



# GeneDisc® *legionella spp* pour la détection et la quantification des *Legionella spp.* dans tous types d'eau

---

Méthode qualitative et quantitative

Janvier 2020

**Attestation n° GEN 25/03-12/07**

**Pall Genedisc technologie**  
1 rue du Courtil  
35170 BRUZ  
FRANCE



*Ce rapport comprend 29 pages, incluant 3 annexes. La reproduction de ce rapport n'est autorisée que sous sa forme intégrale.*

## Préambule

**Méthode étudiée:**

GeneDisc<sup>®</sup> *Legionella* spp

**Protocole de validation:**

«Protocole de validation pour les méthodes commerciales de détection et de dénombrement de *Legionella* et *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) V3.0 » (23/09/2015).

**Champ d'application:**

Tous types d'eau

**Organisme de certification:**

AFNOR Certification (<http://nf-validation.afnor.org/>)

<b>1</b>	<b><u>INTRODUCTION</u></b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b><u>MODIFICATIONS DEPUIS LA DERNIERE RECONDUCTION</u></b>	<b>4</b>
2.1	HISTORIQUE DE VALIDATION	4
2.2	EVOLUTIONS DE LA METHODE ALTERNATIVE	6
2.3	BILAN DES RECLAMATIONS UTILISATEURS CONCERNANT LA METHODE	6
<b>3</b>	<b><u>PROTOCOLE</u></b>	<b>6</b>
3.1	METHODE ALTERNATIVE	6
3.1.1	PRESENTATION DU SYSTEME DE DETECTION	6
3.1.2	PROTOCOLE / PRINCIPE DE LA METHODE	7
3.2	METHODE DE REFERENCE	8
<b>4</b>	<b><u>SYNTHESE DES RESULTATS OBTENUS LORS DE LA VALIDATION INITIALE ET DES EVENTUELLES RECONDUCTIONS ET EXTENSIONS</u></b>	<b>9</b>
4.1	ETUDE COMPARATIVE	9
4.1.1	RACCORDEMENT DE LA SOLUTION CALIBRANTE ET DU MATERIEL DE REFERENCE A L'ETALON PRIMAIRE	9
4.1.2	ETUDE DE LA FONCTION DE CALIBRAGE DE L'ETAPE PCR QUANTITATIVE	10
4.1.3	LIMITE DE DETECTION	12
4.1.4	LIMITE DE QUANTIFICATION	13
4.1.5	SEUIL DE POSITIVITE	14
4.1.6	DETERMINATION DU RENDEMENT ET DE LA ROBUSTESSE	14
4.1.7	RENDEMENT OBTENU AVEC LE PROTOCOLE SIMPLIFIE POUR LES EAUX SANITAIRES ET LES « EAUX PROPRES »	15
4.1.8	INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE	16
4.1.9	PRATICABILITE	17
4.2	ETUDE INTER-LABORATOIRES	21
4.2.1	CONCLUSION	22
4.3	CONCLUSIONS GENERALES	22
	<b><u>ANNEXE 1: RESULTATS LIMITE DE DETECTION</u></b>	<b>23</b>
	<b><u>ANNEXE 2: RESULTATS LIMITE DE QUANTIFICATION</u></b>	<b>26</b>
	<b><u>ANNEXE 3: RESULTATS RENDEMENT ET ROBUTESSE</u></b>	<b>28</b>

# 1 Introduction

Le présent document présente les résultats de l'étude de validation d'une méthode de détection et de quantification des *Legionella spp* par biologie moléculaire avec la technologie GeneDisc de Pall GeneDisc Technologies.

Les essais ont été réalisés selon le protocole d'AFNOR Certification « Protocole de validation pour les méthodes commerciales de détection et de dénombrement de *Legionella* et *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) V3.0 » (23/09/2015).

Le présent rapport reprend des données issues du laboratoire ENDETEC (validation 2007 à 2015) et les données issues des tests réalisés par le laboratoire AdGène pour l'étude d'extension de 2018.

