

Rapport

De

Synthèse

Validation de la méthode d'analyse

GeneDisc[®] *Legionella pneumophila*

suivant le protocole de validation PCR Legionella_révision 1
(25.01.2011)

- Laboratoire Central CAE -

Méthode de référence : NF T 90-471

Centre d'Analyses Environnementales

GIE des Laboratoires

Laboratoire Central

Immeuble "Le Dufy" - 1 place de Turenne

94417 SAINT-MAURICE CEDEX

Tél : 01.49.76.52.52

Fax : 01.49.76.58.75

SOMMAIRE

OBJET

RAPPELS SUR LA METHODE GENEDISC®

PRINCIPE

PROTOCOLE

HISTORIQUE DE LA VALIDATION

MODIFICATIONS INTERVENUES DEPUIS LA VALIDATION INITIALE

PERFORMANCES

RACCORDEMENT DE LA SOLUTION CALIBRANTE ET DU MATERIEL DE REFERENCE A
L'ETALON PRIMAIRE

FONCTION DE CALIBRAGE

LIMITE DE DETECTION

LIMITE DE QUANTIFICATION

DETERMINATION DU RENDEMENT ET DE LA ROBUSTESSE

INCLUSIVITE ET EXCLUSIVITE

PRATICABILITE

ETUDE INTERLABORATOIRES

OBJECTIF

PLAN D'ESSAI ET ANALYSES REALISEES

RESULTATS

CONCLUSION

OBJET

Etudes réalisées par :

Centre d'Analyses Environnementales – VEOLIA ENVIRONNEMENT
Immeuble 'le Dufy'
1, place de Turenne
94417 Saint Maurice cedex

Pour :

Pall GeneDisc® Technologies
Centre d'Affaires CICEA
4, rue du Courtil
35170 Bruz

Ce rapport de synthèse présente l'ensemble des résultats obtenus depuis la validation initiale (2007) jusqu'à la reconduction de la validation, demandée avec modification et extension (2012).

RAPPELS SUR LA METHODE ALTERNATIVE

Principe

La méthode GeneDisc® *Legionella pneumophila* est constituée de deux étapes :

- une première étape de préparation de l'ADN microbien à partir de l'échantillon d'eau réalisée avec les plateformes GeneExtract ou GeneDisc® DNA Extractor et nécessitant l'utilisation du Extraction Pack Environment 1 pour tous les types d'eau ou le Extraction Pack Environment 3 pour les eaux propres,
- une deuxième étape de quantification de l'ADN de *Legionella pneumophila* par PCR en temps réel avec l'instrument GeneDisc® Cyclor et les *Legionella* GeneDisc Packs.

Protocole

La méthode GeneDisc® *Legionella pneumophila* est basée sur l'utilisation des kits suivants :

- Extraction de l'ADN bactérien :
 - o Extraction Pack Environment 01 (Notices PENVI1096_02.FR et PENVI1096_02.EN)
 - o Extraction Pack environment 03 (Notices PENVI3100_01.FR et PENVI3100_01.EN)
- Détection et quantification par PCR en temps réel :
 - o *Legionella* spp. GeneDisc® Pack (Notices GLEGSP_02.FR et GLEGSP_02.EN)
 - o *Legionella pneumophila* GeneDisc® Pack (Notices GLEGPNE_02.FR et GLEGPNE_02.EN)
 - o Duo *Legionella pneumophila*-spp. GeneDisc® Pack (Notices GLEGDUO_02.FR et LEGDUO_02.EN)

L'Extraction Pack Environment 1 contient tous les consommables et réactifs nécessaires pour la filtration des échantillons d'eau, la lyse cellulaire et la purification de l'ADN. L'extraction de l'ADN est basée sur une lyse mécanique des cellules en présence de détergeant, suivie d'une purification de l'ADN par adsorption sur mini colonne de silice. L'ensemble du protocole de préparation d'ADN est géré par le GeneExtract ou le GeneDisc® DNA Extractor.

L'Extraction Pack Environment 3 contient tous les consommables et réactifs nécessaires pour la filtration des échantillons d'eau, la lyse cellulaire et la concentration de l'ADN. L'extraction de l'ADN est basée sur une lyse mécanique des cellules, suivie d'une concentration de l'ADN sur une unité de centrifugation. L'étape de lyse cellulaire est gérée par le GeneExtract ou le GeneDisc® DNA Extractor. L'ADN de *Legionella* est ensuite quantifié par PCR en temps réel grâce aux *Legionella* GeneDisc® Packs.

Le test PCR GeneDisc® *Legionella* repose sur l'amplification génique par PCR en temps réel d'une séquence nucléique spécifique du genre *Legionella pneumophila*. La détection est possible grâce à l'utilisation de sondes TaqMan® marquées par un fluorophore (FAM ou ROX). Lors de l'élongation de l'amplicon, la sonde est clivée et le fluorophore, séparé physiquement du Quencher, émet une

fluorescence. Cette fluorescence est mesurée directement par le module optique du GeneDisc® Cyclcr.

