



Application à l'analyse microbiologique de l'eau

**Protocole de Validation
pour les méthodes commerciales de détection et de
dénombrement de *Legionella* et *Legionella pneumophila*
par concentration et amplification génique
par réaction en chaîne de polymérisation (PCR)**

Révision 1 – Adoptée par AFNOR Certification le 25.01.2011
(suite à l'approbation du Bureau technique)

AFNOR Certification

Siège : 11, rue Francis de Pressensé – 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France
Tél +33 (0)1 41 62 80 00 – Fax +33 (0)1 49 17 90 00
www.afnor-validation.org - www.afnor.org

Sommaire

Domaine d’application	3
Principe	3
Phase 1 de l’étude (réalisée par le laboratoire expert).....	4
1. Raccordement de la solution calibrante et du matériau de référence à l’étalon primaire.....	4
2. Etude de la fonction de calibrage de l’étape PCR quantitative	4
Protocole d’évaluation de la droite de calibrage	4
Analyse des résultats.....	5
3. LD, LQ	9
Limite de détection de la PCR	9
Limite de quantification de la PCR.....	9
4. Rendement de la méthode et robustesse	11
Phase 2 de l’étude (réalisée par le laboratoire expert).....	15
Inclusivité et exclusivité des sondes et amorces	15
Inclusivité	15
Exclusivité.....	15
Praticabilité.....	16
Phase 3 de l’étude : étude interlaboratoire	18
Organisation de la campagne d’essais	18
Calendrier prévisionnel	19
Exploitation statistique des données.....	19

Domaine d'application

Les méthodes auxquelles s'appliquent ce document sont des **méthodes commerciales** (également appelées « kits »).

La certification a pour objet de démontrer que les performances de ces méthodes sont conformes à des exigences normatives.

La validation d'une méthode commerciale porte simultanément sur le mode opératoire préconisé par le fabricant, sur les produits d'essais et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la méthode, et sur un domaine d'application précisé.

Principe

L'étude de validation est basée sur les critères, plans d'expérience et modes de calculs définis dans la norme NF T90-471, dont les références des paragraphes sont repris ci-après, avec quelques ajustements et compléments.

L'étude comporte 3 phases, qui sont décrites dans le document ci-après. En fonction de la composition du kit à valider, le protocole de l'étude inclura ou non toutes les phases.

Si le kit PCR à valider **est complet**, c'est à dire qu'il comprend la partie extraction-purification, l'étude de validation portera sur les critères suivants :

Phase 1 : LD et LQ, fonction de calibrage, raccordement, rendement et robustesse

Phase 2 : inclusivité/exclusivité, praticabilité/qualité des réactifs

Phase 3 : étude interlaboratoire avec des essais sur solution d'ADN et échantillons d'eau artificiellement/naturellement contaminés

Si le kit PCR à valider **ne comprend pas la partie extraction – purification**, l'étude de validation portera sur les critères suivants :

Phase 1 : LD, LQ, fonction de calibrage, raccordement.

Phase 2 (inchangée) : inclusivité/exclusivité, praticabilité/qualité des réactifs

Phase 3 : étude interlaboratoire avec des essais uniquement sur solution d'ADN (pas d'échantillons dopés avec les bactéries)

Si le kit PCR à valider **est indépendant du thermocycleur** utilisé:

le fournisseur devra fixer la liste des thermocycleurs du marché qualifiés pour l'utilisation l'étude de validation devra comprendre autant d'essais sur LD, LQ, raccordement et fonction de calibrage (en phase 1 de l'étude) que de thermocycleurs qualifiés.

Phase 1 de l'étude (réalisée par le laboratoire expert)

1. Raccordement de la solution calibrante et du matériau de référence à l'étalon primaire

Suivre les instructions décrites dans le chapitre 11.2 de la norme NF T90-471.

Le raccordement sera réalisé sur un lot.

Attention : dans le tableau 7 de la norme (exemple de raccordement de la solution calibrante à l'étalon primaire), une erreur s'est glissée à l'avant-dernière ligne, dans la valeur absolue de l'erreur de calibrage : lire $\log(25\ 000)$ au lieu de $\log(2\ 500)$. Egalement, la ligne relative au $\log(250\ 000)$ est à retirer de la gamme de référence.

2. Etude de la fonction de calibrage de l'étape PCR quantitative

Protocole d'évaluation de la droite de calibrage

Cf. § 10.3.3 de la norme NF T90-471.

Le plan d'expérience suivant doit être réalisé dans des conditions de reproductibilité intermédiaire.

Préparer une gamme de p niveaux. p est le nombre préconisé par le fournisseur, au moins égal à 4, au plus à 6, par exemple, à 25, 250, 2 500, 25 000 unités génomes de *Legionella pneumophila* par tube réactionnel. La gamme est préparée à partir d'ADN d'une souche *Legionella pneumophila* ATCC 33152 OU CIP 103854T.

Le premier point de la gamme doit être égal à la limite de quantification (voir 10.4 de la norme NF T90-471). A chaque niveau, faire la mesure sur un nombre total de k gammes, k étant au moins égal à 5.