Lors de l'étude d'extension :

- ❖ La validation des GeneDisc Plate *Legionella pneumophila* (GLEGPNE206006 et GLEGPNE212006) et *Legionella* DUO (GLEGDUO206006) a porté sur :
  - la limite de détection pour la détection de *Legionella spp.* et *Legionella pneumophila*
  - la limite de quantification et la linéarité pour la quantification de *Legionella spp.* et *Legionella pneumophila*
  - l'inclusivité, l'exclusivité pour la détection de *Legionella pneumophila*
- ❖ La validation de la méthode qualitative a porté sur:
  - la limite de détection et le seuil de positivité pour la détection de *Legionella spp.*, *Legionella pneumophila* et *Legionella pneumophila* séro groupe 1.
  - la linéarité pour la détermination de l'intercepte pour *Legionella spp.*, *Legionella pneumophila* et *Legionella pneumophila* séro groupe 1.
  - l'inclusivité, l'exclusivité pour la détection de *Legionella pneumophila* séro groupe 1.
- ❖ La validation de la méthode quantitative a porté sur:
  - l'étude de linéarité pour *Legionella spp.* et *Legionella pneumophila*
  - la limite de quantification
  -

## 2 Modifications depuis la dernière reconduction

### 2.1 Historique de validation

Les méthodes GeneDisc® *Legionella spp.* (Référence des GeneDisc Plates : GLEGSPP106006 & GLEGDUO106006) et *Legionella pneumophila* (références des GeneDisc Plates : GLEGPNE106006 & GLEGPNE112006, GLEGDUO106006), sont certifiées NF validation par AFNOR certification depuis 2007 (certificats n° GEN 25/03

– 12/07 et GEN 25/04 – 12/07 pour *Legionella* spp. et *Legionella pneumophila*, respectivement). Depuis cette date, différentes modifications et compléments ont été apportés. Le tableau ci-dessous reprend l'ensemble de ces évènements.

Année	Type de complément	Commentaire
2007	Certification initiale	
2008	Extensions <ul style="list-style-type: none"> <li>- Miniaturisation des colonnes de silice</li> <li>- PCR en duplicat (à la place de triplicat)</li> </ul>	Le laboratoire expert (ENDETEC) a refait des tests pour valider les critères de performance suivants : <ul style="list-style-type: none"> <li>- LD, LQ</li> <li>- Linéarité</li> <li>- Rendement</li> </ul>
2012	Extensions <ul style="list-style-type: none"> <li>- Validation selon la norme NF T90-471</li> <li>- Extraction des ADN par le GeneDisc DNA Extractor</li> <li>- Amplification par le GeneDisc Cyclor v3</li> </ul>	Le laboratoire expert (ENDETEC) a refait des tests pour valider les critères de performance suivants : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Raccordement à l'étalon primaire</li> <li>- Linéarité</li> <li>- Rendement</li> </ul>
2012	Reconduction et modifications <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mise en place d'un protocole simplifié pour les eaux sanitaire et extraction par l'Extraction Pack Environment 3</li> <li>- Nouveau fournisseur de BSA pour le master mix</li> </ul>	Le laboratoire expert (ENDETEC) a refait des tests pour valider les critères de performance suivants : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Rendement</li> <li>- Robustesse</li> <li>- Praticabilité</li> </ul>
2015	Reconduction et modifications <ul style="list-style-type: none"> <li>- Nouvelle version du protocole de validation</li> <li>- GDUP (GeneDisc Ultra-Purifier)</li> <li>- GeneDisc Plate <i>Legionella</i> ID pour la détection qualitative de <i>Legionella</i> spp. et <i>Legionella pneumophila</i></li> </ul>	Travail des données pour le seuil de positivité et d'un témoin d'inhibition. Pas de tests supplémentaires réalisés.
2018	Extension Les seuls changements ne concernent que la partie amplification du système de détection et quantification de <i>Legionella</i> spp. et <i>Legionella pneumophila</i> .  <u>GeneDisc plate <i>Legionella</i> spp :</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Modification du mix PCR</li> <li>- Changement de l'algorithme</li> </ul> <u>GeneDisc plate <i>Legionella pneumophila</i> :</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Modification des amorces et sonde de détection/quantification</li> <li>- Modification du mix PCR</li> <li>- Changement de l'algorithme</li> </ul>	Le laboratoire AdGène a refait des tests pour valider les critères de performance suivants : <u>GeneDisc plate <i>Legionella</i> spp :</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- LOD</li> <li>- LOQ</li> <li>- Linéarité</li> </ul> <u>GeneDisc plate <i>Legionella</i> ID :</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- LOD</li> <li>- Linéarité</li> <li>- Exclusivité, exclusivité</li> <li>- Seuil de positivité</li> </ul> <u>GeneDisc plate <i>Legionella pneumophila</i> :</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- LOD</li> <li>- LOQ</li> <li>- Linéarité</li> <li>- Exclusivité, exclusivité</li> </ul>