Pour chaque analyse, le mélange ADN/Master Mix, déposé dans un secteur du GeneDisc® Plate, est adressé par dépression dans les chambres réactionnelles pré-chargées en réactifs (amorces, sondes, ADN). La composition des chambres réactionnelles de chaque secteur des différents types de GeneDisc® Plates entrant dans le cadre des méthodes est indiquée dans le tableau suivant :

GeneDisc® Legionella pneumophila			
GLEGSPP106006		Détection FAM	Détection ROX
N°secteur analyse	N°puits PCR		
1-5	1	Contrôle interne d'inhibition	-
	2	Contrôle interne d'inhibition	-
	3	Analyse <i>Legionella</i> spp.	-
	4	Analyse <i>Legionella</i> spp.	-
	5	Analyse <i>Legionella</i> spp.	-
	6	Contrôle négatif	-
6	1	Contrôle négatif	-
	2	Analyse <i>Legionella</i> spp.	-
	3	Analyse <i>Legionella</i> spp.	-
	4	Contrôle interne d'inhibition	-
	5	Contrôle interne d'inhibition	-
	6	Contrôle externe quantitatif Lg	-
GLEGPNE112006		Détection FAM	Détection ROX
N°secteur analyse	N°puits PCR		
1-11	1	Contrôle interne d'inhibition	Contrôle négatif -
	2	Analyse <i>L. pneumophila</i>	-
	3	Analyse <i>L. pneumophila</i>	-
12	1	Analyse <i>L. pneumophila</i>	-
	2	Contrôle interne d'inhibition	Contrôle négatif
	3	Contrôle externe quantitatif Lp	-
GLEGPNE106006		Détection FAM	Détection ROX
N°secteur analyse	N°puits PCR		
1-5	1	Contrôle interne d'inhibition	-
	2	Contrôle interne d'inhibition	-
	3	Analyse <i>L. pneumophila</i>	-
	4	Analyse <i>L. pneumophila</i>	-
	5	Analyse <i>L. pneumophila</i>	-
	6	Contrôle négatif	-

6	1	Contrôle négatif	-
	2	Analyse <i>L. pneumophila</i>	-
	3	Analyse <i>L. pneumophila</i>	-
	4	Contrôle interne d'inhibition	-
	5	Contrôle interne d'inhibition	-
	6	Contrôle externe quantitatif Lp	-
GeneDisc® Legionella DUO			
GLEGDUO106006		Détection FAM	Détection ROX
N°secteur analyse	N°puits PCR		
1-5	1	Contrôle interne d'inhibition Lp	Contrôle négatif
	2	Analyse <i>L. pneumophila</i>	-
	3	Analyse <i>L. pneumophila</i>	-
	4	-	Analyse <i>Legionella</i> spp.
	5	-	Analyse <i>Legionella</i> spp.
	6	Contrôle négatif	Contrôle interne d'inhibition L.g
6	1	-	Analyse <i>Legionella</i> spp.
	2	Analyse <i>L. pneumophila</i>	-
	3	Contrôle négatif	Contrôle interne d'inhibition Lg
	4	Contrôle interne d'inhibition Lp	Contrôle négatif
	5	-	Contrôle externe quantitatif Lg
	6	Contrôle externe quantitatif Lp	-

Lp : *L. pneumophila* Lg: *Legionella* spp.

D'un point de vue quantitatif, pour chaque lot de GeneDisc®, un GeneDisc® de calibration, correspondant à l'amplification PCR des ADN génomiques standards de *L. pneumophila* ATCC33152 (réf. ALEGPNE105), est analysé. Le logiciel du GeneDisc® Cycloer calcule automatiquement le Ct, les paramètres de l'équation de la gamme étalon et le polynôme du second degré représentant la courbe : Amplitude de fluorescence des Témoins d'inhibition = f(Ct *L. pneumophila*). Ce polynôme traduit la sensibilité des témoins internes d'inhibition à la compétition, en présence d'ADN génomique de *L. pneumophila* (hors inhibition).

Les paramètres obtenus avec le GeneDisc® de calibration et son Master Mix associé sont sauvegardés et appliqués à tous les GeneDisc® Plates d'un même lot, sur un GeneDisc® Cycloer donné, conformément à la définition de la série PCR selon la norme NF T90-471.

Pour chaque échantillon analysé, dans les mêmes conditions expérimentales que celles du GeneDisc® Plate de calibration, le pourcentage d'inhibition des témoins internes d'inhibition est déterminé par le logiciel de façon à indiquer à l'opérateur le facteur de dilution à appliquer si nécessaire (d5 ou d10). Si la réaction PCR n'est pas inhibée, le logiciel calcule automatiquement le Ct et le convertit en nombre d'UG de *Legionella* / L en fonction du volume d'eau filtré.