Enregistrer les valeurs $y_{i,j}$ obtenues et effectuer les calculs suivant l'exemple donné dans le tableau 3 de la norme, repris ci-après.

Calculer le nombre total de mesures noté N selon l'équation (1) :

$$N = k \times p$$

Tableau 1 (NF T90-471) — Mise en forme des résultats et calculs

Niveau x_i	$x_1 = LQ_{PCR}$	$x_2 = 10LQ_{PCR}$	$x_3 = 100LQ_{PCR}$	$x_4 = 1000LQ_{PCR}$	x_p	Sommes
$x'_i = \log_{10} x_i$	x'_1	x'_2	x'_3	x'_4	x'_p	
$y_{i,j}$ (k répétitions)	$y_{1,1}$	$y_{2,1}$	$y_{3,1}$	$y_{4,1}$	$y_{p,1}$	
	$y_{1,2}$	$y_{2,2}$	$y_{3,2}$	$y_{4,2}$	$y_{p,2}$	
	$y_{1,k}$	$y_{2,k}$	$y_{3,k}$	$y_{4,k}$	$y_{p,k}$	
$T_i = \sum_{j=1}^k y_{i,j}$	T_1	T_2	T_3	T_4	T_p	$T_G = \sum_{i=1}^p T_i$
$m_i = \frac{T_i}{k}$	m_1	m_2	m_3	m_4	m_p	
$x'_i T_i$	$x'_1 T_1$	$x'_2 T_2$	$x'_3 T_3$	$x'_4 T_4$	$x'_p T_p$	$\sum_{i=1}^p x'_i T_i$

Où

x_i est le nombre d'unités génome de *Legionella pneumophila* par tube réactionnel (les valeurs des niveaux x_i sont données à titre d'exemple) ;

x'_i est le logarithme décimal de x_i

$y_{i,j}$ est la valeur de CT mesurée au niveau i (i varie de 1 à p) et de rang j (j varie de 1 à k)

k est le nombre de répétitions par niveau i ($k \geq 5$)

p est le nombre de niveaux et est supérieur ou égal à 4

Voir en Annexe C de la norme un exemple complet des calculs.

Analyse des résultats

Estimation de la droite de régression (§10.3.4.1 de la norme)

La droite de régression est donnée par l'équation (2):

$$y = CT_{moyen} = ax' + b$$

Tracer sur un graphique les points de coordonnées $(x'_1, m_1), \dots, (x'_p, m_p)$ pour vérifier visuellement leur alignement le long d'une droite. Si cet examen se révèle positif, procéder aux calculs suivants :

$$\sum_{i=1}^p x'_i = k(x'_1 + x'_2 + x'_3 + x'_4 + \dots + x'_p)$$

(3)

$$\sum_{i=1}^p x_i'^2 = k(x_1'^2 + x_2'^2 + x_3'^2 + x_4'^2 + \dots + x_p'^2)$$

(4)

Procéder aux calculs suivants en vue de déterminer la pente a :

$$\text{Variance de } x_i' = \frac{\sum x_i'^2 - \frac{(\sum x_i')^2}{N}}{N-1}$$

(5)

$$\text{Covariance de } x'y = \frac{\sum x_i' T_i - \frac{\sum x_i' \times T_G}{N}}{N-1}$$

(6)

L'estimation de la pente de la droite a est donnée par l'équation (7) :

$$a = \frac{\text{covariancedex'y}}{\text{variancedex'}}$$

Procéder aux calculs suivants en vue de déterminer l'ordonnée à l'origine b :

La droite passe par le point moyen d'abscisse $\bar{x}' = \frac{\sum x_i'}{N}$ et d'ordonnée $\bar{y} = \frac{T_G}{N}$

d'où $\bar{y} = a\bar{x}' + b$ et donc $b = \bar{y} - a\bar{x}' = \frac{T_G}{N} - a \frac{\sum x_i'}{N}$

Vérification de l'efficacité (§ 10.3.4.2 de la norme)

L'efficacité évalue le bon déroulement de l'amplification.

Calculer l'efficacité e selon l'équation (8), (voir également l'Annexe C.3 de la norme) :

$$e = (10^{\frac{1}{a}} - 1) \times 100$$

La pente a doit être comprise entre $-4,115$ et $-2,839$, afin que e soit compris entre 75 % et 125 %.

Si a est extérieur à la fourchette indiquée ci-dessus, le système d'amplification ne peut être validé.

NOTE L'efficacité évalue le rendement de la réaction PCR.

Vérification des performances de la régression linéaire (§ 10.3.4.3 de la norme)

La régression linéaire doit satisfaire à l'exigence d'exactitude suivante sur chacun des niveaux de la gamme (critère cumulant le biais et la fidélité) :

$$E_{LIN} \leq 0,15 \quad (9)$$

où

E_{LIN} (exprimé en Log) est l'exactitude de linéarité.

Pour ce faire, procéder aux calculs indiqués dans le tableau 4 de la norme (voir également l'Annexe C.4 de la norme).

Si $E_{LINi} \leq 0,15$ quel que soit le niveau i , alors la linéarité est vérifiée pour tout le domaine.

