'ADN. Cette méthode ne contient pas d'étape de purification et peut présenter un problème pour certains échantillons (selles, terre, sang...), mais, pourrait être une alternative pour la méthode utilisée au laboratoire clinique de microbiologie du CHUS.

4.1.2 Une PCR en temps réel détectant et distinguant bactéries Gram positifs, Gram négatifs et levures

L'objectif final du projet, était d'identifier le plus grand nombre d'uropathogènes grâce à une extraction de l'ADN de tous les pathogènes, suivi d'un PCR en temps réel multiplexe avec plusieurs sondes capables de les détecter. Plusieurs études visant à identifier des microorganismes dans un échantillon clinique ou non cible l'*ARNr 16S* (Chakravorty *et al.*, 2010; Salipante *et al.*, 2013; Srinivasan *et al.*, 2012). Cette cible ne permettait pas de rencontrer nos objectifs. Les sondes conçues pour l'*ARNr 16S* qui répondaient à nos critères avaient des structures secondaires à la température d'hybridation utilisée lors de l'amplification par PCR ce qui les empêchaient de s'hybrider à leurs cibles. L'*ARNr 23S* a été choisi et répondait à nos critères, une paire d'amorces universelles et 3 sondes pour détecter les bactéries ont été créées. Une des sondes est spécifique à *E. coli* qui est la bactérie la plus fréquemment retrouvées dans les ITU, mais détecte aussi d'autres entérobactéries qui ont un T_m plus bas. La deuxième sonde est universelle et détecte presque toutes les bactéries, mais permet de distinguer les bactéries Gram + des Gram - et

la dernière sonde est spécifique à *S. agalactiae* (SGB). Entre 40 et 70% de ces femmes infectées par cette bactérie la transmettent à leur enfant lors de l'accouchement entraînant des problèmes graves qui peuvent affecter le cerveau, les poumons et la moelle épinière des nouveaux nés (Parham *et al.*, 2007; Straka *et al.*, 2004).

Seule *E. coli* parmi les bactéries communément présentes dans une ITU fait une homologie parfaite avec la sonde spécifique. Un principe appelé le Taq T_m probing qui a été mis en place dans notre laboratoire et qui permet d'obtenir une courbe de dénaturation avec des sondes d'hydrolyses et permet de distinguer une homologie parfaite d'une homologie partielle a été utilisé. Pour cette analyse, les amorces PCR sont employées à des concentrations asymétriques. Puisque l'amorce qui copie le brin colinéaire à la sonde détruit la sonde en passant, elle est ajoutée à une faible concentration tandis que l'amorce qui produit le brin qui s'hybride avec la sonde est ajoutée à forte concentration. De cette façon, à la fin de la PCR il reste de la sonde d'hybridation et un excès du brin qui lui est complémentaire. Ainsi, il est possible de mesurer le T_m de la sonde versus celle de la cible. En fonction de la séquence nucléotidique des microorganismes, les valeurs de T_m sont différentes dues aux mésappariement qui peuvent y avoir entre la sonde et la séquence de nucléotides. Les valeurs de T_m sont calculées au préalable pour tous les microorganismes grâce au logiciel Hyther®⁷ et servent de références pour identifier le microorganisme présent dans l'échantillon. La même chose a été réalisée dans le but de détecter les candidurues en ciblant cette fois-ci l'*ARNr 28S* et l'*ARNr 23S* pour *S. agalactiae*. Les ITU pouvant être causées par un très grand nombre de microorganismes elles ne peuvent pas tous être identifiés par le T_m . Cependant notre méthode permet d'avoir une température unique pour *E. coli* grâce à la sonde spécifique. Avec la sonde universelle on peut distinguer les Gram - qui ont un T_m caractéristique de 71°C, des Gram + qui ont une T_m entre 61 et 66°C.

Le système a été essayé sur des isolats de microorganismes dans un premier temps c'est-à-dire des bouillons de microorganismes connus. Les sondes permettent la détection des microorganismes. Toutefois pour l'identification une différence de $\pm 2-5^\circ\text{C}$ a été

⁷ <http://ozone3.chem.wayne.edu/cgi-bin/login/login/showLoginPage.cgi?>

observée entre la T_m calculée à l'avance grâce au logiciel Hyther® et la T_m observée dépendant du microorganisme et de la sonde. Cette différence peut être expliquée par le fait que même si on essaie d'ajuster au mieux la concentration en ions divalents et monovalents dans le logiciel Hyther®, les conditions présentes dans le mélange réactionnel ne sont pas précisément connues. Une trousse commerciale a été utilisée et tous les composés et leurs concentrations ne sont pas connus avec exactitude. De plus la présence de détergent peut également faire varier la température ainsi que les différentes structures prises par l'amplicon. Pour remédier à ce problème, il faudrait essayer le système avec plusieurs souches d'*E. coli* et SGB cliniques retrouvées dans une ITU, relever précisément la température obtenue en fonction des sondes et se baser sur ces températures pour l'identification. Dans cette étude, une approche par PCR en temps réel a été utilisée pour faciliter et accélérer l'obtention des résultats ce qui permettrait d'éviter la culture d'urine pour près de 90% des échantillons répartis comme suit; 40-60% ayant une bactériurie non-significative ou absente, 20-40% due à *E. coli*, 10% due à une bactérie Gram + et les échantillons contaminés par des bactéries de la vulve (Broeren *et al.*, 2011; Okada *et al.*, 2000). La non-analyse de ces échantillons permet un gain de temps considérable et donc une économie d'argent. De plus elle permet d'avoir les résultats d'analyses le jour même en moins de 3 heures ce qui permet aux praticiens de ne pas prescrire un antibiotique si absence de microorganismes, et de mieux adapter l'antibiothérapie quand c'est nécessaire, limitant ainsi des complications et l'apparition de la résistance bactérienne.

4.1.3 Courbe Étalon: valeur seuil

Chez un patient en bonne santé autre qu'un enfant une bactériurie est significative lorsqu'il y a $\geq 10^5$ ufc/mL. Des courbes étalons ont été construites pour connaître la valeur de C_p correspondant à une bactériurie significative. Il a été montré que pour un $C_p \leq 26$ la bactériurie est $\geq 10^5$ ufc/mL donc une ITU positive.