Historique de la validation

La méthode GeneDisc® *Legionella pneumophila* est validée sous le numéro GEN 25/04 – 12/07. La première validation a été prononcée en décembre 2007.

Une première extension portant sur les modifications suivantes a été validée en 2008:

- Modification du format des colonnes de silice dans le pack d'extraction (miniaturisation) pour traiter 48 échantillons simultanément.
- Modification du design du GeneDisc avec 12 secteurs d'analyse, les analyses PCR sont réalisées en duplicate (2 puits PCR par cible) au lieu de triplicate.

Une étude d'extension de validation a été menée sur les parties suivantes de l'étude préliminaire : limite de détection et de quantification, linéarité, rendement optimal.

Une deuxième extension portant sur les modifications suivantes a été validée en 2012:

- Validation selon la norme NF T90-471.
- Modification des automates : la préparation des extraits d'ADN est réalisée avec le GeneDisc® DNA Extractor et l'analyse PCR est réalisée avec le GeneDisc® Cyclor v3.

Une étude d'extension de validation a été menée par un laboratoire expert sur les parties suivantes de l'étude préliminaire : raccordement à l'étalon primaire, linéarité, rendement optimal.

Enfin, une troisième extension a été validée, elle aussi, en 2012. Elle concerne la mise en place d'un protocole simplifié de préparation d'ADN pour les eaux sanitaires et les eaux « propres ». Une étude d'extension a été menée par un laboratoire expert sur le rendement et la robustesse de la méthode ainsi que sur sa praticabilité.

Modifications intervenues depuis la validation initiale

Modification du référentiel de validation

La reconduction a été réalisée en tenant compte des exigences et plans d'expérience définis dans la nouvelle version du référentiel de validation « Protocole de validation pour les méthodes commerciales de détection et de dénombrement de *Legionella* spp. et *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction en chaîne de polymérisation (PCR) », révision 1, (version adoptée en janvier 2011 par AFNOR Certification) et sur les modes de calcul décrits dans la norme AFNOR NF T 90-471 : 2010, pour le dénombrement de *Legionella* et *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction en chaîne de polymérisation (PCR) en temps réel.

Évolutions de la méthode alternative

La méthode GeneDisc® *Legionella pneumophila* a évolué depuis la validation initiale.

Ces évolutions portent sur la modification du format des colonnes de silice dans le pack d'extraction (miniaturisation) permettant de traiter 48 échantillons simultanément ainsi que sur la modification du design du GeneDisc avec 12 secteurs d'analyse, les analyses PCR sont réalisées en duplicate (2 puits PCR par cible) au lieu de triplicate.

Une deuxième évolution a été réalisée sur la méthode lui permettant d'être en conformité avec la norme NF T90-471. Par ailleurs, les automates ont été modifiés : la préparation des extraits d'ADN est réalisée avec le GeneDisc® DNA Extractor et l'analyse PCR est réalisée avec le GeneDisc® Cyclor v3. Enfin, un protocole simplifié de préparation d'ADN pour les eaux sanitaires et les eaux « propres » a été mis en place.

PERFORMANCES

Les performances de la méthode (raccordement à l'étalon primaire, fonction de calibrage limites de détection et de quantification de l'étape PCR, linéarité, rendement et robustesse de l'extraction), sa sélectivité, sa praticabilité et la qualité des réactifs ont été évaluées.

Les résultats de l'étude inter-laboratoire ont été obtenus lors de l'étude de validation initiale.

Raccordement de la solution calibrante et du matériel de référence à l'étalon primaire

A partir de l'étalon primaire, 3 gammes indépendantes de cinq niveaux ont été préparées par dilutions en cascade dans la solution utilisée pour analyser le blanc PCR (diluant fourni par le CNR). Les dilutions couvrent le domaine de quantification linéaire. La même opération a été réalisée à partir de la solution calibrante de travail avec le diluant fourni par Pall GeneDisc® Technologies. Les deux lots de 3 gammes ont été analysés dans la même série PCR.

- Raccordement de l'étalon primaire pour la cible *L. pneumophila*

Les résultats obtenus à partir de l'étalon primaire sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Q (UG/puit)	LOG (Q)	Ct obtenus			Ct moyen
		Gamme 1	Gamme 2	Gamme 3	
25	1,40	34,433	34,7735	34,1135	34,44
250	2,40	32,5795	31,1215	31,9245	31,88
2500	3,40	28,1675	28,4595	27,767	28,13
25 000	4,40	24,153	24,718	24,0395	24,30

250 000	5,40	20,8785	21,025	20,8415	20,92
---------	------	---------	--------	---------	-------

Pente	-3,46	-4,115 < a < -2,839	CONFORME
Intercept	39,70		

La pente est bien comprise entre $-4,115 < a < -2,839$, ce qui correspond à une efficacité d'amplification comprise entre 75 et 125%.