Si une des valeurs E_{LINi} est supérieure à la valeur critique de 0,15, alors le modèle de régression linéaire ne peut être accepté. Dans ce cas, si le nombre de niveaux testés est supérieur à 4, il est possible de refaire l'analyse des données en retirant soit la valeur du niveau bas (x_1) soit celle du niveau haut (x_p) afin de valider, le cas échéant une partie du domaine linéaire.

Tableau 2 (NF T90-471)— Calculs des biais, exactitudes de linéarité et incertitudes de linéarité

Niveau x_i estimé	x_1	x_2	x_3	x_4	x_p
x'_i théorique	x'_1	x'_2	x'_3	x'_4	x'_p
$x'_{i,j}$	$x'_{1,1}$	$x'_{2,1}$	$x'_{3,1}$	$x'_{4,1}$	$x'_{p,1}$
	$x'_{1,2}$	$x'_{2,2}$	$x'_{3,2}$	$x'_{4,2}$	$x'_{p,2}$
	$x'_{1,3}$	$x'_{2,3}$	$x'_{3,3}$	$x'_{4,3}$	$x'_{p,3}$
	$x'_{1,4}$	$x'_{2,4}$	$x'_{3,4}$	$x'_{4,4}$	$x'_{p,4}$
	$x'_{1,k}$	$x'_{2,k}$	$x'_{3,k}$	$x'_{4,k}$	$x'_{p,k}$
$\overline{x'_i} = \frac{\sum x'_{i,j}}{k}$	$\overline{x'_1}$	$\overline{x'_2}$	$\overline{x'_3}$	$\overline{x'_4}$	$\overline{x'_p}$
$Biais = \overline{x'_i} - x'_i$	$\overline{x'_1} - x'_1$	$\overline{x'_2} - x'_2$	$\overline{x'_3} - x'_3$	$\overline{x'_4} - x'_4$	$\overline{x'_p} - x'_p$
$s'_i = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^k x'^2_{i,j} - \frac{\left(\sum_{j=1}^k x'_{i,j}\right)^2}{k}}{k-1}}$	s'_1	s'_2	s'_3	s'_4	s'_p
$E_{LINi} = \sqrt{s'^2_i + (\overline{x'_i} - x'_i)^2}$	E_{LIN1}	E_{LIN2}	E_{LIN3}	E_{LIN4}	E_{LINp}
$U_{LINi} = E_{LINi} \times t_{k-2}$	U_{LIN1}	U_{LIN2}	U_{LIN3}	U_{LIN4}	U_{LINp}
où x'_i théorique est la valeur déterminée à partir de l'équation $x'_i = \log x_i$; $x'_{i,j}$ est la valeur calculée en utilisant l'équation de la droite d'étalonnage à partir de la valeur $y_{i,j}$ mesurée ; $\overline{x'_i}$ est la valeur moyenne des $x'_{i,j}$; s'_i est l'écart-type des valeurs $x'_{i,j}$ avec $k - 1$ degrés de liberté ; E_{LINi} est l'exactitude de linéarité ; U_{LINi} est l'incertitude de linéarité élargie ; t_{k-2} est la valeur lue dans la table de Student pour $k - 2$ degrés de liberté au risque 5 % (voir Annexe D).					

NOTE L'examen des valeurs de biais et d'écart type permet de savoir si le défaut de modèle est dû à un problème de fidélité (dispersion trop élevée) ou de justesse (biais trop élevé).

3. LD, LQ

Les modifications suivantes sont proposées dans le plan d'expérience par rapport à la norme :

- réaliser 30 solutions d'ADN indépendantes
- Les valeurs de LD et LQ à vérifier sont celles annoncées par le fournisseur

Les matériaux utilisés seront tels que décrits dans la notice du fournisseur.

Limite de détection de la PCR

(Cf. §10.5 de la norme NF T90-471)

L'estimation de la limite de détection PCR notée LD_{pqr} consiste à connaître le plus petit nombre d'unités génome générant un résultat positif (une amplification) au seuil de confiance de 90%, selon le mode opératoire du laboratoire.

Plan d'expérience :

- Utiliser la LD_{pqr} annoncée et la vérifier (exemple : $LD_{pqr} = 5$ copies dans le puits) ;
- Réaliser 30 mesures selon le protocole du fournisseur (nombre de réplicats utilisé en routine), à partir de 30 dilutions indépendantes préparées à partir d'une solution d'ADN de *Legionella pneumophila* raccordée à l'étalon primaire. Ces 30 mesures peuvent être réalisées par le laboratoire expert dans le même run.

Vérification de la LD_{pqr} : au minimum 90 % des solutions doivent être positives.

Limite de quantification de la PCR

(Cf. §10.4 de la norme NF T90-471)

LQ_{PCR} est la limite de quantification de l'étape PCR et $LQ_{méth}$ est la limite de quantification de la méthode complète.

La limite de quantification LQ_{PCR} , incompressible compte tenu de la dispersion d'échantillonnage (loi de Poisson) est de 25 unités génomes dénombrés sur la totalité des essais PCR réalisés sur l'échantillon. La valeur de 25 est adoptée au regard de l'intervalle de confiance à 95% qui fournit une limite basse à 17 et une limite haute à 37. Cette dispersion est jugée acceptable.