	<p><u>GeneDisc plate <i>Legionella</i> ID pour la détection qualitative de <i>Legionella spp.</i>, <i>Legionella pneumophila</i> et <i>Legionella pneumophila</i> séro-groupe 1 :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ajout de la cible <i>Legionella pneumophila</i> séro-groupe 1</li> <li>- Modification des amorces et sonde de détection/quantification de la cible <i>Legionella pneumophila</i></li> <li>- Modification du mix PCR</li> <li>- Changement de l'algorithme</li> <li>- Commercialisation du GeneDisc en 6 et 12 secteurs nécessitant un puits PCR en duplex : <i>L. pneumophila</i> (FAM) et <i>L. pneumophila</i> séro-groupe 1 (ROX).</li> </ul>	
--	---	--

## 2.2 Evolutions de la méthode alternative

Le protocole de validation (Protocole de validation pour les méthodes commerciales de détection et de dénombrement de *Legionella* et *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) V3.0 (23/09/2015)) est identique à celui de la précédente reconduction.

Il n'y a pas eu de modification de la méthode depuis la dernière extension.

## 2.3 Bilan des réclamations utilisateurs concernant la méthode

Aucune réclamation n'est parvenue à l'AFNOR depuis la dernière reconduction.

# 3 Protocole

## 3.1 Méthode alternative

### 3.1.1 Présentation du système de détection

Les méthodes GeneDisc® *Legionella spp* et *Legionella pneumophila* sont basées sur un système de détection et quantification des *Legionella spp* et *Legionella pneumophila* par PCR en temps réel dans tout type d'eaux.

Ce système est composé de deux étapes :

Une première étape de préparation de l'ADN microbien à partir de l'échantillon d'eau réalisée avec

- L'Extraction Pack Environnement 1 (référence : PENVI1096) pour la préparation d'ADN à partir d'échantillons de tous types d'eau
- L'Extraction Pack Environnement 3 (référence : PENVI3100) pour la préparation d'ADN à partir d'échantillons d'eaux « propres »
- Les plateformes GeneDisc DNA Extractor (GDDE, référence : EGDDE01) ou GeneDisc Ultra-Lyser (GDUL, référence : EGDUL1A) et GeneDisc Ultra-Purifier (GDUP, référence : EGDUP1A) pour la mise en œuvre des packs d'extraction.

Une deuxième étape de quantification de l'ADN de *Legionella* par PCR en temps réel avec l'instrument GeneDisc Cycloer V3 (GDC V3, référence : EGDCV3A) et les GeneDisc Packs :

- GeneDisc *Legionella* spp. 6 secteurs (référence : GLEGSPP206006)
  - GeneDisc *Legionella pneumophila* 6 & 12 secteurs (référence : GLEGPNE206006 & GLEGPNE212006)
  - GeneDisc *Legionella* DUO 6 secteurs (référence : GLEGDUO206006)
- GeneDisc *Legionella* ID 6 & 12 secteurs (référence : GLEGOID206006 & GLEGOID212006)

### 3.1.2 Protocole / principe de la méthode



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 détergent, 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 Les plateformes GeneDisc® DNA

Extractor (GDDE, référence : EGDDE01) ou GeneDisc Ultra-Lyser (GDUL, référence : EGDUL1A) et GeneDisc Ultra-Purifier (GDUP, référence : EGDUP1A).

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'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® Cyclor.

Pour chaque analyse, le mélange ADN/Master Mix, déposé dans un secteur du GeneDisc® Plate, est adressé par dépression dans les chambres réactionnelles préchargées en réactifs (amorces, sondes, ADN).

D'un point de vue quantitatif, pour chaque lot de GeneDisc plate, un GeneDisc de calibration, correspondant à l'amplification PCR des ADN génomiques standards de *L. pneumophila* WDCM 00107 (réf. ALEGPNE105), est analysé. Le logiciel du GeneDisc Cyclor 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 =  $f(\text{Ct } L. \text{ pneumophila})$ . 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 calibrage et son Master Mix associé sont sauvegardés et appliqués à tous les GeneDisc plates d'un même lot, sur un GeneDisc Cyclor 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.