Les résultats obtenus à partir de la solution calibrante de travail sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Q (UG/puit)	LOG (Q)= Valeur attendue	Ct obtenus			Ct moyen	LOG (Ct moyen)= Valeur recalculée	Erreur de calibrage par niveau	CONCLUSION
		Gamme 1	Gamme 2	Gamme 3				
25	1,40	34,83	34,14	34,62	34,53	1,49	-0,09	CONFORME
250	2,40	31,83	31,51	31,43	31,59	2,34	0,06	CONFORME
2500	3,40	27,92	27,90	27,96	27,92	3,40	0,00	CONFORME
25 000	4,40	24,63	24,35	24,04	24,34	4,44	-0,04	CONFORME
250 000	5,40	20,80	20,76	20,82	20,79	5,46	-0,06	CONFORME
erreur de calibrage moyenne							-0,03	CONFORME
Vérification équivalence des pentes : Val.absolue(Erreur de calibrage log (250000)-log(25))							0,03	CONFORME

Pour chaque niveau, l'écart entre le logarithme de la valeur calculée et celui de la valeur attendue est inférieur à 0,15. La valeur absolue de la différence des écarts du point haut et du point bas de la gamme (erreur de calibrage) est inférieure à 0,15 log. Les résultats obtenus sont donc conformes à ceux attendus.

- Raccordement du matériau de référence à l'étalon primaire pour la cible *L. pneumophila*

Les résultats obtenus pour le matériau de référence sont représentés dans le tableau ci-dessous. Ces résultats ont été obtenus par l'amplification simultanée du matériau de référence déjà présent dans le GeneDisc et de l'étalon primaire.

Q (UG/ puit)	Log Q théorique (log UG/puit)	Ct matériau de référence			Ct moyen	Log (Valeur recalculée du matériau de référence)	Erreur de calibrage par niveau	CONCLUSION
		Gamme 1	Gamme 2	Gamme 3				
250	2,40	31,763	32,037	31,069	31,62	2,33	-0,07	CONFORME

La valeur absolue de l'erreur de calibrage est inférieure à 0,15, ce qui est conforme au critère de la norme NF T90-471.

Fonction de calibrage

La fonction de calibrage a été évaluée par l'analyse de 5 gammes indépendantes réalisées à partir de 5 tubes d'ADN génomique étalon de *L. pneumophila* ATCC33152

fournis par la société Pall GeneDisc® Technologies (Réf. ALEGPNE105). La détection et l'amplification ont été réalisées avec le «GeneDisc *Legionella* DUO 06».

- Etude de la fonction de calibrage de *L. pneumophila* avec le « GeneDisc *Legionella* Duo 06».

Equation de la fonction d'étalonnage			
Pente/Efficacité	Domaine acceptable	Ordonnée à l'origine	Conclusion
-3.49	-4,115 < a < -2,839 75% < e < 125%	39.7	CONFORME

	Analyse de l'incertitude - modèle en cours d'évaluation (NF T90-471)				
Cible UG	25	250	2500	25000	250000
Cible Log	1,40	2,40	3,40	4,40	5,40
biais moyen	0.03	-0.03	-0.02	0.03	0.00
ecart type	0.10	0.10	0.01	0.07	0.03
Elin*	+/- 0.10 Log	+/- 0.10 Log	+/- 0.03 Log	+/- 0.08 Log	+/- 0.03 Log
Domaine acceptable	≤0,15	≤0,15	≤0,15	≤0,15	≤0,15
Conclusion	CONFORME	CONFORME	CONFORME	CONFORME	CONFORME

*Elin = $\sqrt{(\text{biais}^2 + \text{écart type}^2)}$

En considérant l'Elin qui est inférieur à 0,15 sur tous les niveaux de la gamme de calibrage, le domaine linéaire est validé entre 25 et 250 000 UG d'ADN génomique de *L. pneumophila* ATCC 33152 pour la recherche de *L. pneumophila*.

Limite de détection

30 solutions indépendantes d'ADN de concentration estimée à 5 UG/puits ont été testées. L'amplification et la détection ont été faites sur le consommable destiné à la détection de *Legionella pneumophila* (*Legionella pneumophila* GeneDisc pack – Réf. GLEGPNE106006).

En conclusion, la limite de détection est validée à 5 UG/puits pour la méthode GeneDisc *Legionella pneumophila*, conformément aux performances annoncées par le fournisseur.

Limite de quantification

Une solution d'ADN de concentration estimée à 25 UG/puits a été analysée 30 fois, en condition de répétabilité. L'amplification et la détection ont été faites sur le kit « *Legionella pneumophila* GeneDisc Pack ».

