

Rapport

De Synthèse

Validation AFNOR de la méthode Genesystems pour la détection et la quantification de *Legionella pneumophila* dans le domaine des eaux

- Laboratoire Central CAE -

Méthode de référence : XP 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

PARTIE 1 : Validation AFNOR de la méthode Genesystems pour la détection et la quantification de *Legionella pneumophila* dans le domaine des eaux

1. OBJET DE L'ETUDE

- 1.1. Référentiel de validation
- 1.2. Principe de la méthode Genesystems

2. RESULTATS DE L'ETUDE PRELIMINAIRE

- 2.1. Rendement optimal de la méthode
- 2.2. Limite de détection de la PCR
- 2.3. Limite de quantification de la PCR
- 2.4. Linéarité de la quantification
- 2.5. Inclusivité et exclusivité
- 2.6. Praticabilité

3. ETUDE INTERLABORATOIRE

- 3.1. Objectif
- 3.2. Plan d'essai et analyses réalisées
 - 3.2.1. Plan d'essai
 - 3.2.2. Contrôle de la qualité des matériaux
- 3.3. Résultats
 - 3.3.1. Contrôle de la qualité des matériaux
 - 3.3.2. Répétabilité et Reproductibilité

4. CONCLUSION DE L'ETUDE DE VALIDATION

PARTIE 2 : Extension de la validation AFNOR de la méthode Genesystems pour la détection et la quantification de *Legionella pneumophila* dans le domaine des eaux

1. OBJET DE L'ETUDE

- 1.1. Référentiel de validation
- 1.2. Principe de la méthode Genesystems

2. RESULTATS DE L'ETUDE PRELIMINAIRE

- 2.1. Rendement optimal de la méthode
- 2.2. Limite de détection de la PCR
- 2.3. Limite de quantification de la PCR
- 2.4. Linéarité de la quantification
- 2.5. Inclusivité et exclusivité
- 2.6. Praticabilité

3. ETUDE INTERLABORATOIRE

4. CONCLUSION DE L'ETUDE POUR LA VALIDATION DE L'EXTENSION

PARTIE 1 : Validation AFNOR de la méthode Genesystems pour la détection et la quantification de *Legionella pneumophila* dans le domaine des eaux

1. OBJET DE L'ETUDE

L'étude présentée rentre dans le cadre de la validation par AFNOR de la méthode GeneSystems *Legionella pneumophila* pour la détection et la quantification de *Legionella pneumophila* par PCR dans le domaine des eaux.

Elle a été conduite selon le « protocole de validation pour les kits de détection et de dénombrement de *Legionella* et *L.pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction en chaîne de polymérisation (PCR) (Révision 0 adopté par AFNOR certification le 26.09.2006) ». Les modifications définies lors de la réunion du 07 septembre 2007 ont également été prises en compte pour cette étude.

Les phases 1 et 2 permettent l'étude par un laboratoire expert des performances annoncées par le fournisseur. En particulier sont examinés le rendement d'extraction, les limites de détection et quantification de l'étape PCR, la linéarité de la quantification, l'inclusivité et l'exclusivité de la détection et de la quantification, ainsi que la praticabilité. La phase 3 comprend une étude interlaboratoire pour évaluer par une analyse statistique des résultats obtenus, la fidélité (répétabilité et reproductibilité) de la méthode et du protocole du fournisseur.

1.1. REFERENTIEL DE VALIDATION

Le protocole AFNOR de validation est basé sur les critères, les plans d'expérience et les modes de calcul définis dans la norme XP T 90-471 (avril 2006) concernant le dénombrement de *Legionella* et *L.pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction en chaîne de polymérisation (PCR).

1.2. PRINCIPE DE LA METHODE GENESYSTEMS

La méthode GeneSystems *Legionella* répond aux exigences de la norme expérimentale AFNOR XP T90-471, « Détection et quantification de *Legionella* spp. et/ou *Legionella*

pneumophila par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) ».

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 une deuxième étape de quantification de l'ADN de *Legionella pneumophila* ou *Legionella* spp par PCR en temps réel avec l'instrument GeneDisc Cyclor[®].

L'échantillon d'eau est filtré sur membrane de polycarbonate 0,45 µm. Le filtre sur lequel les microorganismes présents dans l'eau ont été retenus est inséré dans un tube de lyse contenant un détergent. Le tube de lyse est ensuite incubé 20 min dans un bain à ultrasons puis 10 min dans un bain-marie à 100°C. Cette lyse mécanique et chimique permet de libérer l'ADN des légionelles. Le lysat est ensuite clarifié par filtration sur un tamis moléculaire (colonne Filter) puis purifié par adsorption sur un gel de silice (colonne de silice). Le protocole de purification de l'ADN est réalisé par filtration sous vide. L'ADN est élué de la colonne de silice dans un volume de 200 µL de tampon d'éluion et 37 µL sont utilisés pour réaliser l'analyse PCR avec le GeneDisc Cyclor.

