

Votre Interlocutrice :

Valentine DIGONNET
valentine.dignonnet@afnor.org
ligne directe : +33 (0)1 41 62 60 85
télécopie : +33 (0)1 49 17 90 19

PALL GENEDISC technologies
Madame Sylvie HALLIER-SOULIER
Centre d'affaires CICEA
1, rue du Courtil bâtiment 4
35170 BRUZ

nos références : RV/RV/148/fab/FAB/GeneSystems/Lettre prolongation

objet : prolongation de validation

St Denis, le 14 octobre 2011

Madame,

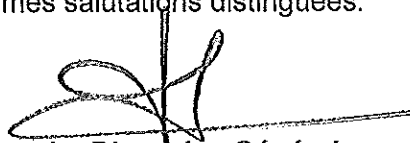
Le droit d'usage de la marque NF VALIDATION des 2 méthodes alternatives suivantes :

GeneSystems <i>Legionella spp</i>	Ref. GEN 25/03 – 12/07
GeneSystems <i>Legionella pneumophila</i>	Ref. GEN 25/04 – 12/07

arrivera à expiration le **18.12.2011** avant que les résultats des études de reconduction ne puissent être présentés au Bureau Technique de la marque NF VALIDATION.

C'est pourquoi, suite à l'avis positif exprimé par le Bureau Technique "Microbiologie" de la marque NF VALIDATION/ Application à l'analyse de l'eau, **je vous accorde une prolongation du droit d'usage de la marque NF VALIDATION pour ces deux méthodes jusqu'au 29 février 2012.**

Je vous prie d'agréer, Madame, mes salutations distinguées.



La Directrice Générale

Florence MÉAUX





Méthodes d'analyse pour l'eau
Performances analytiques certifiées

**ATTESTATION DE VALIDATION DE METHODE D'ANALYSE
SUIVANT LE PROTOCOLE DE VALIDATION PCR *Legionella***

N° attestation : GEN 25/04 – 12/07

Date de validation : 18.12.2007
Date extension : 25.03.2009
Fin de validité : 18.12.2012

La Société **GeneSystems**
(siège social et Centre d'affaires CICEA
site de production) 1, rue du Courtil
35 170 BRUZ

est autorisée à faire référence à la marque AFNOR VALIDATION pour la méthode d'analyse quantitative ci-dessous :

GeneSystems *Legionella pneumophila*

Référence des protocoles :

Nom du produit	Référence SAP	Nouvelle version de la notice (SAP)	Ancienne version de la notice
Extraction Pack Environnement 1	PENV11096	PENV11096_01.FR	PELEG05/96_05.FR
GeneDisc <i>Legionella pneumophila</i> 06	GLEGPNE106006	GLEGPNE_01.FR	GDLPN-471_07.FR
GeneDisc <i>Legionella pneumophila</i> 12	GLEGPNE112006	GLEGPNE_01.FR	GDLPN-471_07.FR
GeneDisc <i>Legionella</i> DUO 06	GLEGDUO106006	GLEGDUO_01.FR	GDLPLG-471_02.FR
Standard Calibrated DNA LP	ALEGPNE105	ALEGPNE_01.FR	SDNA-LP_04.FR

DOMAINE D'APPLICATION : Prélèvements tous types d'eaux

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI : Aucune

METHODE DE REFERENCE

Norme XP T 90-471, Détection et quantification des *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR), Avril 2006

Le Directeur Général Délégué
Jacques BESLIN

HISTORIQUE DE LA VALIDATION

La première validation a été prononcée en décembre 2007.
Les modifications suivantes ont été apportées aux kits 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 duplicat (2 puits PCR par cible) au lieu de triplicat.

Une étude d'extension de validation a été menée par un laboratoire expert sur les parties suivantes de l'étude préliminaire : limite de détection et de quantification, linéarité, rendement optimal. Les résultats d'extension figurent dans la présente version de l'attestation.

L'extension a été validée. Le nouveau kit modifié ne remplace pas le kit validé en 2007 : les deux versions sont validées et pourront être utilisées au choix. Les ADN extraits au moyen du « Extraction Pack Environnement 1 » sont analysables quel que soit le design du GeneDisc, sur 2 ou 3 puits d'analyse.

PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode GeneSystems *Legionella* est constituée de deux étapes :

- une première étape de préparation de l'ADN microbien à partir de l'échantillon d'eau réalisée avec la plateforme GeneExtract[®] et nécessitant l'utilisation du « Extraction Pack Environnement 1 »,
- une deuxième étape de quantification de l'ADN de *Legionella pneumophila* ou *Legionella* spp par PCR en temps réel avec l'instrument GeneDisc Cycle[®] et les GeneDisc *Legionella pneumophila* 06, *Legionella pneumophila* 12 et GeneDisc *Legionella* DUO 06.

RENDEMENT OPTIMAL DE LA METHODE

L'étude du rendement est effectuée sur 6 échantillons indépendants, à trois niveaux de contamination, ceci pour trois matrices différentes (une eau minérale témoin (eau d'Evian), une eau chaude sanitaire, une eau de tour aéro-réfrigérante).

Chacune des eaux a été testée préalablement pour être exempte d'acides nucléiques de *Legionella*. Les échantillons ont été artificiellement contaminés par une suspension mère constituée à partir d'une souche de *L. pneumophila* (souche ATCC33152).

Etude 2007 sur le *Legionella* Extraction Pack 01 :

Type d'eau	Niveau de contamination visé (UG)	Moyenne du rendement par niveau de contamination (%)	Rendement moyen par type d'eau (%)	Blais moyen par type d'eau	Ecart-type du blais
Eau d'Evian	1 000	117	75	-0,19	0,25
	10 000	45			
	100 000	63			
Eau Chaude Sanitaire	1 000	102	64	-0,27	0,26
	10 000	58			
	100 000	32			
Tour Aéro-réfrigérante	1 000	84	66	-0,24	0,27
	10 000	73			
	100 000	42			

Etude 2009 sur le Legionella Extraction Pack 05 :

Type d'eau	Niveau de contamination visé (UG)	Moyenne du rendement par niveau de contamination (%)	Rendement moyen par type d'eau (%)	Biais moyen par type d'eau	Ecart-type du biais	Incertitude (1)
Eau d'Evian	1 000	123	97	-0,05	0,21	0,43
	10 000	59				
	100 000	109				
Eau Chaude Sanitaire	1 000	140	99	-0,07	0,25	0,57
	10 000	89				
	100 000	68				
Tour Aéro-réfrigérante	1 000	115	84	-0,15	0,25	0,52
	10 000	80				
	100 000	58				

⁽¹⁾Incertitude = $2 \times (\sqrt{\text{biais}^2 + \text{écart-type}^2})$

Conclusion

Le rendement moyen obtenu par la méthode est supérieur à 25%. Aucune inhibition n'a été observée. La méthode est robuste vis-à-vis des différents types d'eau testés.

LIMITE DE DETECTION DE LA PCR (LD_{PCR})

L'étude des performances du *Legionella pneumophila* GeneDisc Premium a été réalisée avec l'ADN déshydraté de *L. pneumophila* ATCC 33152, commercialisé par la société GeneSystems, sous la référence SDNA-Lp.

Etude 2007:

La limite de détection du *Legionella pneumophila* GeneDisc Premium avec l'ADN de *L. pneumophila* ATCC 33152 est de 5 UG/PCR, soit 170UG/L quand 1 L d'eau est filtré.

Etude 2009 :

Trente essais ont été réalisés en duplicat, aucun résultat négatif n'a été trouvé. La limite de détection du *Legionella spp* GeneDisc Premium est de 5 UG/PCR.

LIMITE DE QUANTIFICATION DE LA PCR (LQ_{PCR})

Etude 2007:

La limite de quantification de 25 UG/PCR a été testée par 30 mesures, en condition de répétabilité, une solution d'ADN calibrée de *L. pneumophila* ATCC 33152.