- Résultats

	Valeur cible	Valeur cible (log)	Valeur moyenne mesurée (n = 30)	Biais (log)	Ecart-type du biais	Exactitude E _{LQ} *	Incertitude de mesure**
Critères de validation							<0.30
Résultats obtenus	25	1,39	23	0,03	0.07	0.077	0.15
Conclusion							conforme

**Exactitude E_{LQ} = $\sqrt{(\text{biais}^2 + \text{écart type}^2)}$

**Incertitude de mesure = $2 \times \sqrt{(\text{biais}^2 + \text{écart type}^2)}$

En conclusion, la limite de quantification est répétable à 25 UG/puits : en termes d'incertitude de mesure, elle est conforme au modèle statistique et aux exigences de la norme NF T90-471.

Détermination du rendement et de la robustesse

Le rendement du kit d'extraction « Extraction Pack Environment 1 » (Réf. PENVI1096) a été évalué. La détection et l'amplification ont été réalisées avec le « GeneDisc *Legionella pneumophila* 12 secteurs » (Réf. GLEGPNE112006).

- Incertitudes liées à la lyse directe

	Evian	ECS	TAR
	Moyenne (log UG)	Moyenne (log UG)	Moyenne (log UG)
Jour 1	8,22	8,45	8,47
Jour 2	8,47	8,49	8,43
Jour 3	8,63	8,64	8,52
Jour 4	8,35	8,61	8,73
Jour 5	8,28	8,55	8,48

- Etude du rendement de la méthode Pall GeneDisc Technologies

Type d'eau	Niveau de concentration visé	Moyenne du rendement obtenu (%)*	Ecart-type*	Moyenne du rendement par type d'eau (%)	Moyenne du biais par type d'eau (Log)	Ecartype du Biais par type d'eau	Incertitude (U**) par type d'eau
Eau d'Evian	1 000	47	14	82	0,15	-0,25	0,29
	100 000	117	43				
ECS	1 000	45,4	18	63	0,24	-0,23	0,34
	100 000	81	24				
TAR	1 000	89	32	90	0,08	-0,16	0,18
	100 000	90	39				

*Résultats calculés à partir des données obtenues sur les 5 jours d'essais.

** $U = \sqrt{(\text{biais moyen})^2 + (\text{ecart-tytpe du biais})^2}$

Les rendements moyens obtenus sont supérieurs à 25%. Aucune inhibition n'a été observée lors de ces essais. Tous les rendements calculés ont des valeurs comprises entre 25% et 199% et les biais associés sont compris entre -0,6 et 0,3, conformément aux exigences de la norme NF T90-471.

Les résultats sont donc conformes à ceux attendus.

Rendement obtenu avec le protocole simplifié pour les eaux sanitaires et les « eaux propres »

Le rendement du kit d'extraction « Extraction Pack Environment 3 » (Réf. PENVI3100) a été évalué. L'évaluation inclut l'utilisation de l'unité de centrifugation (Nanosep 30K) ou non. La détection et l'amplification ont été réalisées avec le «GeneDisc *Legionella* DUO 06 secteurs» (Réf. GLEGNUO106006).

- Résultats des lyses directes sur les suspensions mères

	Evian Moyenne (log UG)		ECS Moyenne (log UG)	
	<i>Legionella spp.</i>	<i>L.pneumophila</i>	<i>Legionella spp.</i>	<i>L.pneumophila</i>
Jour 1	8,89	9,03	9,03	9,08
Jour 2	8,63	8,69	8,53	8,57
Jour 3	8,59	8,64	8,07	8,09
Jour 4	8,61	8,73	8,61	8,69
Jour 5	8,21	8,33	8,75	8,83

Les rendements par niveaux de concentration et par types d'eau sont détaillés dans le tableau ci-dessous.

Type d'eau	Protocole	Niveau de concentration visé	rendement moyen (biais) (Log)	Variance (Ecart-type du Biais) ² (log)	Incertitude (U _{élargie} ^{**}) (log)	rendement moyen (biais) (Log)	Incertitude U _{élargie} , K = 2 **
Eau d'Evian	sans Nanosep	1 000	0,04	0,08	0,58	0,033	0,193
		100 000	-0,09	0,11	0,70		
ECS		1 000	0,13	0,12	0,73		
		100 000	0,05	0,26	1,03		
Eau d'Evian	avec Nanosep	1 000	-0,32	0,15	1,00	-0,228	0,545
		100 000	-0,1	0,21	0,93		
ECS		1 000	-0,39	0,13	1,06		
		100 000	-0,1	0,26	1,05		

**U_{élargie} = √((biais moyen)² + (ecart-type du biais)²)

Les rendements moyens obtenus pour *Legionella pneumophila* sont supérieurs à 25%. Aucune inhibition n'a été observée lors de ces essais. Tous les rendements calculés ont des valeurs comprises entre 25% et 199% (ce qui correspond à des valeurs de biais comprises entre - 0,6 et + 0,3 log).