4.1.4 Témoin interne

Un témoin interne a également été rajouté au tampon d'extraction. Ce témoin interne est *S. cerevisiae*. L'avantage d'avoir un témoin interne présent dans le tampon d'extraction est de contrôler l'extraction mais aussi l'amplification et la détection plus tard (Rosenstraus *et al.*, 1998). *S. cerevisiae* a été choisi, car la paroi des levures est l'une des parois les plus difficiles à briser. Donc si l'ADNg du témoin interne est libéré, il n'y a aucune raison pour que celui des autres microorganismes présents dans l'échantillon ne le soit pas. L'extraction d'échantillon clinique peut contenir des impuretés qui peuvent inhiber la PCR (Demeke & Jenkins, 2010) et donner des faux négatifs c'est-à-dire que l'échantillon est considéré négatif malgré la présence du pathogène. Dans une PCR sans témoin interne un résultat négatif peut vouloir dire qu'il n'y a pas de cible présente dans la réaction mais aussi que la réaction est inhibée du au mauvais fonctionnement du thermocycleur ou de l'ADN polymérase, un mauvais mélange de PCR, la présence d'une substance inhibitrice de PCR ou un oubli d'ajouter l'échantillon (qui contient le témoin interne). Bien que la PCR soit un outil très sensible cela n'exclut pas le risque d'avoir des résultats faussement négatifs. Dans le cas des analyses n'ayant aucun lien avec la santé ou autre cela n'a peut-être pas autant d'importance, mais dans le cas où un patient est impliqué les résultats faussement négatifs est un problème grave puisqu'on ne traite pas le patient alors qu'il devrait l'être. Le témoin interne permet de distinguer les faux négatifs des vrais négatifs ce qui augmente la fiabilité de la technique (Hoorfar *et al.*, 2004; Maaroufi *et al.*, 2006).

4.1.5 Application du système à des échantillons cliniques

Le recrutement des patients devait se faire au CHUS et à la clinique médicale du campus principale de l'Université de Sherbrooke. Faute d'appui de médecins du CHUS, seule cette dernière a voulu participer à l'étude limitant considérablement le nombre d'échantillons. 150 échantillons dont 100 négatifs et 50 positifs sur une durée de 1 mois étaient requis. Seule 15 échantillons ont été reçus parmi lesquels 4 échantillons n'ont pas été analysés par culture d'urine au laboratoire de microbiologie du CHUS. Parmi les 4 échantillons, deux ont été analysés par bandelette réactive et les deux autres pour le

dépistage de *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae*. Donc les résultats de culture d'urine n'ont pas été obtenus. Pour les 11 échantillons restant, la concordance entre les résultats obtenus par notre méthode *versus* la culture d'urine était de 100%, parmi lesquels 8 (73%) échantillons étaient négatifs.

Seule *E. coli* a été identifiée dans les échantillons cliniques. Il faut savoir que souvent les praticiens dans le cas d'une ITU éventuelle chez une personne en santé s'arrêteront aux résultats obtenus par les bandelettes surtout dans le cas où le test est positif pour les leucocytes et nitrites ce qui traduit la présence d'une entérobactérie. Dans 80% des cas l'entérobactérie est *E. coli*. Avec notre méthode, *E. coli* a été identifiée pour ces deux échantillons avec un $C_p \leq 26$, donc une bactériurie significative et donc une ITU.

CHAPITRE 5

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Afin d'améliorer la condition du patient, éviter les complications liées à l'ITU, nous avons voulu accélérer l'obtention des résultats d'analyse des urines en utilisant un outil de la biologie moléculaire qui est la PCR en temps réel. En plus de permettre de prescrire un antibiotique le plus adapté possible, l'utilisation d'une telle méthode permet de diminuer le temps technique et par conséquent les coûts reliés à l'analyse des urines.

Nous avons réussi à mettre au point une méthode d'extraction capable d'extraire l'ADNg de tous les microorganismes avec un seul protocole et, avec la même efficacité. L'extrait est obtenu en moins de 20 minutes et peut être utilisé directement pour l'analyse par la PCR. La méthode peut être utilisée manuellement ou avec des billes de silices ce qui permet son automatisation. Cette méthode pourrait être proposée à plusieurs compagnies fabriquant des trousses d'extraction utilisant des billes de silices.

La deuxième partie du projet était étroitement liée à la mise au point d'une méthode d'extraction universelle. Elle a consisté au développement d'une méthode de dépistage des ITU universelle. Nous avons mis en place une technique très intéressante pour détecter les bactéries et les levures dans les échantillons cliniques grâce à la PCR en temps réel et un système d'amorce et de sondes. Cette méthode pourrait être également convertie en une trousse commerciale prête à l'emploi.

Par la suite, nous avons procédé aux étapes nécessaires pour amorcer la validation clinique. Malheureusement le manque d'appuis et de temps n'a pas permis d'avoir suffisamment d'échantillons pour conclure. L'étude devra donc être poursuivie pour valider la méthode et comparer son efficacité et sensibilité par rapport à la culture d'urine. Suite à la validation, l'utilisation de cette méthode pourra révolutionner l'analyse des urines dans le cadre des ITU, permettant de prescrire un traitement de choix aux patients, de sauver du temps et les coûts reliés

RÉFÉRENCES

- Alberti, C., Brun-Buisson, C., Chevret, S., Antonelli, M., Goodman, S. V., Martin, C., . . . European Sepsis Study Group. (2005). Systemic inflammatory response and progression to severe sepsis in critically ill infected patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 171(5), 461-468. doi:10.1164/rccm.200403-324OC
- Anderson, G. G., Goller, C. C., Justice, S., Hultgren, S. J., & Seed, P. C. (2010). Polysaccharide capsule and sialic acid-mediated regulation promote biofilm-like intracellular bacterial communities during cystitis. *Infection and Immunity*, 78(3), 963-975. doi:10.1128/IAI.00925-09
- Andreu, A., Cacho, J., Coira, A., & Lepe, J. A. (2011). Microbiological diagnosis of urinary tract infections. [Diagnostico microbiologico de las infecciones del tracto urinario] *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, 29(1), 52-57. doi:10.1016/j.eimc.2010.06.008
- Antwi, S., Bates, I., Baffoe-Bonnie, B., & Critchley, J. (2008). Urine dipstick as a screening test for urinary tract infection. *Annals of Tropical Paediatrics*, 28(2), 117-122. doi:10.1179/146532808X302134
- Avolio, M., Diamante, P., Modolo, M. L., De Rosa, R., Stano, P., & Camporese, A. (2014). Direct molecular detection of pathogens in blood as specific rule-in diagnostic biomarker in patients with presumed sepsis - our experience on a heterogeneous cohort of patients with signs of infective SIRS. *Shock (Augusta, Ga.)*, doi:10.1097/SHK.0000000000000191
- Ballarini, A., Segata, N., Huttenhower, C., & Jousson, O. (2013). Simultaneous quantification of multiple bacteria by the BactoChip microarray designed to target species-specific marker genes. *PloS One*, 8(2), e55764. doi:10.1371/journal.pone.0055764; 10.1371/journal.pone.0055764
- Bartram, A. K., Lynch, M. D., Stearns, J. C., Moreno-Hagelsieb, G., & Neufeld, J. D. (2011). Generation of multimillion-sequence 16S rRNA gene libraries from complex microbial communities by assembling paired-end illumina reads. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(11), 3846-3852. doi:10.1128/AEM.02772-10; 10.1128/AEM.02772-10
- Bednar, M. (2000). DNA microarray technology and application. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 6(4), 796-800.
- Beerepoot, M. A., den Heijer, C. D., Penders, J., Prins, J. M., Stobberingh, E. E., & Geerlings, S. E. (2012). Predictive value of escherichia coli susceptibility in strains