	Valeur cible (UG/PCR)	Valeur cible (Log)	Moyenne (n=30)	Biais (Log)	IC à 95% (2.t.s)	t calculé (justesse)	Incertitude de mesure ⁽¹⁾
Critères					< 0,50	< 2,045	<0,30
Résultats	25	1,39	23	0,03	0,288	2,338	0,15
Conclusion					Conforme	Non Conforme	Conforme

$$^{(1)}\text{Incertitude de mesure} = \sqrt{(\text{biais}^2 + (\text{écart-type})^2)}$$

Les mesures à 25 UG/PCR sont répétables mais présentent un défaut de justesse selon le test de Student. En termes d'incertitude de mesure, la limite de quantification à 25 UG/PCR est conforme au modèle statistique approuvé par la commission AFNOR T90E en 2008. Les résultats des tests sur la limite de quantification à 25 UG/PCR sont donc satisfaisants.

Etude 2009 :

Trente analyses ont été réalisées en duplicat dans des conditions de répétabilité.

	Valeur cible (UG/PCR)	Valeur cible (Log)	Moyenne (n=30)	Biais (Log)	IC à 95% (2.t.s)	t calculé (justesse)	Incertitude de mesure ⁽¹⁾
Critères					< 0,50	< 2,045	<0,30
Résultats	25	1,39	23	0,03	0,390	0,118	0,208
Conclusion					Conforme	Conforme	Conforme

$$^{(1)}\text{Incertitude de mesure} = \sqrt{(\text{biais}^2 + (\text{écart-type})^2)}$$

Les résultats confirment que, lorsque l'analyse PCR est réalisée en 2 puits, la limite de quantification est répétable et juste jusqu'à 25 UG/puits. En termes d'incertitude de mesure, cette valeur est conforme au modèle statistique approuvé par la commission AFNOR T90E en 2008.

LINEARITE

Etude 2007 :

L'étude de linéarité a été effectuée avec cinq gammes de 5 niveaux de concentration d'ADN de *L. pneumophila* ATCC 33152 (25, 250, 2 500, 25 000 et 250 000 UG/PCR), analysées en condition de répétabilité.

Equation de la fonction d'étalonnage			
Pente / Efficacité	Domaine acceptable	Ordonnée à l'origine	Conclusion
-3,483 / 93,7%	-4,115 < a > -2,839 75% < E < 125%	40,257	Conforme
Analyse statistique du modèle linéaire			
Origine	Valeur observée	Valeur critique avec $\alpha = 5\%$	Conclusion
F du modèle de régression	2509,677	4,35	Conforme
F du modèle d'étalonnage	0,24	3,10	Conforme

Conclusion

La fonction d'étalonnage du *L. pneumophila* GeneDisc Premium est conforme aux critères d'acceptation définis dans le protocole de validation.

Etude 2009 :

L'étude de linéarité a été effectuée avec cinq gammes de 5 niveaux de concentration d'ADN étalon. La détection et l'amplification ont été réalisées avec le « Duo *L. pneumophila* – spp Pack »

Equation de la fonction d'étalonnage			
Pente / Efficacité	Domaine acceptable	Ordonnée à l'origine	Conclusion
-3,392	-4,115 < a > -2,839 75% < E < 125%	38,773	Conforme
Analyse statistique du modèle linéaire			
Origine	Valeur observée	Valeur critique avec $\alpha = 5\%$	Conclusion
F du modèle de régression	10444,6	4,35	Conforme
F du modèle d'étalonnage	4,13	3,10	Non conforme

La répétabilité (écart-type < 0,12 Log) ne permet pas de valider le domaine linéaire par le test de Fisher. Par contre, en considérant l'erreur de linéarité Elin (analyse de l'incertitude, modèle proposé par la commission AFNOR T90E), le domaine linéaire est validé entre 25 et 250 000 UG d'ADN génomique de *L.pneumophila* ATCC 33152.