Les résultats sont donc conformes aux exigences de la norme NF T90-471.

Inclusivité et exclusivité

Les essais d'inclusivité ont été effectués sur des extraits d'ADN de façon à obtenir environ 100 UG par puits. Au total, 21 souches de *Legionella* spp. et 15 sérogroupes de *L. pneumophila* ont été testés.

Les essais d'exclusivité ont été effectués sur des extraits d'ADN de façon à obtenir au minimum 10 000 UG par puits. Au total, 17 souches bactériennes autres que du genre *Legionella* ont été testées.

En conclusion, les ADN des 36 souches *Legionella* testées ont tous été détectés et parmi les 17 extraits d'ADN testés, appartenant à d'autres genres que *Legionella*, aucune réaction croisée (absence d'amplification) n'a été détectée.

La sélectivité de la méthode GeneDisc® *Legionella pneumophila* est satisfaisante.

Praticabilité

MODE DE CONDITIONNEMENT DES REACTIFS

Les réactifs sont présentés dans les conditionnements suivants.

- **Extraction Pack Environnement 01**

Les éléments sont donnés sur l'emballage et page 2 de la notice.

Les réactifs d'extraction sont :

- ✓ « Tampon de lyse ».
- ✓ « Tampon de liaison » utilisable après ajout d'un « supplément Tampon de liaison ».
- ✓ « Tampon de lavage 1 ».
- ✓ « Tampon de lavage 2 ».
- ✓ « Tampon d'éluion ».
- ✓ Barrettes de 8 mini-colonnes de silice.

- **Extraction Pack Environnement 03**

Les éléments sont donnés sur l'emballage et page 2 de la notice.

Les réactifs d'extraction sont :

- ✓ 2 flacon de 25 mL « Elution Buffer »
- ✓ 2 sachets de 50 « Lysis tubes »
- ✓ 100 entonnoirs équipés de membranes de polycarbonate 0.45µm
- ✓ 100 NanoSep® Centrifugal devices 30K

- **Legionella GeneDisc Pack**

Les éléments sont donnés sur l'emballage et page 2 de la notice.

Il existe trois références de GeneDiscs Packs 6 échantillons :

- ✓ *Legionella* spp GeneDisc Pack (Réf. GLEGSPP106006).
- ✓ *Legionella pneumophila* GeneDisc Pack (Réf. GLEGPNE106006).
- ✓ *Legionella* DUO GeneDisc Pack (Réf. GLEGPUO106006)

Il existe une référence de GeneDiscs Packs 12 échantillons :

- ✓ *Legionella pneumophila* GeneDisc Pack (Réf. GLEGPNE112006).

Chaque GeneDisc Pack contient :

- ✓ Le "mix réactionnel" utilisé lors de la réaction PCR (6 tubes : 1 tube / GeneDisc)
- ✓ 6 « GeneDiscs »

VOLUME DES REACTIFS

Le volume des réactifs à utiliser est indiqué sur la notice du **Extraction Pack environnement 01** et du **Extraction Pack environnement 03**.

CONDITION DE STOCKAGE DES ELEMENTS ET PEREMPTION DES PRODUITS

La température de stockage est indiquée sur les packs et à la page 1 des notices des Extraction Packs et des GeneDisc Plates *Legionella*. Les GeneDisc Packs doivent être conservés au réfrigérateur (5°C ± 3°C). Tous les autres composants peuvent être stockés à température ambiante (15°C-30°C).

La date de péremption est indiquée sur les Packs, ainsi que sur chaque constituant des Packs.

MODALITES D'UTILISATION APRES PREMIERE UTILISATION

Les réactifs sont utilisés jusqu'à épuisement dans le respect de la date de péremption.

EQUIPEMENTS ET LOCAUX SPECIFIQUES NECESSAIRES

Le matériel et les consommables nécessaires sont indiqués sur la page 3 des notices des Extraction Packs et des GeneDisc Packs.

Les mesures de sécurité nécessaires sont indiquées page 1 des notices des Extraction Packs et des GeneDisc Packs.

REACTIFS PRETS A L'EMPLOI OU A RECONSTITUER

✓ **Extraction Packs :**

Lors de la première utilisation du Extraction Pack Environment 01, les solutions suivantes doivent être préparées :

- « Binding buffer »
- « Washing buffer 2 »

La préparation des réactifs est décrite page 3 de la notice du pack. Les autres réactifs sont prêts à l'emploi.