- causing asymptomatic bacteriuria for women with recurrent symptomatic urinary tract infections receiving prophylaxis. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(4), E84-90. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03773.x; 10.1111/j.1469-0691.2012.03773.x
- Bent, S., & Saint, S. (2002). The optimal use of diagnostic testing in women with acute uncomplicated cystitis. *The American Journal of Medicine*, 113 Suppl 1A, 20S-28S.
- Blader, I. J., Manger, I. D., & Boothroyd, J. C. (2001). Microarray analysis reveals previously unknown changes in toxoplasma gondii-infected human cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(26), 24223-24231. doi:10.1074/jbc.M100951200
- Boedeker, K. S., & Kilzer, W. J. (2001). Fluconazole dose recommendation in urinary tract infection. *The Annals of Pharmacotherapy*, 35(3), 369-372.
- Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M., & van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3), 495-503.
- Broeren, M. A., Bahceci, S., Vader, H. L., & Arents, N. L. (2011). Screening for urinary tract infection with the sysmex UF-1000i urine flow cytometer. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(3), 1025-1029. doi:10.1128/JCM.01669-10; 10.1128/JCM.01669-10
- Bruyere, F., Cariou, G., Boiteux, J. P., Hoznek, A., Mignard, J. P., Escaravage, L., . . . le CIAFU. (2008). Acute cystitis. [Cystites aiguës] *Progres En Urologie : Journal De l'Association Francaise d'Urologie Et De La Societe Francaise d'Urologie*, 18 Suppl 1, 9-13. doi:10.1016/S1166-7087(08)70506-2
- Burillo, A., Rodriguez-Sanchez, B., Ramiro, A., Cercenado, E., Rodriguez-Creixems, M., & Bouza, E. (2014). Gram-stain plus MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry) for a rapid diagnosis of urinary tract infection. *PloS One*, 9(1), e86915. doi:10.1371/journal.pone.0086915; 10.1371/journal.pone.0086915
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25(2), 169-193.
- Cai, T., Mazzoli, S., Mondaini, N., Meacci, F., Nesi, G., D'Elia, C., . . . Bartoletti, R. (2012). The role of asymptomatic bacteriuria in young women with recurrent urinary tract infections: To treat or not to treat? *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, doi:10.1093/cid/cis534
- Caron, F., & Humbert, G. (1992). Short-term treatment of urinary tract infections: The french concept. *Infection*, 20 Suppl 4, S286-90.

- Cermak, P., Ptakova, M., Kubele, J., Cermakova, R., & Jedlickova, A. (2009). Detection of urinary tract infection using uro-quick system and quantitative dilution method. [Detekce mocovych infekci systemem Uro-quick a kvantitativni stanoveni redici metodou] *Klinicka Mikrobiologie a Infekcni Lekarstvi*, 15(5), 166-170.
- Chakravorty, S., Aladegbami, B., Burday, M., Levi, M., Marras, S. A., Shah, D., . . . Alland, D. (2010). Rapid universal identification of bacterial pathogens from clinical cultures by using a novel sloppy molecular beacon melting temperature signature technique. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(1), 258-267. doi:10.1128/JCM.01725-09
- Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., Ranier, J. E., Nguyen, P. N., & Caskey, C. T. (1988). Deletion screening of the duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research*, 16(23), 11141-11156.
- Chen, C. Y., Chen, Y. H., Lu, P. L., Lin, W. R., Chen, T. C., & Lin, C. Y. (2012). *Proteus mirabilis* urinary tract infection and bacteremia: Risk factors, clinical presentation, and outcomes. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*, 45(3), 228-236. doi:10.1016/j.jmii.2011.11.007
- Chenoweth, C. E., & Saint, S. (2011). Urinary tract infections. *Infectious Disease Clinics of North America*, 25(1), 103-115. doi:10.1016/j.idc.2010.11.005
- Chernushevich, I. V., Loboda, A. V., & Thomson, B. A. (2001). An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry : JMS*, 36(8), 849-865. doi:10.1002/jms.207
- Chomczynski, P., & Rymaszewski, M. (2006). Alkaline polyethylene glycol-based method for direct PCR from bacteria, eukaryotic tissue samples, and whole blood. *BioTechniques*, 40(4), 454, 456, 458.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156-159. doi:10.1006/abio.1987.9999
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on. *Nature Protocols*, 1(2), 581-585. doi:10.1038/nprot.2006.83
- Chromek, M., Slamova, Z., Bergman, P., Kovacs, L., Podracka, L., Ehren, I., . . . Brauner, A. (2006). The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection. *Nature Medicine*, 12(6), 636-641. doi:10.1038/nm1407
- Cole, T. A. (1971). Immobilization and localization of DNA in cesium chloride gradients with polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 41(1), 274-276.

- de Lamballerie, X., Zandotti, C., Vignoli, C., Bollet, C., & de Micco, P. (1992). A one-step microbial DNA extraction method using "chelex 100" suitable for gene amplification. *Research in Microbiology*, *143*(8), 785-790.
- de Lucas Collantes, C., Cela Alvargonzalez, J., Angulo Chacon, A. M., Garcia Ascaso, M., Pineiro Perez, R., Cilleruelo Ortega, M. J., & Sanchez Romero, I. (2012). Urinary tract infections: Antibiotic resistance and clinical follow up. [Infecciones del tracto urinario: sensibilidad antimicrobiana y seguimiento clinico] *Anales De Pediatria (Barcelona, Spain : 2003)*, *76*(4), 224-228. doi:10.1016/j.anpedi.2011.10.002
- Demeke, T., & Jenkins, G. R. (2010). Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *396*(6), 1977-1990. doi:10.1007/s00216-009-3150-9; 10.1007/s00216-009-3150-9
- Denes, E., Prouzergue, J., Ducroix-Roubertou, S., Aupetit, C., & Weinbreck, P. (2012). Antibiotic prescription by general practitioners for urinary tract infections in outpatients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, doi:10.1007/s10096-012-1668-9
- Dimech, W., & Roney, K. (2002). Evaluation of an automated urinalysis system for testing urine chemistry, microscopy and culture. *Pathology*, *34*(2), 170-177.
- Ducharme, J., Neilson, S., & Ginn, J. L. (2007). Can urine cultures and reagent test strips be used to diagnose urinary tract infection in elderly emergency department patients without focal urinary symptoms? *Cjem*, *9*(2), 87-92.
- Dunbar, S. A., Vander Zee, C. A., Oliver, K. G., Karem, K. L., & Jacobson, J. W. (2003). Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the luminex LabMAP system. *Journal of Microbiological Methods*, *53*(2), 245-252.
- Dunne, W. M., Jr, Westblade, L. F., & Ford, B. (2012). Next-generation and whole-genome sequencing in the diagnostic clinical microbiology laboratory. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, *31*(8), 1719-1726. doi:10.1007/s10096-012-1641-7; 10.1007/s10096-012-1641-7
- El-Hefnawy, A. S., Nabeeh, A., El Sawy, E., & Wadie, B. S. (2011). Urinary tract infection before and after mid-urethral slings: Culture-proven diagnosis and analysis of risk factors. *International Urology and Nephrology*, *43*(2), 345-351. doi:10.1007/s11255-010-9807-7