Le GeneExtract[®] est une plate-forme semi-automatisée brevetée par GeneSystems. Il permet l'extraction et la purification de l'ADN de 5 échantillons d'eau et d'un contrôle négatif (eau stérile) de l'ensemble de la méthode. Il offre l'avantage de réunir, au sein d'une seule et unique plate-forme, l'ensemble des appareils nécessaires à l'extraction et à la purification d'ADN selon le protocole choisi : rampe de filtration de l'échantillon d'eau, rampe de sonotrodes et de bains-marie dédiés à la lyse cellulaire, rampe de filtration pour la purification de l'ADN sur colonne de silice. Ces différents secteurs sont pilotés par un logiciel intégré qui assure également une traçabilité totale des échantillons (identification et position des 6 échantillons, identification de l'opérateur, numéro de lot du pack d'extraction, date et heure de la manipulation). Les différentes étapes sont affichées sur l'écran tactile au fur et à mesure du protocole. L'opérateur est ainsi guidé et suit le degré d'avancement du processus.

Le GeneDisc est un consommable PCR prêt à l'emploi breveté par GeneSystems. Il est constitué de 36 chambres réactionnelles réparties en 6 secteurs d'analyse. Chaque secteur d'analyse (1 échantillon à analyser par secteur) est relié à 6 chambres réactionnelles *via* des microcanaux. Les 36 chambres réactionnelles du GeneDisc sont pré-chargées en réactifs par le service Production de GeneSystems : amorces, sondes, contrôles internes d'inhibition, témoins positifs croisés.

Le GeneDisc Cyclor[®] est un instrument de PCR Temps Réel breveté par GeneSystems. Il permet l'amplification et la quantification de l'ADN des légionelles au sein des GeneDiscs en moins d'une heure. Les mesures de fluorescence sont analysées automatiquement pour donner un résultat immédiat. Le GeneDisc Cyclor assure une traçabilité totale des échantillons et des analyses. La lecture du code barres des GeneDiscs sélectionne automatiquement le programme d'analyse. 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, est analysé. Le logiciel du GeneDisc Cycler 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 GeneDiscs d'un même lot, sur un GeneDisc Cycler donné, conformément à la définition de la série PCR selon la norme XP T90-471.

Pour chaque échantillon analysé, dans les mêmes conditions expérimentales que celles du GeneDisc 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.

La standardisation de l'analyse des résultats est effective grâce à l'analyse automatique réalisée par le logiciel intégrant les algorithmes et les droites d'étalonnage nécessaires. En fin de réaction, le logiciel d'analyse du GeneDisc Cycler rend directement un résultat en Unité Génome par litre (UG/L) correspondant au nombre de Légionelles par litre dans l'échantillon analysé en tenant compte du volume filtré et du facteur de dilution de l'ADN. Les courbes d'amplification et tous les paramètres de l'analyse sont visualisables et sont conservés en mémoire pour la traçabilité des analyses.

Le GeneExtract® et le GeneDisc Cycler® fonctionnent avec des consommables dédiés : un pack d'extraction d'ADN de *Legionella* (Legionella Extraction Pack 01) et des coffrets de GeneDiscs® (*Legionella* spp GeneDisc Pack Premium).

2. RESULTATS DE L'ETUDE PRELIMINAIRE

2.1. DETERMINATION DU RENDEMENT OPTIMAL

Le rendement a été évalué afin de vérifier la conformité de la méthode. Il a été évalué sur 6 échantillons indépendants, pour trois matrices différentes et pour trois niveaux de concentration différents. Au total, 54 échantillons ont été analysés.

Matrices testées : - eau chaude sanitaire prélevée au laboratoire *
- eau de TAR**
- eau minérale d'Evian*

* exempte d'acides nucléiques de *Legionella*

** exempte d'acides nucléiques de *Legionella pneumophila*

Niveaux de concentration évalués : 1000, 10 000 et 100 000 UG/250 ml.

Inoculum : culture de *L. pneumophila* (souche ATCC 33152 T)
 La suspension-mère de *L. pneumophila* a été titrée par lyse directe et dénombrement microscopique après marquage des cellules au DAPI.

Les analyses sont réalisées pendant 3 jours.

- Incertitudes liées à la lyse directe

	<i>Legionella spp.</i>		<i>L. pneumophila</i>		DAPI*
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne
Jour 1	8,02	0,138	7,96	0,084	8,28
Jour 2	8,80	0,104	8,40	0,161	8,81
Jour 3	8,54	0,473	8,57	0,299	8,96

* Le dénombrement après marquage par le DAPI est obtenu à partir de la moyenne du nombre de bactéries comptés sur 20 champs.