Lors de la première utilisation du **Extraction Pack environment 03**, il faut préparer des « Lysis Tubes » : centrifuger les tubes pendant 5 min à 10,000g, retirer le surnageant à l'aide d'une micropipette de 1mL, puis ajouter dans chaque tube 500 µL de « Dilution Buffer ».

✓ **GeneDisc Packs :**

Les réactifs sont prêts à l'emploi. Cependant, pour chaque numéro de lot de GeneDisc Plates, une droite d'étalonnage doit être validée préalablement. Pour cela, il faut reconstituer un tube d'ADN calibré à 250 000 UG/puits PCR (Réf. ALEGPNE1005).

DUREE DE FORMATION DE L'OPERATEUR NON INITIE A LA METHODE

La formation initiale du technicien est de 2 jours.

TEMPS REELS DE MANIPULATION

Etapas	Temps nécessaire pour 8 échantillons	
	Extraction Pack Environment 01	Extraction Pack Environment 03
Filtration	En fonction du type d'eau ente 5 à 30 minutes	En fonction du type d'eau ente 5 à 30 minutes
Extraction de l'ADN	1h15	30 min
PCR	15 min de préparation /durée de la PCR : 55min	15 min de préparation /durée de la PCR : 55min
Analyse des résultats	10 minutes	10 minutes

DELAI D'OBTENTION DES RESULTATS

• **Délai minimum :**

Le délai minimum d'obtention des résultats est de 3h05 avec l'Extraction pack Environment 01 et de 2h20 avec l'Extraction pack Environment 03.

En cas de présence d'inhibition, la durée est augmentée de 1h30.
Le résultat peut être délivré à J0.

- **Réalisation de la PCR après extraction :**

L'analyse peut être interrompue après l'extraction. L'extrait est ainsi conservé à $-20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ si l'analyse PCR n'est pas faite dans les 6 heures après l'extraction. Ceci permet d'optimiser l'organisation des analyses.

TYPE DE QUALIFICATION DE L'OPERATEUR

Technicien.

TRAÇABILITE DES RESULTATS D'ANALYSE

Les résultats sont conservés sous formes de fichiers informatiques et/ou papier. Les étapes autres que la PCR sont tracées dans des documents prévus par le laboratoire. Le GeneDisc Cyclor[®], le GeneExtract[®] et le GeneDisc[®] DNA Extractor sont équipés de lecteur code-barres permettant la traçabilité de l'analyse (lot, date, opérateur, identification des échantillons).

MAINTENANCE PAR LE LABORATOIRE

Aucune maintenance n'est effectuée par le laboratoire.
Une maintenance annuelle est réalisée par Pall GeneDisc[®] Technologies : métrologie thermique, optique et validation biologique.

VOLUME MINIMUM A PIPETER

Le volume minimal à pipeter est de 20 µl.

STABILITE DES REACTIFS ET DES GAMMES

La date de péremption ainsi que la stabilité sont indiquées sur les coffrets des packs. Les conditions de stockage sont décrites sur les Packs.

UNG

Les conseils de prévention des contaminations sont indiqués à la page 4 de la notice des Extraction Pack Environment et page 5 de la notice des GeneDisc Plates.

En effet, la prévention passe par la décontamination des modules, des accessoires de filtration et le respect des Bonnes Pratiques de Laboratoire.

Le « blanc méthode » garantit, entre autres, l'absence de contamination d'ADN lors de l'analyse.

PROTECTION DES REACTIFS AUX UV

Les réactifs sont conservés dans leur emballage d'origine (opaque à la lumière).

CONTROLE EXTERNE QUANTITATIF DE LA PCR

A chaque disque, l'amplification d'un matériau de référence, raccordé à l'étalon primaire et pré-déposé dans les secteurs 6 des GeneDisc Plates 6 échantillons et dans les secteurs 12 des GeneDisc Plates 12 échantillons, est réalisée (cf. Page 2 de la notice du GeneDisc Pack).

CONTROLE D'ABSENCE D'INHIBITEURS

A chaque analyse, la présence d'inhibiteur de la PCR dans l'extrait d'ADN est contrôlée. Un témoin interne d'inhibition est présent dans chaque secteur d'analyse. Il s'agit d'oligonucléotides calibrés comportant les amorces spécifiques de *Legionella* spp ou *L. pneumophila*. Ces témoins sont amplifiés en même temps que les échantillons. (Cf. Page 2 de la notice du GeneDisc Pack).

3. ETUDE INTER-LABORATOIRES

Objectif

L'objectif de cette étude est d'évaluer la fidélité (répétabilité et reproductibilité) des kits commercialisés par la société Pall GeneDisc® Technologies pour la détection de *Legionella pneumophila*. L'ensemble des laboratoires participants à cet essai utilise la technologie GeneDisc.