- Enderle, J. L., Miller, A. L., & Pyles, R. B. (2013). Quantification of bacterial uropathogens in preclinical samples using real-time PCR assays. *Current Microbiology*, doi:10.1007/s00284-013-0465-8
- Fallahzadeh, M. H., & Ghane, F. (2006). Urinary tract infection in infants and children with diarrhoea. *Eastern Mediterranean Health Journal = La Revue De Sante De La Mediterranee Orientale = Al-Majallah Al-Sihhiyah Li-Sharq Al-Mutawassit*, 12(5), 690-694.
- Fisher, J. F., Kavanagh, K., Sobel, J. D., Kauffman, C. A., & Newman, C. A. (2011). Candida urinary tract infection: Pathogenesis. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 52 Suppl 6, S437-51. doi:10.1093/cid/cir110
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., . . . Merrick, J. M. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of haemophilus influenzae rd. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5223), 496-512.
- Flores, G. E., Henley, J. B., & Fierer, N. (2012). A direct PCR approach to accelerate analyses of human-associated microbial communities. *PloS One*, 7(9), e44563. doi:10.1371/journal.pone.0044563; 10.1371/journal.pone.0044563
- Foxman, B. (2002). Epidemiology of urinary tract infections: Incidence, morbidity, and economic costs. *The American Journal of Medicine*, 113 Suppl 1A, 5S-13S.
- Foxman, B. (2003). Epidemiology of urinary tract infections: Incidence, morbidity, and economic costs. *Disease-a-Month : DM*, 49(2), 53-70. doi:10.1067/mda.2003.7
- Foxman, B. (2010). The epidemiology of urinary tract infection. *Nature Reviews.Urology*, 7(12), 653-660. doi:10.1038/nrurol.2010.190
- Foxman, B. (2014). Urinary tract infection syndromes: Occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infectious Disease Clinics of North America*, 28(1), 1-13. doi:10.1016/j.idc.2013.09.003; 10.1016/j.idc.2013.09.003
- Fredricks, D. N., Smith, C., & Meier, A. (2005). Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(10), 5122-5128. doi:10.1128/JCM.43.10.5122-5128.2005
- Freeman, W. M., Walker, S. J., & Vrana, K. E. (1999). Quantitative RT-PCR: Pitfalls and potential. *BioTechniques*, 26(1), 112-22, 124-5.
- Fulton, R. J., McDade, R. L., Smith, P. L., Kienker, L. J., & Kettman, J. R., Jr. (1997). Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system. *Clinical Chemistry*, 43(9), 1749-1756.

- Gaskell, S. J. (1985). Mass spectrometry in medical research. *Clinical Physics and Physiological Measurement : An Official Journal of the Hospital Physicists' Association, Deutsche Gesellschaft Fur Medizinische Physik and the European Federation of Organisations for Medical Physics*, 6(1), 1-15.
- Gibson, U. E., Heid, C. A., & Williams, P. M. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, 6(10), 995-1001.
- Gonzalez-Pedraza Aviles, A., Luis Hernandez, R., Luna Avila, J., Davila Mendoza, R., & Ortiz Zaragoza, C. (2006). Urinary tract infection by candida species. [Infeccion de vias urinarias por especies de Candida] *Atencion Primaria / Sociedad Espanola De Medicina De Familia y Comunitaria*, 38(3), 147-153.
- Hansen, W. L., van der Donk, C. F., Bruggeman, C. A., Stobberingh, E. E., & Wolffs, P. F. (2013). A real-time PCR-based semi-quantitative breakpoint to aid in molecular identification of urinary tract infections. *PloS One*, 8(4), e61439. doi:10.1371/journal.pone.0061439; 10.1371/journal.pone.0061439
- Heytens, S., De Sutter, A., De Backer, D., Verschraegen, G., & Christiaens, T. (2011). Cystitis: Symptomatology in women with suspected uncomplicated urinary tract infection. *Journal of Women's Health (2002)*, 20(7), 1117-1121. doi:10.1089/jwh.2010.2302
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 10(4), 413-417.
- Hoorfar, J., Cook, N., Malorny, B., Wagner, M., De Medici, D., Abdulmawjood, A., & Fach, P. (2004). Diagnostic PCR: Making internal amplification control mandatory. *Letters in Applied Microbiology*, 38(2), 79-80.
- Hoorfar, J., Malorny, B., Abdulmawjood, A., Cook, N., Wagner, M., & Fach, P. (2004). Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), 1863-1868.
- Hortin, G. L. (2006). The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome. *Clinical Chemistry*, 52(7), 1223-1237. doi:10.1373/clinchem.2006.069252
- Hovelius, B., & Mardh, P. A. (1984). Staphylococcus saprophyticus as a common cause of urinary tract infections. *Reviews of Infectious Diseases*, 6(3), 328-337.
- Ishmael, F. T., & Stellato, C. (2008). Principles and applications of polymerase chain reaction: Basic science for the practicing physician. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology : Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, &*

Immunology, 101(4), 437-443. doi:10.1016/S1081-1206(10)60323-7; 10.1016/S1081-1206(10)60323-7

Ivancic, V., Mastali, M., Percy, N., Gornbein, J., Babbitt, J. T., Li, Y., . . . Haake, D. A. (2008). Rapid antimicrobial susceptibility determination of uropathogens in clinical urine specimens by use of ATP bioluminescence. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(4), 1213-1219. doi:10.1128/JCM.02036-07; 10.1128/JCM.02036-07

Jefferson, H., Dalton, H. P., Escobar, M. R., & Allison, M. J. (1975). Transportation delay and the microbiological quality of clinical specimens. *American Journal of Clinical Pathology*, 64(5), 689-693.

Joos, T. O., Stoll, D., & Templin, M. F. (2002). Miniaturised multiplexed immunoassays. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6(1), 76-80.

Karlsen, F., Steen, H. B., & Nesland, J. M. (1995). SYBR green I DNA staining increases the detection sensitivity of viruses by polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 55(1), 153-156.