### 3.2 Méthode de référence

**NF T90-471 (juin 2015)** : Qualité de l'eau - Détection et quantification des *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (RT-PCR).

**ISO/TS 12869 (avril 2019)** : Qualité de l'eau - Détection et quantification de *Legionella* spp et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR).



**Protocole de validation PCR** : Protocole de validation pour les méthodes commerciales de détection et de dénombrement de *Legionella* et *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) V3.0

## 4 Synthèse des résultats obtenus lors de la validation initiale et des éventuelles reconductions et extensions

### 4.1 Etude comparative

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

**Ces données sont issues des études de validation antérieures (2007 et 2011) laboratoire Endetec**

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 *Legionella spp*

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

Q (UG/puits)	Log (Q)	Ct obtenus			Ct moyen
		Gamme 1	Gamme 2	Gamme 3	
25	1,40	31,334	32,323	31,6155	31,76
250	2,40	29,3485	28,6005	28,586	28,85
2 500	3,40	25,246	25,422	25,4885	25,39
25 000	4,40	21,8845	21,6405	21,5335	21,69
250 000	5,40	18,248	18,5385	18,2705	18,35

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

Q (UG/puits)	Log (Q) Valeur attendu	Ct obtenus			Ct moyen	Log (Q) valeur recalculée	Erreur de calibrage par niveau	Conclusion
		Gamme 1	Gamme 2	Gamme 3				
25	1,40	31,55	31,61	31,62	31,59	1,52	-0,12	Conforme
250	2,40	28,61	28,55	28,39	28,52	2,42	-0,03	Conforme
2 500	3,40	25,47	25,08	24,54	25,03	3,45	-0,05	Conforme
25 000	4,40	21,73	21,47	21,41	21,53	4,48	-0,08	Conforme
250 000	5,40	18,23	18,17	18,35	18,25	5,44	-0,05	Conforme
<b>Erreur moyenne de calibrage</b>							-0,06	Conforme
<b>Vérification équivalence des pentes : Val. Absolue (Erreur de calibrage log (250000)-log(25))</b>							0,07	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.**

**Remarque :** Lors de l'étude d'extension réalisée par AdGène en 2018, l'étape de raccordement n'a pas été réalisée. En effet, le standard utilisé pour la réalisation de la gamme de calibration est inchangé. De plus, la modification des amorces et sondes d'un système PCR n'a eu aucun impact sur le raccordement.

#### 4.1.2 Etude de la fonction de calibrage de l'étape PCR quantitative

**Ces données sont issues de l'étude complémentaire réalisée par le laboratoire AdGène (2018).**

La fonction de calibrage permet de définir l'efficacité de la PCR et de vérifier les performances de la régression linéaire au travers de l'exactitude de linéarité.

##### 4.1.2.1 Méthodologie

Les essais sont réalisés dans des conditions de reproductibilité intermédiaire.

Cinq gammes de 5 niveaux : 25, 250, 2 500, 25 000 et 250 000 unités génome de *Legionella pneumophila* par tube réactionnel sont préparées à partir d'ADN d'une souche *Legionella pneumophila* WDCM 00107 (référence : ALEGPNE205).

Le premier point de la gamme est égal à la limite de quantification soit 25 unités génome de *Legionella pneumophila* par tube réactionnel.

Les gammes sont amplifiées dans des conditions de reproductibilité intermédiaire.

Les résultats sont analysés de manière à calculer la pente de la droite de calibration et l'exactitude de linéarité