Ainsi, La valeur de LQ_{PCR} visée ne peut être inférieure à 25 UG en simplicat, 15 UG en duplicat et 10 UG en triplicat.

La limite de quantification doit correspondre au premier niveau de la gamme de calibrage.

La LQ_{PCR} annoncée par le fournisseur doit être vérifiée. 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

Plan d'expérience

Préparer $k = 30$ dilutions indépendantes à la valeur LQ_{PCR} visée, à partir d'une solution d'ADN de *Legionella pneumophila* raccordée à l'étalon primaire.

Quantifier chacune de ces dilutions selon le protocole habituel du laboratoire (en simplicat ou duplicat ou triplicat) dans des conditions de reproductibilité intermédiaire (à minima jours différents et/ou opérateurs différents).

L'écart-type s est donné par la formule (10) :

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^k x_i'^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^k x_i'\right)^2}{k}}{k-1}}$$

où

x'_i est la valeur calculée par calibrage inverse du \log_{10} du nombre d'unités génome de *Legionella pneumophila*

k est le nombre de répétitions de mesures

Le biais est donné par la formule :

$$\text{Biais} = \overline{x'_i} - \log(x) \quad (11)$$

où

x est la valeur théorique de LQ_{PCR} visée.

Calculer l'exactitude au niveau de la limite de quantification, notée E_{LQ} selon la formule suivante :

$$E_{LQ} = \sqrt{s^2 + \left(\overline{x'_i} - \log(x)\right)^2} \quad (12)$$

où

S est l'écart type des valeurs x'_i obtenues à partir des k mesures ;

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

Limite de quantification théorique de la méthode

(Cf. 10.4.4 de la norme NF T90-471)

(chapitre non applicable dans le cas où seule l'étape de quantification est testée)

La **LQ théorique** de la méthode ou $LQ_{méth}$ (exprimée en unités génome par litre) est obtenue à l'aide de l'équation (13) de la façon suivante :

$$LQ_{méth} = \frac{LQ_{PCR} \times F}{V} \quad (13)$$

où :

V est le volume d'échantillon filtré (exprimé en litres) ;

F est le facteur multiplicatif (des unités génome par puits aux unités génome par litre) ;

4. Rendement de la méthode et robustesse

(Cf. §10.6 et 10.7 de la norme NF T90-471)

Plan d'expérience :

L'étude du rendement est effectuée sur 10 échantillons indépendants, ceci pour trois matrices différentes, à deux niveaux de contamination, soient $10 \times 3 \times 2 = 60$ échantillons.

Les trois types de matrices sont les suivantes :

1. une eau minérale témoin,
2. une eau chaude sanitaire,
3. une eau de TAR.

Elles devront être exemptes d'acides nucléiques de *Legionella* et artificiellement contaminées par une suspension mère constituée à partir d'une souche de *L. pneumophila* (souche ATCC33152 ou CIP 103854T).

Il faut que ces matrices soient au préalable bien caractérisées (caractères physico-chimiques tels que pH, absence de biocides, filtrabilité...) par le laboratoire expert lors de l'étude.

Deux niveaux de contamination correspondant par exemple à 1 000, et 100 000 unités génome par litre doivent être testés. Les niveaux de contamination peuvent provenir de la même suspension mère de dopage.

Pour chaque niveau de concentration et pour chaque matrice, au moins 10 échantillons (2 réplicats par jour x 5 jours) dopés indépendants, d'un volume compris entre 100 ml et 1 l, doivent être analysés dans des conditions de reproductibilité intra-laboratoire (jours différents et/ou opérateurs différents ...).

Pour un essai à un niveau de contamination, il est nécessaire de constituer une suspension de dopage à partir de colonies isolées de la souche ATCC 33152 ou CIP 103854T sur gélose BCYE-L-Cystéine ou GVPC

La suspension bactérienne doit être faite à partir d'une culture fraîche (3 jours de culture à 37°C)

La procédure de contamination artificielle doit permettre la mesure du nombre d'unités génome avant les étapes de concentration et d'extraction des acides nucléiques. Cette mesure doit être effectuée par PCR sur une lyse directe de la suspension mère de dopage sur 3 prises d'essai distinctes. Cette lyse doit être effectuée selon le protocole de lyse habituel sans purification.

La valeur moyenne (notée en UG/L) calculée à partir des 3 valeurs servira de référence pour le calcul de rendement pour chaque niveau de contamination. Cette valeur servira à déterminer le volume du dopage qui permettra d'obtenir le niveau souhaité (1 000 ou 100 000 ug/l par exemple).

Si le laboratoire expert possède un spectrophotomètre, il peut estimer la concentration de la suspension mère de dopage par mesure d'absorbance à 600 nm. Dans ces conditions, le volume de dopage pourrait être estimé avant d'effectuer la lyse directe. La lyse directe et les extractions pourraient ainsi être réalisées en même temps et passées sur la même plaque PCR. Toutefois les niveaux de dopages demandés devront être respectés et seule la valeur PCR pourra le démontrer.