Kauffmann, I. M., Schmitt, J., & Schmid, R. D. (2004). DNA isolation from soil samples for cloning in different hosts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(5), 665-670. doi:10.1007/s00253-003-1528-8

Kazemier, B. M., Schneeberger, C., De Miranda, E., Van Wassenaer, A., Bossuyt, P. M., Vogelvang, T. E., . . . Geerlings, S. E. (2012). Costs and effects of screening and treating low risk women with a singleton pregnancy for asymptomatic bacteriuria, the ASB study. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 12, 52-2393-12-52. doi:10.1186/1471-2393-12-52; 10.1186/1471-2393-12-52

Keij, J. F., & Steinkamp, J. A. (1998). Flow cytometric characterization and classification of multiple dual-color fluorescent microspheres using fluorescence lifetime. *Cytometry*, 33(3), 318-323.

Kersh, G. J., Fitzpatrick, K. A., Self, J. S., Priestley, R. A., Kelly, A. J., Lash, R. R., . . . Anderson, A. D. (2013). Presence and persistence of coxiella burnetii in the environments of goat farms associated with a Q fever outbreak. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(5), 1697-1703. doi:10.1128/AEM.03472-12; 10.1128/AEM.03472-12

Kettman, J. R., Davies, T., Chandler, D., Oliver, K. G., & Fulton, R. J. (1998). Classification and properties of 64 multiplexed microsphere sets. *Cytometry*, 33(2), 234-243.

Kieleczawa, J. (2006). In Kieleczawa J. (Ed.), DNA sequencing II: optimizing preparation and clean up (Taylor & Francis Group, LLC ed.). Canada: Jones and Bartlett. doi:0-7637-3383-0

- Kiltie, A. E., & Ryan, A. J. (1997). SYBR green I staining of pulsed field agarose gels is a sensitive and inexpensive way of quantitating DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 25(14), 2945-2946.
- Kim, J., Kim, D. S., Lee, Y. S., & Choi, N. G. (2011). Fungal urinary tract infection in burn patients with long-term foley catheterization. *Korean Journal of Urology*, 52(9), 626-631. doi:10.4111/kju.2011.52.9.626
- Kim, S. Y., Kim, Y. J., Lee, S. M., Hwang, S. H., Kim, H. H., Son, H. C., & Lee, E. Y. (2007). Evaluation of the sysmex UF-100 urine cell analyzer as a screening test to reduce the need for urine cultures for community-acquired urinary tract infection. *American Journal of Clinical Pathology*, 128(6), 922-925. doi:10.1309/4606EC29U50DVAFY
- Krcmery, S., Dubrava, M., & Krcmery, V., Jr. (1999). Fungal urinary tract infections in patients at risk. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11(3-4), 289-291.
- Krsek, M., & Wellington, E. M. (1999). Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *Journal of Microbiological Methods*, 39(1), 1-16.
- Larru, B., & Zaoutis, T. E. (2013). Newer antifungal agents. *Current Opinion in Pediatrics*, 25(1), 110-115. doi:10.1097/MOP.0b013e32835c1fc2; 10.1097/MOP.0b013e32835c1fc2
- Lavigne, J. P., Boutet-Dubois, A., Laouini, D., Combescure, C., Bouziges, N., Mares, P., & Sotto, A. (2011). Virulence potential of escherichia coli strains causing asymptomatic bacteriuria during pregnancy. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(11), 3950-3953. doi:10.1128/JCM.00892-11
- Lee, C., Lee, S., Shin, S. G., & Hwang, S. (2008). Real-time PCR determination of rRNA gene copy number: Absolute and relative quantification assays with escherichia coli. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(2), 371-376. doi:10.1007/s00253-007-1300-6
- Lehmann, L. E., Hauser, S., Malinka, T., Klaschik, S., Stuber, F., & Book, M. (2010). Real-time polymerase chain-reaction detection of pathogens is feasible to supplement the diagnostic sequence for urinary tract infections. *BJU International*, 106(1), 114-120. doi:10.1111/j.1464-410X.2009.09017.x
- Leung, A., Taylor, S., Smith, A., Spencer, R., & Horner, P. (2002). Urinary tract infection in patients with acute non-gonococcal urethritis. *International Journal of STD & AIDS*, 13(12), 801-804. doi:10.1258/095646202321020035

- Lin, W. H., Wang, M. C., Tseng, C. C., Ko, W. C., Wu, A. B., Zheng, P. X., & Wu, J. J. (2010). Clinical and microbiological characteristics of klebsiella pneumoniae isolates causing community-acquired urinary tract infections. *Infection*, 38(6), 459-464. doi:10.1007/s15010-010-0049-5
- Litwin, M. S., Saigal, C. S., Yano, E. M., Avila, C., Geschwind, S. A., Hanley, J. M., . . . Urologic Diseases in America Project. (2005). Urologic diseases in america project: Analytical methods and principal findings. *The Journal of Urology*, 173(3), 933-937. doi:10.1097/01.ju.0000152365.43125.3b
- Lowe, N. K., & Ryan-Wenger, N. A. (2012). Uncomplicated UTIs in women. *The Nurse Practitioner*, 37(5), 41-48. doi:10.1097/01.NPR.0000413483.52003.f8
- Lun, A., Ziebig, R., Priem, F., Filler, G., & Sinha, P. (1999). Routine workflow for use of urine strips and urine flow cytometer UF-100 in the hospital laboratory. *Clinical Chemistry*, 45(8 Pt 1), 1305-1307.
- Maaroufi, Y., de Bruyne, J. M., Duchateau, V., Scheen, R., & Crokaert, F. (2006). Development of a multiple internal control for clinical diagnostic real-time amplification assays. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 48(2), 183-191. doi:10.1111/j.1574-695X.2006.00125.x
- March Rossello, G. A., Gutierrez Rodriguez, M. P., de Lejarazu Leonardo, R. O., Orduna Domingo, A., & Bratos Perez, M. A. (2013). Procedure for microbial identification based on matrix-assisted laser Desorption/Ionization-time of flight mass spectrometry from screening-positive urine samples. *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, Et Immunologica Scandinavica*, doi:10.1111/apm.12208; 10.1111/apm.12208
- Marschal, M., Wienke, M., Hoering, S., Autenrieth, I. B., & Frick, J. S. (2012). Evaluation of 3 different rapid automated systems for diagnosis of urinary tract infections. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 72(2), 125-130. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2011.10.001
- Muller, F. M., Werner, K. E., Kasai, M., Francesconi, A., Chanock, S. J., & Walsh, T. J. (1998). Rapid extraction of genomic DNA from medically important yeasts and filamentous fungi by high-speed cell disruption. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(6), 1625-1629.
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335-350.
- Naves, P., del Prado, G., Huelves, L., Gracia, M., Ruiz, V., Blanco, J., . . . Soriano, F. (2008). Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by escherichia coli strains. *Microbial Pathogenesis*, 45(2), 86-91. doi:10.1016/j.micpath.2008.03.003; 10.1016/j.micpath.2008.03.003