#### 4.1.2.2 Résultats

##### GeneDisc Plate *Legionella* DUO (GLEGDUO206006)

							Sommes
Niveau Xi		LQ	10LQ	100LQ	1 000LQ	10 000LQ	
		<b>25</b>	<b>250</b>	<b>2 500</b>	<b>25 000</b>	<b>250 000</b>	
X'i théorique = log Xi		1,40	2,40	3,40	4,40	5,40	
y'i,j	rep1	33,1	29,8	26,7	23,6	20,15	
	rep2	33,4	29,95	26,85	23,8	20,2	
	rep3	33,25	30	26,95	23,8	19,85	
	rep4	32,75	29,3	26,15	22,95	19,5	
	rep5	33,8	30,25	27	23,7	20,25	
$T_i = \sum_{j=1}^k Y_{i,j}$		166,3	149,3	133,65	117,85	99,95	500,75
$M_i = \frac{T_i}{k}$		33,26	29,86	26,73	23,57	19,99	
X'i Ti		232,477423	358,012443	454,134682	518,29723	539,524104	1869,96846
x'i,j	rep1	1,44	2,45	3,39	4,34	5,39	
	rep2	1,35	2,40	3,35	4,28	5,37	
	rep3	1,40	2,39	3,32	4,28	5,48	
	rep4	1,55	2,60	3,56	4,53	5,59	
	rep5	1,23	2,31	3,30	4,31	5,36	
moyenne X'i		1,39428482	2,42992295	3,38331923	4,3458535	5,43631954	
Biais		0,00	0,03	-0,01	-0,05	0,04	
écart-type		0,11767556	0,10736861	0,10474413	0,10855029	0,09596091	
Elin		<b>0,11773232</b>	<b>0,11203092</b>	<b>0,10575963</b>	<b>0,12040004</b>	<b>0,10335127</b>	
Ulin		0,37462424	0,35648238	0,33652715	0,38311292	0,32886375	

LOG (Q)	Ct moyen			
1,40	33,26			
2,40	29,86		Ordonnée origine	37,84
3,40	26,73			
4,40	23,57		Pente	-3,28
5,40	19,99			

#### 4.1.2.3 Conclusion

##### Critère de validation :

La pente doit être comprise entre  $-4,115$  et  $-2,839$

L'exactitude de linéarité doit être inférieure à  $0,15$  log pour l'ensemble des niveaux de la gamme

*Pente trouvée* : - 3,28 critère **conforme**

*E<sub>lin</sub>* < 0,15 : tous les niveaux ont un *E<sub>lin</sub>* < 0,15 **conforme**

##### GeneDisc Plate Legionella DUO (GLEGDUO212006)

	Critère	Résultat	Conformité
Pente	- 4,115 et - 2,839	-3,28	✓
Elin	< 0,15 log	Tous les Elin < 0,15	✓

#### 4.1.3 Limite de détection

**Ces données sont issues de l'étude complémentaire réalisée par le laboratoire AdGène (2018).**

L'estimation de la limite de détection PCR notée LD<sub>PCR</sub> consiste à connaître le plus petit nombre d'unités génome générant un résultat positif (une amplification) au seuil de confiance de 90 %. La LD<sub>PCR</sub> annoncée par le fournisseur à vérifier est de 5 unités génomes par puits.

##### 4.1.3.1 Méthodologie

Les essais suivants sont réalisés afin de vérifier la valeur de LD annoncée par le fournisseur. Pour ce faire, 30 solutions d'ADN indépendantes préparées à partir d'une solution d'ADN extraite d'une souche *Legionella pneumophila* WDCM 00107 raccordée à l'étalon primaire (référence : ALEGPNE205) sont réalisées par dilutions successives pour atteindre la limite de détection annoncée par le fournisseur (5 UG/puits PCR).

Certaines des 30 solutions indépendantes sont analysées dans un même run.

#### **4.1.3.2 Résultats**

Les résultats pour GeneDisc Plate DUO (GLEGDUO206006) sont présentés en [annexe 1](#).

#### **4.1.3.3 Conclusion**

Critère de validation : au minimum 90 % des solutions doivent être positives.  
L'ensemble des essais donne un Ct exploitable (100 % de présence)

***La limite de détection annoncée par le fournisseur est conforme.***

#### 4.1.4 Limite de quantification

***Ces données sont issues de l'étude complémentaire réalisée par le laboratoire AdGene (2018).***

La limite de quantification correspond au premier niveau de la gamme de calibrage.

La  $LQ_{PCR}$  annoncée par le fournisseur à vérifier est de 25 unités génomes par puits. La vérification de la limite de quantification consiste à s'assurer que l'exactitude au niveau de la limite de quantification (notée  $E_{LQ}$ ) est inférieure à la valeur critique de 0,15 log.

#### **4.1.4.1 Méthodologie**

Pour ce faire, 30 dilutions indépendantes à la valeur PCR LQ visée sont préparées à partir d'une solution d'ADN de *Legionella pneumophila* raccordée à l'étalon primaire (référence : ALEGPNE205).

Chacune de ces dilutions est amplifiée dans des conditions de reproductibilité intermédiaire. Les données provenant de l'étude de la fonction de calibrage ont été utilisées.