Exemple de la procédure à suivre pour le jour 1 (à répéter pour les jours 2 à 5):

jour 1 préparer une suspension mère

titrer la suspension mère par 3 lyses directes
et 3 quantifications, faire la moyenne pour réaliser
les dilutions de suspension de dopage

diluer la suspension de manière à obtenir 2 niveaux
de charge correspondant à 100 000 et 1 000 UG/l

préparer 4 flacons par matrice de 250 ml

Contaminer 2 flacons avec 100 µL de suspension
de dopage pour obtenir 100 000 UG/l

Contaminer 2 flacons avec 100 µL de suspension de
dopage pour obtenir 1 000 UG/l

Réaliser les extractions sur les 4x3 flacons dopés
+ 3 blancs de matrice (un par matrice)

Réaliser les quantifications après congélation le jour choisi

Répéter l'expérience 5 jours différents consécutifs ou non (ou autres conditions de reproductibilité intra-laboratoire)

Ceci conduit à 60 extraits issus d'un dopage ainsi que 15 blancs qui doivent être négatifs

Effectuer la mesure de la concentration en nombre d'unités génome de la suspension mère par PCR sur trois lyses directes de la suspension mère. Ces lyses doivent être effectuées selon le protocole de lyse habituel sans purification.

Ceci doit être réalisé dans les
trois matrices

L'extrait ADN ainsi obtenu doit être dilué de manière à lever l'inhibition due au réactif de lyse. La valeur moyenne calculée à partir des 3 valeurs (notée *A* et exprimée en log₁₀ d'UG/ml) sert de référence pour le calcul de rendement.

Déterminer à partir de cette valeur le volume du dopage qui permet d'obtenir le niveau souhaité (1 000 UG/l et 100 000 UG/l par exemple).

Les échantillons ainsi constitués (3 solutions dopées) suivent le protocole de mesure complet et conduisent à des résultats exprimés en log₁₀ d'UG par unité de volume de la suspension mère, notée *B*.

La quantification de la solution de dopage, le protocole de dopage et de mesure doivent être réalisés successivement et le même jour.

Calcul du rendement :

Le calcul du rendement sera effectué par différence de log. (exemple : si le dopage a été effectué avec 1 000 UG soit log₁₀(1 000) = 3 et que le résultat final est 500 UG, soit log₁₀(500) = 2,7 le rendement est égal à 2,7-3 = -0,3) La différence de log₁₀ (rendement) doit être comprise entre 0,6 et 0,3 ce qui correspond à un rendement compris entre 25 % et 199 %.

Le chapitre 10.6.3 de la norme NF T90-471 donne la formule suivante (14) :

$$\log_{10}(\text{Re } nd_{\text{Echantillon } x}) = B - A + D + \log \frac{1000}{v_{pe}}$$

où

$\log_{10}(\text{Re } nd_{\text{Echantillon } x})$ est le logarithme décimal du rendement de l'échantillon *x*;

A est le log₁₀ de la quantité d'UG par unité de volume de la suspension-mère, valeur de référence obtenue directement après la lyse directe ;

v_{pe} est le volume de la suspension de dopage inoculé, en microlitre ;

B est le log₁₀ de la quantité d'UG par unité de volume de la suspension-mère, mesurée à partir de l'échantillon dopé ayant suivi la méthode dans son intégralité ;

D est le log du facteur de dilution entre la suspension mère et la suspension de dopage, par exemple *D* vaut 3 pour une dilution au 1/1000^{ème}.

Jour 1					
résultats lyse directe sur suspension mère en UG /100µl = suspension 1					
25000	24000	26000	moyenne :	25000	UG/100µl
dilution de la suspension mère par 10 (1 ml + 9 ml eau stérile) = suspension 2					
Déduit par calcul de la valeur de la concentration de la susp1			valeur :	2500	UG/100µl
dilution de la suspension 2 par 10 (1 ml + 9 ml eau stérile) = suspension 3					
Déduit par calcul de la valeur de concentration de la susp1			valeur :	250	UG/100µl
Résultats de quantification en UG/L					
	ajout de 100 µL de dopage par flacon contenant 250 ml de matrice	Matrice 1	Matrice 2	Matrice 3	
niveau 1=100000 UG/l		suspension 1	80000	75000	88000
		suspension 1	76000	67000	67000
niveau 2=1000 UG/l		suspension 3	560	670	230
		suspension 3	800	600	670
Résultats de rendement en pourcentage					
moyenne niveau 1	75,5	80	75	88	
		76	67	67	
moyenne niveau 2	58,83	56	67	23	
		80	60	67	
		Moyenne matrice 1	Moyenne matrice 2	Moyenne matrice 3	
		73	67,25	61,25	

Le rendement moyen et les écarts-types associés doivent être calculés pour chaque niveau et chaque matrice.

Selon la norme NF T 90-471, la différence de \log_{10} (rendement) doit être comprise entre 0,6 et 0,3 ce qui correspond à un rendement compris entre 25 % et 199 %.