Plan d'essai et analyses réalisées

PLAN D'ESSAI

Ces essais comportent trois phases qui correspondent à des matrices différentes :

- Phase I : solution de deux extraits d'ADN de *L. parisiensis* (CIP 103847) et *L. pneumophila* (ATCC 33152).
- Phase II : eau de distribution dopée en *L. parisiensis* (CIP 103847), *L. pneumophila* (ATCC 33152) et *E. coli* (CIP 106878).
- Phase III : eau chaude sanitaire naturellement contaminée.

Les souches de légionelles utilisées sont cultivées sur gélose GVPC, la souche de *E. coli*, quant à elle, est cultivée en bouillon nutritif. Les souches proviennent de pastilles du commerce pour *L.*

pneumophila (ATCC 33152) et *E.coli* (CIP 106878) et de la collection du Laboratoire Central pour *L. parisiensis* (CIP 103847).

La détection de *Legionella pneumophila* a été réalisée pour les trois phases.

Pour la phase I, deux niveaux de dopage ont été réalisés. Le premier niveau de dopage était contenu dans les tubes A et le deuxième niveau de dopage était contenu dans les tubes B.

Pour la phase II, deux niveaux de dopage ont également été réalisés. Le premier niveau de dopage était contenu dans les flacons C et le deuxième niveau de dopage était contenu dans les flacons D.

Pour la phase III, les échantillons étaient contenus dans les flacons E.

CONTROLE DE LA QUALITE DES MATERIAUX

Les différents échantillons (A, B, C, D et E).ont fait l'objet d'un contrôle de lot sur 10 flacons testés sur la période analytique souhaitée.

Résultats

CONTROLE DE LA QUALITE DES MATERIAUX

Le contrôle de lot a montré que l'ensemble des flacons testés (A, B, C, D et E) est homogène et stable sur la période analytique souhaitée

REPETABILITE ET REPRODUCTIBILITE

Le tableau présenté ci-après reprend les principales informations pour le paramètre *Legionella pneumophila*.

Valeurs de fidélité - *Legionella spp* :

Paramètre	<i>Legionella spp</i>	<i>Legionella spp</i>	<i>Legionella spp</i>	<i>Legionella spp</i>	<i>Legionella spp</i>
Echantillon	A	B	C	D	E
Nombre de laboratoires retenus	14	14	15	15	11
Nombre initial de laboratoires	16	16	16	16	16
M = Moyenne générale (n/l)	186 546	1 795 000	70 756	708 257	149 673
Sr (n/l)	20 123	146 896	25 698	100 706	36 279
SR (n/l)	55 991	486 895	65 645	686 326	141 448
CVR (%)	10,8%	8,2%	36,3%	14,2%	24,2%
CVR (%)	30,0%	27,1%	92,8%	96,9%	94,5%
M = Moyenne générale (en log)	5,253	6,241	4,667	5,666	5,013
Sr (en log)	0,051	0,035	0,113	0,084	0,098
SR (en log)	0,130	0,104	0,445	0,440	0,425
CVR (%)	1,0%	0,6%	2,4%	1,5%	2,0%
CVR (%)	2,5%	1,7%	9,5%	7,8%	8,5%

Avec :

- M = moyenne générale : somme de toutes les données non éliminées, divisée par le nombre de données non éliminées
- s_r : écart-type de répétabilité
- s_R : écart-type de reproductibilité
- CV_r : coefficient de variation de répétabilité ($=s_r/M$), s'exprime en %
- CV_R : coefficient de variation de reproductibilité ($=s_R/M$), s'exprime en %

Plusieurs conclusions apparaissent à la suite de cette étude.

La première conclusion concerne la moyenne des résultats obtenus par l'ensemble des laboratoires comparée à la valeur moyenne estimée par le laboratoire opérateur (test d'homogénéité). La différence maximale entre ces deux valeurs est de 0,25 Log.

Les écarts types de répétabilité montrent que l'ensemble de la méthode est répétable puisque la valeur maximale obtenue est de 0,113 Log.

Enfin, les écarts types de reproductibilité traduisent le degré de complexité des échantillons. En effet, l'écart type maximal obtenu pour l'analyse des solutions d'ADN est de 0,130 Log, il peut atteindre 0,445 pour les échantillons prenant en compte l'ensemble des étapes de l'analyse (préparation de l'ADN et amplification).

CONCLUSION

Ces données sont conformes aux performances annoncées par le fournisseur.

3. CONCLUSION

Les résultats de l'étude préliminaire ainsi que de l'étude inter-laboratoire montrent que les performances de la méthode GeneDisc® pour la détection de *Legionella pneumophila* sont conformes aux exigences de la norme NF T 90-471.

La validation de la méthode GeneDisc® a été reconduite le 04 avril 2012 sous le numéro d'attestation GEN 25/04-12/07 par AFNOR Validation. La méthode GeneDisc® *Legionella pneumophila* s'applique à tout type d'eau, sans restriction d'emploi.