#### **4.1.4.2 Résultats**

Les résultats sont présentés en [annexe 2](#).

#### **4.1.4.3 Conclusions**

Critère de validation : Si  $E_{LQ} \leq 0,15$ , la limite de quantification ciblée est vérifiée et la  $LQ_{PCR}$  est conforme aux spécifications de la norme.

***L'exactitude au niveau de la LQ ( $E_{LQ}$ ) est de 0,146 : le critère est validé.***

#### 4.1.5 Seuil de positivité

**Ces données sont issues de l'étude complémentaire réalisée par le laboratoire AdGène (2018).**

La vérification du seuil de positivité est faite lors de l'étape de validation de la limite de détection. Les valeurs de Ct obtenues lors de la validation de la LD sont vérifiées comme étant inférieures à la valeur de Ct définie par le fabricant : 38 pour la cible *Legionella spp.*

Critère de validation : **Ct au seuil de positivité < Ct défini**

GeneDisc Plate *Legionella pneumophila*

Les valeurs trouvées lors de l'étude de LD ont toutes un Ct inférieure à la valeur de l'intercepte 37,8 et à la valeur définie par le fabricant (38).

#### 4.1.6 Détermination du rendement et de la robustesse

**Ces données sont issues des études de validation antérieures (2007 et 2011)**

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).

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

Table 1 : Incertitudes liées à la lyse directe

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.

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

Table 2 : Etude du rendement de la méthode Pall GeneDisc Technologies

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.

#### 4.1.7 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. GLEGDUO106006).

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

Table 1 : Résultats des lysés directes sur les suspensions mères

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) <sup>2</sup> (log)	Incertitude (U <sub>élargie</sub> <sup>**</sup> ) (log)	rendement moyen (biais) (Log)	Incertitude U <sub>élargie</sub> 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		

$$**U_{\text{élargie}} = \sqrt{(\text{biais moyen})^2 + (\text{ecart-type du biais})^2}$$

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.

L'ensemble des résultats bruts des différentes études est présenté en [annexe 3](#).

#### 4.1.8 Inclusivité/Exclusivité

##### **Ces données sont issues des études de validation antérieures (2007 et 2011)**

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 spp.* est satisfaisante.



#### 4.1.9 Praticabilité

**Ces données sont issues des études de validation antérieures (2007 et 2011)**

##### **4.1.9.1 Mode de conditionnement des réactifs**

Les réactifs sont présentés dans les conditionnements suivants.

- Extraction Pack Environnement 01 Les éléments sont donnés sur l'emballage et page 4 de la notice. Les réactifs d'extraction sont :

« Tubes de lyse ».

« Tampon de liaison » utilisable après ajout d'un « supplément Tampon de liaison ».

« Tampon de lavage 1 ».

« Tampon de lavage 2 ».

« Tampon d'élution ».

Barrettes de 8 mini-colonnes de silice.

100 sterile MicroFunnel™ filter funnels (300 mL) including polycarbonate membrane (0.4 µm) with a diameter of 47 mm.

- Extraction Pack Environment 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 sterile MicroFunnel™ filter funnels (300 mL) including polycarbonate membrane (0.4 µm) with a diameter of 47 mm.

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 GeneDisc Packs 6 échantillons :

*Legionella* spp. GeneDisc Pack (Réf. GLEGSPP206006).

*Legionella pneumophila* GeneDisc Pack (Réf. GLEGPNE206006 et GLEGPNE212006).

*Legionella* DUO GeneDisc Pack (Réf. GLEGDUO206006)

*Legionella* ID GeneDisc Pack (Réf: GLEGOID206006 et GLEGOID212006)

Chaque GeneDisc Pack contient :

Le "mix réactionnel" utilisé lors de la réaction PCR (6 tubes : 1 tube / GeneDisc)

6 « GeneDisc plates »

##### **4.1.9.2 Volume des réactifs**

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

#### **4.1.9.3 Condition de stockage des éléments et péremption des produits**

La température de stockage est indiquée sur les packs et à la page 2 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.

#### **4.1.9.4 Modalités d'utilisation après première utilisation**

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

#### **4.1.9.5 Equipements et locaux spécifiques nécessaires**

Le matériel et les consommables nécessaires sont indiqués sur la page 2 et 4 des notices des Extraction Packs Environment 3 et Environment 1, respectivement, ainsi qu'en page 2 des GeneDisc Packs.