Phase 2 de l'étude (réalisée par le laboratoire expert)

Inclusivité et exclusivité des sondes et amorces

Inclusivité

(Cf. NF T90-471 - § 10.2)

Les amorces et sondes utilisées doivent donner les résultats attendus pour les espèces et sérogroupes suivants qui ont tous été isolés chez l'homme.

Réaliser les essais d'inclusivité sur des extraits d'ADN de façon à obtenir environ 100 unités génomes par puits.

- Liste d'inclusivité (micro-organismes testés reconnus comme appartenant au **genre *Legionella***) :

<i>L. anisa</i>	<i>L. erythra</i> 2	<i>L. longbeachae</i> 1-2	<i>L. sainthelensi</i> 1-2
<i>L. birminghamsis</i>	<i>L. feeleeii</i> 1-2	<i>L. maceachernii</i>	<i>L. tucsonensis</i>
<i>L. bozemanii</i> 1-2	<i>L. gormanii</i>	<i>L. micdadei</i>	<i>L. wadsworthii</i>
<i>L. cherrii</i>	<i>L. hackeliae</i> 1-2	<i>L. oackridgensis</i>	
<i>L. cincinnatiensis</i>	<i>L. jordanis</i>	<i>L. parisiensis</i>	
<i>L. dumofii</i>	<i>L. lansingensis</i>	<i>L. pneumophila</i> 1 à 15	

- Liste d'inclusivité (micro-organismes testés reconnus comme appartenant à **l'espèce *L. pneumophila***) : quinze sérogroupes de l'espèce.

Exclusivité

Réaliser les essais d'exclusivité sur des extraits d'ADN de façon à obtenir au minimum 10 000 unités génomes par puits.

- Liste d'exclusivité (micro-organismes testés reconnus comme n'appartenant **pas au genre *Legionella* et à l'espèce *L. pneumophila***.) Ces souches doivent préférentiellement être retrouvées dans les mêmes niches écologiques que les *Legionella* et/ou être phylogénétiquement proche. Au minimum, la liste suivante doit être testée :

<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>		

- Liste d'exclusivité (micro-organismes testés reconnus comme n'appartenant **pas à l'espèce *L. pneumophila***.) En plus des souches listées ci-dessus, ajouter les 9 souches suivantes :

<i>L. micdadei</i> ATCC 33218	<i>L. bozemanii</i> S2 ATCC 33545	<i>L. jordanis</i> CIP 105268
<i>L. dunmofii</i> ATCC 33279	<i>L. gormanii</i> ATCC 33297	<i>L. parisiensis</i> CIP 103847
<i>L. anisa</i> CIP 103870	<i>L. longbeachae</i> S1 CIP 103880	<i>L. tucsonensis</i> CIP 105113

Praticabilité

Une étude de praticabilité comportant 18 critères, sera réalisée.

Pour chacun de ces critères a été défini le mode de communication de ce critère auprès de l'utilisateur et le mode de contrôle de ce critère par le laboratoire expert. En effet certains critères nécessitent une communication sur l'emballage ou la notice alors que d'autres nécessitent une communication sur l'attestation de validation.

	Critères à contrôler	Communication sur le critère	Méthode de contrôle du critère
1	Mode de conditionnement des éléments de la méthode	emballage ou notice	vérification par le laboratoire expert
2	Volume des réactifs	emballage ou notice	vérification par le laboratoire expert
3	Conditions de stockage des éléments (+ péremption des produits non ouverts)	emballage ou notice	vérification par le laboratoire expert que les conditions existent
4	Modalités d'utilisation après première utilisation. (en particulier existence de dates limites)	emballage ou notice	vérification par le laboratoire expert que les modalités existent
5	Equipements ou locaux spécifiques nécessaires	notice	vérification par le laboratoire expert de la véracité des écrits
6	Réactifs prêts à l'emploi ou à reconstituer (dans ce cas existence d'un mode opératoire)	emballage ou notice	vérification par le laboratoire expert de la véracité des écrits
7	Durée de formation de l'opérateur non initié à la méthode	rapport	mesurée par le laboratoire expert (possibilité de se servir des durées mises en oeuvre par les laboratoires collaborateurs) et réparti dans une des 3 catégories suivantes: moins de 1 jour, entre 1 jour et une semaine, plus d'une semaine.

8	Temps réel de manipulation / Flexibilité de la technique par rapport au nombre d'échantillons à analyser, leur charge en bactéries ...	rapport	temps de manipulation mesuré
9	Délai d'obtention des résultats	rapport et attestation	établissement de 2 cycles décrivant chaque étape de la méthode uniquement en terme de temps:
10	Type de qualification de l'opérateur	rapport	précisé par le laboratoire expert (le laboratoire expert peut se servir des données des laboratoires collaborateurs)
11	S'il y en a une, traçabilité des résultats d'analyse	notice	vérification par le laboratoire expert
12	Maintenance par le laboratoire	rapport	durée et fréquence
13	Volume minimal à pipeter	rapport	A renseigner par le laboratoire expert
14	Stabilité des réactifs et des gammes	rapport	A renseigner par le laboratoire expert : <ul style="list-style-type: none"> • Réactif • Conditions de stockage • Durée de validité • Aliquotage
15	UNG (prévention des contaminations)	rapport	A renseigner par le laboratoire expert
16	Protection des réactifs aux UV	rapport	A renseigner par le laboratoire expert
17	Contrôle externe quantitatif de la PCR	rapport	Présence à vérifier par le laboratoire expert
18	Contrôle d'absence d'inhibiteur	rapport	Vérification par le laboratoire expert de l'absence d'inhibiteur par contrôle interne ou ajout dosé

Phase 3 de l'étude : étude interlaboratoire

L'étude interlaboratoire est destinée à évaluer la fidélité d'un kit commercial.