- Nicolle, L. E. (2008). Short-term therapy for urinary tract infection: Success and failure. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31 Suppl 1, S40-5. doi:10.1016/j.ijantimicag.2007.07.040
- Nicolle, L. E. (2009). Urinary tract infections in the elderly. *Clinics in Geriatric Medicine*, 25(3), 423-436. doi:10.1016/j.cger.2009.04.005; 10.1016/j.cger.2009.04.005
- Nicolle, L. E. (2013). Urinary tract infection. *Critical Care Clinics*, 29(3), 699-715. doi:10.1016/j.ccc.2013.03.014; 10.1016/j.ccc.2013.03.014
- Nicolle, L. E., Bradley, S., Colgan, R., Rice, J. C., Schaeffer, A., Hooton, T. M., . . . American Geriatric Society. (2005). Infectious diseases society of america guidelines for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 40(5), 643-654. doi:10.1086/427507
- Norden, C. W., Green, G. M., & Kass, E. H. (1968). Antibacterial mechanisms of the urinary bladder. *The Journal of Clinical Investigation*, 47(12), 2689-2700. doi:10.1172/JCI105952
- Nys, S., van Merode, T., Bartelds, A. I., & Stobberingh, E. E. (2006). Urinary tract infections in general practice patients: Diagnostic tests versus bacteriological culture. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(5), 955-958. doi:10.1093/jac/dkl082
- Okada, H., Sakai, Y., Miyazaki, S., Arakawa, S., Hamaguchi, Y., & Kamidono, S. (2000). Detection of significant bacteriuria by automated urinalysis using flow cytometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(8), 2870-2872.
- Parham, N. J., Picard, F. J., Peytavi, R., Gagnon, M., Seyrig, G., Gagne, P. A., . . . Bergeron, M. G. (2007). Specific magnetic bead based capture of genomic DNA from clinical samples: Application to the detection of group B streptococci in vaginal/anal swabs. *Clinical Chemistry*, 53(9), 1570-1576. doi:10.1373/clinchem.2007.091389
- Poitras, E. & Houde, A. (2002). La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology*, 2, 2-11.
- Ragnarsdottir, B., & Svanborg, C. (2012). Susceptibility to acute pyelonephritis or asymptomatic bacteriuria: Host-pathogen interaction in urinary tract infections. *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*, doi:10.1007/s00467-011-2089-1
- Ringel-Kulka, T., Cheng, J., Ringel, Y., Salojarvi, J., Carroll, I., Palva, A., . . . Satokari, R. (2013). Intestinal microbiota in healthy U.S. young children and adults--a high throughput microarray analysis. *PloS One*, 8(5), e64315. doi:10.1371/journal.pone.0064315; 10.1371/journal.pone.0064315

- Roepstorff, P. (2000). MALDI-TOF mass spectrometry in protein chemistry. *EXS*, 88, 81-97.
- Ronald, A. (2003). The etiology of urinary tract infection: Traditional and emerging pathogens. *Disease-a-Month : DM*, 49(2), 71-82. doi:10.1067/mda.2003.8
- Rosenstraus, M., Wang, Z., Chang, S. Y., DeBonville, D., & Spadoro, J. P. (1998). An internal control for routine diagnostic PCR: Design, properties, and effect on clinical performance. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(1), 191-197.
- Rozales, F. P., Machado, A. B., DE Paris, F., Zavascki, A. P., & Barth, A. L. (2013). PCR to detect mycobacterium tuberculosis in respiratory tract samples: Evaluation of clinical data. *Epidemiology and Infection*, , 1-7. doi:10.1017/S0950268813002598
- Russo, T. A., & Johnson, J. R. (2003). Medical and economic impact of extraintestinal infections due to escherichia coli: Focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 5(5), 449-456.
- Ryncarz, A. J., Goddard, J., Wald, A., Huang, M. L., Roizman, B., & Corey, L. (1999). Development of a high-throughput quantitative assay for detecting herpes simplex virus DNA in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1941-1947.
- Sahiner, F., Ergunay, K., Ozyurt, M., Ardic, N., Hosbul, T., & Haznedaroglu, T. (2011). Phenotypic and genotypic identification of candida strains isolated as nosocomial pathogens. [Hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen Candida suslarinin genotipik ve fenotipik olarak tanimlanmasi] *Mikrobiyoloji Bulteni*, 45(3), 478-488.
- Salipante, S. J., Sengupta, D. J., Rosenthal, C., Costa, G., Spangler, J., Sims, E. H., . . . Hoffman, N. G. (2013). Rapid 16S rRNA next-generation sequencing of polymicrobial clinical samples for diagnosis of complex bacterial infections. *PloS One*, 8(5), e65226. doi:10.1371/journal.pone.0065226; 10.1371/journal.pone.0065226
- Sanger, F. (1981). Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science (New York, N.Y.)*, 214(4526), 1205-1210.
- Savas, L., Guvel, S., Onlen, Y., Savas, N., & Duran, N. (2006). Nosocomial urinary tract infections: Micro-organisms, antibiotic sensitivities and risk factors. *The West Indian Medical Journal*, 55(3), 188-193.
- Schappert, S. M., & Rechtsteiner, E. A. (2011). Ambulatory medical care utilization estimates for 2007. *Vital and Health Statistics.Series 13, Data from the National Health Survey*, (169)(169), 1-38.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., & Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science (New York, N.Y.)*, 270(5235), 467-470.

- Schulten, H. R. (1982). Off-line combination of liquid chromatography and field desorption mass spectrometry: Principles and environmental, medical and pharmaceutical applications. *Journal of Chromatography*, 251(2), 105-128.
- Shigemura, K., Shirakawa, T., Okada, H., Tanaka, K., Kamidono, S., Arakawa, S., & Gotoh, A. (2005). Rapid detection and differentiation of gram-negative and gram-positive pathogenic bacteria in urine using TaqMan probe. *Clinical and Experimental Medicine*, 4(4), 196-201. doi:10.1007/s10238-004-0056-x
- Sims, D., Sudbery, I., Ilott, N. E., Heger, A., & Ponting, C. P. (2014). Sequencing depth and coverage: Key considerations in genomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, 15(2), 121-132. doi:10.1038/nrg3642; 10.1038/nrg3642
- Smith, P. L., WalkerPeach, C. R., Fulton, R. J., & DuBois, D. B. (1998). A rapid, sensitive, multiplexed assay for detection of viral nucleic acids using the FlowMetrix system. *Clinical Chemistry*, 44(9), 2054-2056.
- Srinivasan, L., Pisapia, J. M., Shah, S. S., Halpern, C. H., & Harris, M. C. (2012). Can broad-range 16S ribosomal ribonucleic acid gene polymerase chain reactions improve the diagnosis of bacterial meningitis? A systematic review and meta-analysis. *Annals of Emergency Medicine*, 60(5), 609-620.e2. doi:10.1016/j.annemergmed.2012.05.040; 10.1016/j.annemergmed.2012.05.040
- Stapleton, A. E., Dziura, J., Hooton, T. M., Cox, M. E., Yarova-Yarovaya, Y., Chen, S., & Gupta, K. (2012). Recurrent urinary tract infection and urinary escherichia coli in women ingesting cranberry juice daily: A randomized controlled trial. *Mayo Clinic Proceedings*. *Mayo Clinic*, 87(2), 143-150. doi:10.1016/j.mayocp.2011.10.006
- Straka, M., Dela Cruz, W., Blackmon, C., Johnson, O., Stassen, S., Streitman, D., . . . Stamilio, D. (2004). Rapid detection of group B streptococcus and escherichia coli in amniotic fluid using real-time fluorescent PCR. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 12(3-4), 109-114. doi:10.1080/10647440400020679
- Swanson, A., Ramos, E., & Snyder, H. (2014). Next generation sequencing is the impetus for the next generation of laboratory-based genetic counselors. *Journal of Genetic Counseling*, doi:10.1007/s10897-013-9684-1
- Tachikawa, R., Tomii, K., Seo, R., Nagata, K., Otsuka, K., Nakagawa, A., . . . Shimizu, N. (2013). Detection of herpes viruses by multiplex and real-time polymerase chain reaction in bronchoalveolar lavage fluid of patients with acute lung injury or acute respiratory distress syndrome. *Respiration; International Review of Thoracic Diseases*, doi:10.1159/000355200
- Valasek, M. A., & Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29(3), 151-159. doi:10.1152/advan.00019.2005