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

#### **4.1.9.6 Réactifs prêts à l'emploi ou à reconstituer**

Extraction Packs : Lors de la première utilisation du Extraction Pack Environment 01, les solutions suivantes doivent être préparées : « Binding buffer » et « 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 la détection quantitative, à chaque numéro de lot de GeneDisc Plates (GLEGSPP206006, GLEGPNE206006 & GLEGPNE212006, GLEGPUO206006), une droite d'étalonnage doit être validée préalablement à l'analyse des échantillons. Pour cela, il faut reconstituer un tube d'ADN calibré à 250 000 UG/puits PCR (Réf. ALEGPNE2005).

Durée de formation de l'opérateur non initié à la méthode

La formation initiale du technicien est de 2 jours.

## Temps réel de manipulation

Étapes	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

Table 2 : Temps réel de manipulation

### 4.1.9.7 Délai d'obtention des résultats

- 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.

### 4.1.9.8 Type de qualification de l'opérateur

Technicien.

### 4.1.9.9 Traçabilité des résultats 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).

### 4.1.9.10 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.

#### **4.1.9.11 Volume minimum à pipeter**

Le volume minimal à pipeter est de 20 µl.

#### **4.1.9.12 Stabilité des réactifs 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.

#### **4.1.9.13 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.

#### **4.1.9.14 Protection des réactifs aux UV**

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

## 4.2 Etude inter-laboratoires

Ces données sont issues des études de validation antérieures (2007 et 2011)

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.

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.

		Type d'échantillon	Extrait d'ADN		Eau de distribution dopée		Echantillon naturel
Niveau de contamination (GU/L)	de <i>L. pneumophila</i> WDCM 00107		7,600	94,000	660	7,000	eau chaude sanitaire naturellement contaminée
	<i>L. parisiensis</i> CIP 103847		8,800	85,000	1,800	16,000	
	<i>E. coli</i>				110	1,400	
Nombre de laboratoires	de participant		16	16	16	16	16
	retenus		14	14	15	14	11
Test d'homogénéité	Nombre d'analyses		20	20	7	11	10
	Moyenne (Log)		5.470	6.449	4.490	5.792	5.173
Résultats	Moyenne (Log)		5.253	6.241	4.667	5.666	5.013
	Biais (Log)		0.217	0.208	0.183	0.126	0.160
	S <sub>r</sub> (Log)		0.051	0.035	0.113	0.084	0.098
	S <sub>R</sub> (Log)		0.130	0.104	0.445	0.440	0.425
	E <sub>r</sub> ( $\sqrt{\text{biais}^2 + S_r^2}$ )		0.223	0.211	0.215	0.151	0.188
	E <sub>R</sub> ( $\sqrt{\text{biais}^2 + S_R^2}$ )		0.253	0.233	0.481	0.458	0.454
	E <sub>Total</sub> ( $\sqrt{\text{biais}^2 + S_r^2 + S_R^2}$ )		0.258	0.236	0.494	0.465	0.465

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).

#### 4.2.1 Conclusion

Ces données sont conformes aux performances annoncées par le fournisseur.

### 4.3 Conclusions générales

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 4 décembre 2019 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. L'identification par le GeneDisc *Legionella* ID est conforme, elle permet de détecter et de différencier la présence de *Legionella spp*, *Legionella pneumophila* et *Legionella pneumophila* séro groupe 1.

## Annexe 1: résultats limite de détection GeneDisc Plate DUO (GLEGDUO206006)

Limite de détection	
Ct LD (duplicat)	Ct LD moyen
35,4	35,6
35,8	
35	35,25
35,5	
34,9	35,25
35,6	
35,7	35,8
35,9	
36	36,15
36,3	
35	35,15
35,3	
35,2	35,35
35,5	
35	34,8
34,6	
35,1	34,95
34,8	
34,7	34,95
35,2	
35,6	36,1
36,6	
35,7	35,4
35,1	
36,5	35,5
34,5	
35,7	35,6
35,5	
35,8	35,7
35,6	
34,9	34,8
34,7	
34,6	34,65