Organisation de la campagne d'essais

Elle est prévue en 3 phases. Un minimum de 10 laboratoires participants est conseillé afin de garantir au moins 8 résultats interprétables.

Phase 1 : EXTRAITS D'ADN

Deux extraits d'ADN de *Legionella* sont réalisés à partir des 10 espèces de *Legionella* de la liste suivante :

<i>L.micdadei</i>	ATCC 33218	<i>L.bozemanii</i> S2	ATCC 33545
<i>L.dunmofii</i>	ATCC 33279	<i>L.gormanii</i>	ATCC 33297
<i>L.anisa</i>	CIP 103870	<i>L.longbeachae</i> S1	CIP 103880
<i>L.jordanis</i>	CIP 105268	<i>L.tucsonensis</i>	CIP 105113
<i>L.parisiensis</i>	CIP 103847	<i>L.pneumophila</i> S1	ATCC 33152

Constitution de 2 échantillons, chacun à 2 concentrations différentes. Les mesures seront faites selon les prescriptions du fournisseur (*ex : 3 répliquats donnent 1 résultat*). Il faut réaliser 2 mesures de manière à obtenir 2 résultats pour chaque concentration.

L'objectif de l'essai ADN est de caractériser la répétabilité et la reproductibilité inter laboratoires des différents systèmes PCR (amorces/sonde), ainsi que la justesse. Son évaluation sera possible au travers de la moyenne des laboratoires vu qu'il n'y pas de valeur vraie ou conventionnelle disponible.

Phase 2 : SUSPENSIONS BACTERIENNES

A partir d'une suspension bactérienne de *Legionella pneumophila*, *Legionella spp* et non *Legionella*, les laboratoires doperont une matrice exempte d'ADN de *Legionella* commune à tous les participants, de manière à obtenir 2 niveaux de concentration et 2 répétitions par niveau.

L'objectif de cet essai est d'estimer la répétabilité et la reproductibilité des méthodes globales.

Phase 3 : ECHANTILLON NATURELLEMENT CONTAMINE

Homogénéisation d'une matrice eau chaude sanitaire filtrable, naturellement contaminée en *Legionella (spp et pneumophila)*, avec une flore associée caractérisée et abondante.

Cette matrice ne doit pas poser de problème majeur lié à l'inhibition.

Cf. annexe A1 pour le protocole de test d'homogénéité et de stabilité.

Plan d'expérience de l'essai : chaque laboratoire participant recevra 2 flacons pour effectuer 2 mesures en condition de répétabilité.

Calendrier prévisionnel

Un calendrier sera élaboré en concertation avec les différents laboratoires sélectionnés.
Le premier envoi sera constitué des échantillons des phases 1 et 2
Le second sera constitué des échantillons de la phase 3.

Les envois seront réalisés par le laboratoire expert

Exploitation statistique des données

Cette étude a pour objectif de savoir si le kit à valider est fiable. Elle vise à effectuer les premières évaluations de l'exactitude de mesure, terme pris au sens de la norme ISO 5725 : « étroitesse de l'accord entre les résultats de mesures et la valeur de référence acceptée ».

En l'absence de matériaux de référence certifiés pour le dénombrement des légionelles par PCR (pas de « valeur de référence acceptée »), on prend comme cible la valeur de consensus se dégageant de l'ensemble des valeurs observées; en pratique la moyenne des résultats dans le cadre d'une distribution Normale des données.

C'est pourquoi dans la suite on ne parle plus d'exactitude, mais de fidélité; au sens de la norme ISO 5725 : étroitesse de l'accord de mesures répétées indépendantes.

Les essais proposés consistent donc à réaliser des plans d'expériences destinés à quantifier la fidélité de la méthode; ceci dans une situation de difficulté croissante :

- calcul de la fidélité uniquement liée à l'aliquotage prévu par la méthode (= approche purement théorique basée sur la loi de Poisson, qui permettra d'établir la dispersion incompressible des données à laquelle il faut au moins s'attendre);
- mesure de la fidélité sur une partie de la méthode, le système PCR (amorces / sonde); ceci sur des extraits d'ADN (d'abord extraits purs de *L. pneumophila*, puis mélange d'extraits de différentes *Legionella*);
- mesure de la fidélité de la totalité de la méthode sur des suspensions bactériennes caractérisées (suspensions pures de *L. pneumophila*, puis mélange de suspensions pures de diverses *Legionella* et d'interférents);
- mesure de la fidélité en situation réelle (eaux chaude sanitaire naturellement contaminée, choisie autant que possible pour sa représentativité).