- van Vuuren, S. P., Heyns, C. F., & Zarrabi, A. D. (2012). Significance of histological prostatitis in patients with urinary retention and underlying benign prostatic hyperplasia or adenocarcinoma of the prostate. *BJU International*, *109*(8), 1194-1197. doi:10.1111/j.1464-410X.2011.10527.x; 10.1111/j.1464-410X.2011.10527.x
- Wagenlehner, F. M., Wullt, B., & Perletti, G. (2011). Antimicrobials in urogenital infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *38* Suppl, 3-10. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.09.004
- Wang, A., Yao, Z., Zheng, W., & Zhang, H. (2014). Bacterial communities in the gut and reproductive organs of *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae) based on 454 pyrosequencing. *PloS One*, *9*(9), e106988. doi:10.1371/journal.pone.0106988; 10.1371/journal.pone.0106988
- Wang, X. H., Zhang, G., Fan, Y. Y., Yang, X., Sui, W. J., & Lu, X. X. (2013). Direct identification of bacteria causing urinary tract infections by combining matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with UF-1000i urine flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods*, *92*(3), 231-235. doi:10.1016/j.mimet.2012.12.016; 10.1016/j.mimet.2012.12.016
- Waring, M. J. (1965). Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *Journal of Molecular Biology*, *13*(1), 269-282.
- Wasfi, R., Abd El-Rahman, O. A., Mansour, L. E., Hanora, A. S., Hashem, A. M., & Ashour, M. S. (2012). Antimicrobial activities against biofilm formed by *Proteus mirabilis* isolates from wound and urinary tract infections. *Indian Journal of Medical Microbiology*, *30*(1), 76-80. doi:10.4103/0255-0857.93044
- Weissenbacher, E. R., & Reisenberger, K. (1993). Uncomplicated urinary tract infections in pregnant and non-pregnant women. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, *5*(4), 513-516.
- Welker, M., Fastner, J., Erhard, M., & von Dohren, H. (2002). Applications of MALDI-TOF MS analysis in cyanotoxin research. *Environmental Toxicology*, *17*(4), 367-374. doi:10.1002/tox.10073
- Wilson, M., DeRisi, J., Kristensen, H. H., Imboden, P., Rane, S., Brown, P. O., & Schoolnik, G. K. (1999). Exploring drug-induced alterations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(22), 12833-12838.
- Winstock, G. B. (2009). Manufacturing fault causes a false negative for haematuria using Makromed m81 urinalysis test strips: A case report. *Medicine, Science, and the Law*, *49*(1), 56-59.

Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39(1), 75-85.

ANNEXES

Veillez double cliquez sur le logo en forme **d'épingle-punaise de bureau**, pour ouvrir le document au complet.

Comité d'évaluation scientifique



ÉVALUATION DE PROJET

Date : 26 mars 2014

No de projet : 14-036

Chercheur principal : Dr Éric Frost

Titre du projet : Dépistage des infections urinaires par méthode moléculaire à l'aide de PCR et d'une méthode d'extraction d'ADN génomique « universelle ».

DÉCISION DU COMITÉ :

- Approuvé, scientifiquement valable. Version : Date :
- Approuvé, sous condition d'apporter les modifications demandées au protocole
(voir de modifications S.V.P.)
- Corrections apportées (protocole accepté)
Version : 2 Date : 25 mars 2014
Veuillez noter qu'une absence de réponse d'ici 6 mois entraînera automatiquement la fermeture de votre dossier.
- Refusé. Le protocole corrigé sera resoumis pour évaluation.
 Nouvelle version acceptée Version : Date :
- Évaluation scientifique déjà complétée
- ❖ Organisme (les preuves ont été dûment fournies):
 FRSQ IRSC CRSNG Autre :
 - ❖ Étude annexe ou subséquente ne nécessitant pas une nouvelle évaluation

MODIFICATION(S) DEMANDÉE(S) :CORRECTIONS APPORTÉES :*Indiquer où la correction a été apportée*

- ❖ Définition de la population visée : C'est la partie faible de la demande. D'où viendront ces patients ? Hospitalisés sur l'étage, urgence ? Qui sont ces médecins recruteurs; urgentologues, internistes, infectiologues ? Quelle expérience avons-nous eu dans le passé à ce chapitre ? L'objectif est d'obtenir 50 urines positives et 100 urines négatives. Sachant que 80% des culture d'urine sont négatives, il vous faudra
- Nous avons précisé au 5.1 que les spécimens proviendront de la clinique médicale de l'université de Sherbrooke. Étant donné que le recrutement se fait au sein de la population estudiantine et symptomatique et non dans la

Dépistage des infections urinaires par méthode moléculaire à l'aide de PCR et d'une
méthode d'extraction d'ADN génomique « universelle »

Dr Eric Frost
Département de microbiologie et d'infectiologie
Faculté de médecine et des sciences de la santé
Université de Sherbrooke

Laurie Vingataramin
Étudiante à la maîtrise
Département de microbiologie et d'infectiologie
Faculté de médecine et des sciences de la santé
Université de Sherbrooke

Version 2.0
2014-01-28

CENTRE DE
RECHERCHE

CHUS - HÔPITALER UNIVERSITAIRE DE SHÉRBOUKE
 Hôpital Fleury, 3001, 1^{er} Avenue Nord, Sherbrooke (Québec) J1H 5N4
 Hôpital Drou, 500, rue D'Arca, Sherbrooke (Québec) J1H 5P3
 Téléphone : (819) 746-1111

**FORMULAIRE D'INFORMATION ET DE CONSENTEMENT
 POUR UTILISATION À DES FINS DE RECHERCHE, D'UN TISSU OU D'UNE AUTRE
 SUBSTANCE PRÉLEVÉS DANS UN CADRE CLINIQUE.**

Titre du projet: Dépistage des infections urinaires par méthode moléculaire

Numéro du projet: 14-036

Chercheur principal: Pr Eric Frost, Ph.D., Département de Microbiologie et d'Infectiologie

Chercheuse associée: Laurie Vingataramin, Bsc

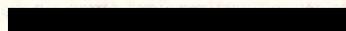
POUR INFORMATION

Du lundi au vendredi entre 9h et 17h, vous pouvez communiquer avec :

Dr Eric Frost, Ph.D.