34,7	
34,5	34,6
34,7	
35,5	35,9
36,3	
35	34,6
34,2	
35,2	35,6
36	
35,6	36,05
36,5	
36,7	36,25
35,8	
36,4	36,4
0	
35,9	35,05
34,2	
34,3	34,7
35,1	
35,2	35,35
35,5	
35,4	35,5
35,6	
35,6	35,45
35,3	
35,5	35,15
34,8	
<b>Total</b>	<b>30/30</b>
	<b>100%</b>

## Annexe 2: résultats limite de quantification

CT LQ (duplicat)	CT LQ (moyen)	log
33,10	33,1	1,44
33,10		
32,20	32,3	1,69
32,40		
33,70	33,4	1,35
33,10		
32,90	32,8	1,53
32,70		
33,30	33,25	1,40
33,20		
32,60	32,75	1,55
32,90		
33,70	33,8	1,23
33,90		
32,70	32,6	1,60
32,50		
34,00	34,05	1,15
34,10		
33,20	33,55	1,31
33,90		
33,80	33,65	1,28
33,50		
34,10	33,8	1,23
33,50		
33,80	33,8	1,23
33,80		
32,70	33,2	1,41
33,70		
33,00	32,85	1,52
32,70		
33,50	33,35	1,37
33,20		
33,10	33,3	1,38
33,50		
32,60	32,25	1,70
31,90		



33,4	33,1	1,44
32,8		
33,4	33,5	1,32
33,6		
33,1	33,25	1,40
33,4		
32,5	32,85	1,52
33,2		
33,8	33,8	1,23
33,8		
33,00	33,2	1,41
33,40		
33,30	33,25	1,40
33,20		
33,20	33,1	1,44
33,00		
33,00	33,1	1,44
33,20		
33,10	33	1,47
32,90		
32,5	32,55	1,61
32,6		
32,3	32,35	1,67
32,4		

moyenne  $X_i$

Biais

écart-type

Elin

Ulin

## Annexe 3: Résultats rendement et robustesse

2007 Etude sur " Legionella Extraction Pack 01":

Type d'eau	Niveau de concentration visé (GU)	Moyenne du rendement par niveau de contamination (%)	Moyenne du rendement par type d'eau (%)	Moyenne du biais par type d'eau	Ecartype du Biais
Evian	1,000	117	75	- 0.19	0.25
	10,000	45			
	100,000	63			
ECS	1,000	102	64	- 0.27	0.26
	10,000	58			
	100,000	32			
TAR	1,000	84	66	- 0.24	0.27
	10,000	73			
	100,000	42			

2009 Etude sur " Extraction Pack Environment 1":

Type d'eau	Niveau de concentration visé (GU)	Moyenne du rendement par niveau de contamination (%)	Moyenne du rendement par type d'eau (%)	Moyenne du biais par type d'eau	Ecartype du Biais	Incertitude
Evian	1,000	123	97	- 0.05	0.21	0.43
	10,000	59				
	100,000	109				
ECS	1,000	140	99	- 0.07	0.25	0.57
	10,000	89				
	100,000	68				
TAR	1,000	115	84	- 0.15	0.25	0.52
	10,000	80				
	100,000	58				

2011 Etude sur “Extraction Pack Environment 1”:

Type d'eau	Niveau de concentration visé (GU)	Moyenne du rendement par niveau de contamination (%)	Moyenne du rendement par type d'eau (%)	Moyenne du biais par type d'eau (Log)	Ecartype du Biais	Incertitude
Evian	1,000	47	82	0.15	0.25	0.29
	100,000	117				
ECS	1,000	45	63	0.24	0.23	0.34
	100,000	81				
TAR	1,000	89	90	0.08	0.16	0.18
	100,000	90				

2012 Etude sur “ Extraction Pack Environment 3”:

Type d'eau	Protocole	Niveau de concentration visé (GU)	Moyenne du rendement par niveau de contamination (%)	Moyenne du rendement par type d'eau (%)	Moyenne du biais par type d'eau (Log)	Ecartype du Biais	Incertitude
Evian	sans NanoSep	1,000	93	89	0.10	0.08	0.291
		100,000	126		- 0.06	0.13	0.348
	avec NanoSep	1,000	50		- 0.04	0.17	0.499
		100,000	87		- 0.22	0.21	0.466
ECS	sans NanoSep	1,000	76	78	0.14	0.12	0.363
		100,000	102		0.00	0.15	0.514
	avec NanoSep	1,000	42		- 0.43	0.15	0.529
		100,000	92		- 0.05	0.17	0.522