Exprimer les résultats selon la norme ISO 5725.

ANNEXE A

Annexe A1 : protocole de test d'homogénéité

Un essai d'homogénéité devra être effectué par le laboratoire expert.

Ex : pour 10 laboratoires participants, le laboratoire expert constituera 30 flacons, chaque laboratoire participant recevra 2 flacons et le laboratoire expert fera 3 mesures sur 3 flacons différents pendant 3 jours consécutifs pour évaluer l'homogénéité et la stabilité.

Pour la phase 1, l'homogénéité des essais ADN sera évaluée par une mesure en PCR quantitative sur le système spp de 20 aliquotes.

Pour les phases 2 et 3, l'homogénéité et la stabilité des essais suspension seront évaluées par une extraction d'ADN et une mesure en PCR quantitative sur le système spp de 9 aliquotes.

Annexe A2 : protocole d'envoi des échantillons

La laboratoire expert (organisateur) prépare les matériaux le lundi (1^{er} jour d'une semaine de 5 jours ouvrés) et les stocke à une température de $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Ces matériaux sont enlevés par transporteur spécialisé le mardi matin. Le transporteur doit garantir une température de $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$, maîtrisée et tracée pendant le transport.

La livraison doit avoir lieu avant le mercredi midi pour tous les laboratoires participants.

A réception, les laboratoires participants devront renvoyer au laboratoire expert un accusé de réception qui mentionnera au minimum : la date et l'heure de réception, l'état des matériaux reçus, la température de l'enceinte et la température enregistrée pendant le transport.

Les laboratoires participants devront immédiatement stocker les matériaux reçus à une température de $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Les préparations et les mesures seront démarrées le jeudi matin de manière à être terminées le jeudi soir. L'interprétation et le renvoi des résultats sur le formulaire fourni devront être faits selon les indications du laboratoire expert.

Phase 1 : quatre tubes de 150µl de solution d'ADN sont envoyés par transporteur spécialisé à $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$. Les laboratoires seront prévenus quelques jours à l'avance de l'arrivée des échantillons par mail. Les consignes de réalisation des essais et les formulaires de réponse sont envoyés par mail.

Phase 2 : quatre flacons de 250 ml d'échantillon artificiellement contaminé sont envoyés par transporteur spécialisé à $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$. Les laboratoires seront prévenus quelques jours à l'avance de l'arrivée des échantillons par mail. Les consignes de réalisation des essais et les formulaires de réponse sont envoyés par mail.

Phase 3 : Acheminement de 2 flacons de 250 ml d'échantillon ECS en colis isotherme à température dirigée ($5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$)

ANNEXE A3 : formulaire de consigne pour la réalisation des essais/fichiers de réponse

Un formulaire décrivant toutes les étapes nécessaires pour la réalisation des essais est envoyé par mail avant l'arrivée des essais. Il mentionnera les volumes des essais, les réplicats des échantillons à effectuer, la nature de la matrice exempte d'ADN de *Legionella* etc....

Fichier de résultat (Excel) pour un essai ADN : voir ci-dessous.

EIL ADN

date de réception	
température de stockage	
date d'aliquotage	

système spp

date de la PCR	
----------------	--

n = selon prescriptions du fournisseur	nb de copies/puits PCR		
	réplicat n	réplicat n	réplicat n
estimation de l'échantillon A1			
estimation de l'échantillon A2			
estimation de l'échantillon B1			
estimation de l'échantillon B2			

moyenne	
écart type	
CV %	
pente de la droite d'étalonnage	
ordonnée à l'origine de la droite d'étalonnage	

système pneumophila

date de la PCR	
----------------	--

	nb de copies/puits PCR		
	réplicat n	réplicat n	réplicat n
estimation de l'échantillon A1			
estimation de l'échantillon A2			
estimation de l'échantillon B1			
estimation de l'échantillon B2			

moyenne	
écart type	
CV %	
pente de la droite d'étalonnage	
ordonnée à l'origine de la droite d'étalonnage	

Fichier de résultat (Excel) pour un essai suspension : voir ci-dessous

EIL SUSPENSION

date de réception	
température de stockage de la suspension	
date d'extraction	
température de stockage des extraits ADN	

méthodologie

concentration des bactéries	
si filtration, nature de la membrane	
type d'extraction de l'ADN	
nature de la purification	
fraction de l'échantillon mis en plaque	

spp

date de passage en PCR			
	réplicat n	réplicat n	réplicat n
estimation de l'échantillon A1			
estimation de l'échantillon A2			
estimation de l'échantillon B1			
estimation de l'échantillon B2			

moyenne des échantillons	
écart type des échantillons	
CV (en %)	
pente de la droite d'étalonnage	
ordonnée à l'origine	

pneumophila

date de passage en PCR			
	réplicat 1	réplicat 2	réplicat 3
estimation de l'échantillon A1			
estimation de l'échantillon A2			
estimation de l'échantillon B1			
estimation de l'échantillon B2			

moyenne des échantillons	
écart type des échantillons	
CV (en %)	
pente de la droite d'étalonnage	
ordonnée à l'origine	