Mme Vingataramin Laurie, étudiante



Votre médecin vous a prescrit une culture d'urines. Nous sollicitons votre participation à un projet de recherche parce que vous devez avoir une culture d'urine demandée par votre médecin. Cependant, avant d'accepter de participer à ce projet, veuillez prendre le temps de lire, de comprendre et de considérer attentivement les renseignements qui suivent. Si vous acceptez de participer au projet de recherche, vous devrez signer le formulaire de consentement à la fin du présent document et nous vous en remettrons une copie pour vos dossiers.

Ce formulaire d'information et de consentement vous explique le but de ce projet de recherche, les procédures, les risques et inconvénients ainsi que les avantages, de même que les personnes avec qui communiquer au besoin. Il peut contenir des mots que vous ne comprenez pas. Nous vous invitons à poser toutes les questions nécessaires au chercheur responsable du projet ou aux autres personnes affectées au projet de recherche et à leur demander de vous expliquer tout mot ou renseignement qui n'est pas clair.

NATURE ET OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

Nous voulons valider une nouvelle méthode de dépistage des infections urinaires que nous avons développée dans nos laboratoires de recherche. Nous avons donc besoin de votre approbation pour utiliser l'urine qui reste après que votre culture d'urine soit

BioTechniques
A single protocol for extraction of gDNA from bacteria and yeast
 –Manuscript Draft–

Manuscript Number:	
Full Title:	A single protocol for extraction of gDNA from bacteria and yeast
Article Type:	Report
Keywords:	DNA extraction, DNA amplification, bacteria, yeast, PCR
Corresponding Author:	Eric Harold Frost, Ph.D. Universite de Sherbrooke Sherbrooke, Quebec CANADA
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universite de Sherbrooke
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Laurie Vingataramin, B.Sc.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Laurie Vingataramin, B.Sc. Eric Harold Frost, Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	Guanidine thiocyanate breakage of microorganisms has been the standard initial step in genomic DNA (gDNA) extraction of microbial DNA for two decades despite its requirement for pretreatments in order to extract DNA from microorganisms other than Gram negative bacteria. We report a quick and low cost genomic DNA extraction protocol called EtNa that is efficient for bacteria and yeast over a broad range of concentrations. EtNa is based on a hot alkaline ethanol lysis. The solution can be immediately centrifuged to yield a crude gDNA extract satisfactory for PCR or the solution can be directly applied to a silica column for purification.

EtNa DNA extraction**PROTOCOL FOR:****DNA extraction from bacteria and yeast**

Laurie Vingataramin, Eric H. Frost

Département de microbiologie et d'infectiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada. J1H 5N4

REAGENTS

Ethanol 96% (Thermo Fisher Scientific, Inc., Ottawa, ON, Canada)

NaOH (Thermo Fisher Scientific, Inc., Ottawa, ON, Canada)

EDTA (Thermo Fisher Scientific, Inc., Ottawa, ON, Canada)

Silica column (QIAamp DNA mini kit, Qiagen, Toronto, ON, Canada)

TritonTM-X-100 (SIGMA-ALDRICH, St-Louis, MO, USA)

Tween20 (SIGMA-ALDRICH, St-Louis, MO, USA)

Nutrient broth (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada)

PROCEDURE

HEADING 1: EtNa crude

PEG-NaOH DNA extraction P., Chomczynski modified method**PROTOCOL FOR:****DNA extraction from bacteria**

Laurie Vingataramin, Eric. H Frost

Département de microbiologie et d'infectiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada J1H 5N4.

REAGENTS

PEG 200 (SIGMA-ALDRICH, St-Louis, MO, USA)

NaOH (Thermo Fisher Scientific, Inc., Ottawa, ON, Canada)

PROCEDURE

HEADING 1:

1. Begin by placing 100 µL of sample in a microcentrifuge tube. This sample may be an overnight culture of a bacteria in Nutrient Broth, bacterial colonies suspended in water, nutrient broth, or saline.
2. Centrifuge at 8000 rpm for 4 min
3. Remove 90 µL of the supernatant
4. Add 90 µL of PEG-NaOH solution. Mix briefly
5. Heat at 80°C for 10 min

RECIPES

SUPPLEMENTARY MATERIAL

1. PCR efficiency

The PCR efficiency and amplification factor were measured according to Thermo Scientific guidelines (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/qpcr/efficiency/>) (See figure S1).

2. Solubilisation of precipitated DNA

Rapid solubilisation of DNA is important when DNA is to be used immediately for PCR. Several buffers were compared for efficiency of rapid versus 4°C overnight solubilisation of freshly precipitated DNA. Buffers containing 1% Triton-X-100 performed better than buffers with 0.5 % Tween 80 or without detergents (see figure S2). Overnight incubation was not necessary to solubilize freshly precipitated DNA.

3. Increased buffer concentration to prevent PCR inhibition

Residual EtNa extraction buffer may not be efficiently removed from DNA pellets for fear of also removing the virtually invisible DNA pellet. Addition of 10 µl of EtNa extraction solution to 100 µl of solubilisation buffer resulted in PCR inhibition. Increasing the concentration of Tris-HCl to 50 mM in the solubilisation buffer prevented subsequent PCR inhibition even if 15 µl of EtNa solution was added (See Table S3).

View Letter

Page 1 of 1

View Letter[Close](#)

Date: 12/08/2014
To: "Eric Harold Frost" [REDACTED]
From: "BioTechniques" bioeditor@biotechniques.com
Subject: BioTechniques MS#BT5794R1 ACCEPTED

Dear Dr Frost:

I am pleased to inform you that your manuscript "A single protocol for extraction of gDNA from bacteria and yeast" has been accepted for publication.

Page proofs will be prepared and sent by email as a PDF. Please let us know of any upcoming changes in your mailing address, FAX number, or email address.

If you plan to order color reprints, you may wish to consider ordering extra issues of the journal to be printed as a lower cost alternative to the color reprints. Press overruns must be ordered and paid for BEFORE page proofs are prepared. Alternatively, we will also print color reprints in black and white. For pricing, send an enquiry to reprints@biotechniques.com with the words "reprint pricing" in the subject line.

Thank you for contributing your manuscript to BioTechniques.

Best regards,
Patrick C.H. Lo, Ph.D.
Senior Editor

[Close](#)