Cible UG	Analyse de l'incertitude				
	25	250	2500	25000	250000
Cible Log	1,40	2,40	3,40	4,40	5,40
Biais moyen	0,060	-0,029	-0,070	-0,010	0,050
Ecart type	0,028	0,017	0,058	0,025	0,023
Elin*	+/- 0,07 Log	+/- 0,03 Log	+/- 0,09 Log	+/- 0,03 Log	+/- 0,05 Log
t	2,78	2,78	2,78	2,78	2,78
Incertitude	+/- 0,18 Log	+/- 0,09 Log	+/- 0,25 Log	+/- 0,07 Log	+/- 0,15 Log

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

SPECIFICITE du *L. PNEUMOPHILA* GENEDISC PREMIUM

Des tests ont été effectués sur l'ensemble des souches listées dans le protocole AFNOR Validation.

Tests d'inclusivité

Les 15 sérogroupes de *L. pneumophila* ont été détectés.

Tests d'exclusivité

L'analyse de l'ADN de 9 souches de *Legionella* spp et de 17 souches n'appartenant pas au genre *Legionella* n'ont pas mis en évidence la présence de réactions croisées.

ETUDE INTERLABORATOIRE

Une étude interlaboratoire a été réalisée en novembre 2007, avec 16 laboratoires collaborateurs. Deux laboratoires n'ont pas été en mesure de rendre les résultats attendus.

La finalité de cette étude est d'évaluer la fidélité (répétabilité et reproductibilité) de la méthode GeneSystems *Legionella* :

- pour l'étape d'amplification génique seule ;
- pour l'ensemble de l'analyse (concentration, lyse, extraction, purification et amplification génique) sur des suspensions bactériennes caractérisées ;
- pour l'ensemble de l'analyse en situation réelle (eau chaude sanitaire naturellement contaminée).

Résultats

	Type d'échantillons	Solution d'ADNs calibrés		Eau de distribution dopée		Echantillon naturel
Niveaux de dopage (UG/L)	<i>L. pneumophila</i> ATCC 33152	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	participant	16	16	16	16	16
	retenus	14	14	15	14	11
Test d'homogénéité	Nbre d'analyses	5	5	5	5	5
	Moyenne (Log)	5.401	6.489	4.338	5.365	4.798
Résultats	Moyenne (Log)	5.228	6.255	4.577	5.512	4.908
	Biais (Log)	0.173	0.234	-0.239	-0.147	-0.110
	S _r (Log)	0.068	0.056	0.104	0.120	0.159
	S _R (Log)	0.134	0.110	0.414	0.493	0.414
	E _r ($\sqrt{\text{biais}^2 + S_r^2}$)	0.186	0.240	0.260	0.189	0.193
	E _R ($\sqrt{\text{biais}^2 + S_R^2}$)	0.219	0.258	0.478	0.514	0.428
E _{Total} ($\sqrt{\text{biais}^2 + S_r^2 + S_R^2}$)	0.229	0.264	0.489	0.528	0.457	

En termes de répétabilité (r), l'écart-type observé est de 0.06 pour l'étape de PCR (solutions d'ADNs calibrés) et de 0.12 pour l'ensemble de la méthode (préparation d'ADN & PCR) avec des échantillons d'eau artificiellement contaminés et de 0.16 pour les échantillons naturels. La méthode GeneSystems *Legionella pneumophila* est répétable.

Les écart-types de reproductibilité (R) traduisent le degré de complexité des échantillons : ceux obtenus pour l'analyse PCR des solutions d'ADN calibré sont de l'ordre de 0.13 alors que ceux correspondant à l'ensemble des étapes de l'analyse (préparation d'ADN & PCR) se situent entre 0.40 et 0.50.

Ces données sont conformes aux performances annoncées par le fournisseur.

PRATICABILITE

- Le conditionnement des kits et les notices d'utilisation permettent une manipulation facile et une traçabilité des analyses.
- La durée des différentes phases est compatible avec un délai de rendu des résultats court (<24H).
- Les logiciels associés à la plateforme GeneExtract® et à l'appareil de PCR en temps réel GeneDisc Cyclor® permettent une traçabilité complète.

CONCLUSION GENERALE

Les performances de la méthode GeneSystems *Legionella pneumophila* sont conformes aux exigences de la norme XP T90-471.

Il est souhaitable d'adresser à AFNOR Certification
toute réclamation concernant les performances de la méthode validée

Vous trouverez le document de synthèse des études préliminaire et interlaboratoire
sur le site www.afnor-validation.org