- Etude du rendement optimal de la méthode GeneSystems *Legionella*

Type d'eau	Niveau de concentration visé	Moyenne du rendement obtenu (%)	Moyenne du rendement par type d'eau (%)	Moyenne du biais obtenu (Log)	Ecart-type du biais
Eau d'Evian	1 000	117	75	-0,19	0,25
	10 000	45			
	100 000	63			
ECS	1 000	102	64	-0,27	0,28
	10 000	58			
	100 000	32			
TAR	1 000	84	66	-0,24	0,27
	10 000	73			
	100 000	42			

CONCLUSION

Les rendements moyens obtenus sont très supérieurs à 25%. Aucune inhibition n'a été observée lors de ces essais. La méthode est robuste : aucune différence significative de rendement n'est observée selon le type d'eau analysé.

2.2. LIMITE DE DETECTION

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 *Premium* – Réf. GDLP-471).

CONCLUSION

La limite de détection est validée à 5 UG/puits pour les deux GeneDisc pack *Premium*, conformément aux performances annoncées par le fournisseur.
Les résultats bruts sont détaillés dans l'annexe 1

2.3. LIMITE DE QUANTIFICATION

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

- Limite de quantification du *L. pneumophila* GeneDisc *Premium*

	Valeur cible	Valeur cible (log)	Valeur moyenne mesurée (n = 30)	Biais (log)	Intervalle de confiance à 95% (2.t.s)	Test de justesse (t calculé)	Incertitude de mesure*
Critères de validation					< 0,50	<2,045	<0.30
Résultats obtenus	25	1,39	23	0,03	0,288	2,338	0.15
Conclusion					conforme	Non conforme	conforme

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

CONCLUSION

Pour le GeneDisc pack *Premium*, la limite de quantification est répétable à 25 UG/puits mais présente un défaut de justesse avec le test de Student. En termes d'incertitude de mesure, elle est conforme au nouveau modèle statistique, accepté lors de la dernière réunion du groupe T90E (09/10/2007) et par le bureau technique.

2.4. DETERMINATION DE LA LINEARITE

5 gammes indépendantes ont été réalisées à partir de 5 tubes d'ADN génomique étalon de *L. pneumophila* ATCC33152, commercialisée par Genesystems (SDNA-Lp). L'étude de linéarité a été réalisée pour les valeurs de 25, 250, 2 500, 25 000, 250 000 UG/puits.

▪ Résultats

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 régression	2509,6	4,35	conforme
F erreur de modèle	0,24	3,10	conforme

	Analyse de l'incertitude - modèle en cours d'évaluation (XP T90-471)				
Cible UG	25	250	2500	25000	250000
Cible Log	1,40	2,40	3,40	4,40	5,40
biais moyen	0,016	-0,034	0,019	-0,001	-0,037
ecart type	0,040	0,086	0,061	0,019	0,067
Elin*	+/- 0,04 Log	+/- 0,09 Log	+/- 0,06 Log	+/- 0,02 Log	+/- 0,08 Log
Incertainitude	+/- 0,08	+/- 0,18	+/- 0,12	+/- 0,04	+/- 0,16

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

CONCLUSION

Le domaine linéaire est validé entre 25 et 250 000 UG d'ADN génomique de *L.pneumophila* ATCC 33152 pour le *Legionella pneumophila* GeneDiscs pack *Premium*.

2.5. INCLUSIVITE ET EXCLUSIVITE

Les essais d'inclusivité ont été effectués sur des extraits d'ADN de façon à obtenir environ 100 UG par puits.

Les essais d'exclusivité ont été effectués sur des extraits d'ADN de façon à obtenir au minimum 10 000 UG par puits.

- Souches bactériennes n'appartenant pas à l'espèce *Legionella* spp.

Souches bactériennes	Genedisc pack <i>Premium Legionella pneumophila</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Absence
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Absence
<i>Bacillus subtilis</i>	Absence
<i>Burkholderia cepacia</i>	Absence
<i>Clostridium perfringens</i>	Absence
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Absence
<i>E.coli</i>	Absence
<i>Flavobacterium flavobacter</i>	Absence
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Absence
<i>Listeria monocytogenes</i>	Absence
<i>Proteus vulgaris</i>	Absence
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Absence
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Absence
<i>Pseudomonas putida</i>	Absence
<i>Serratia marcescens</i>	Absence
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Absence
<i>Xanthomonas</i>	Absence

- Souches bactériennes appartenant au genre *Legionella* spp.

Souches bactériennes	Genedisc pack <i>Premium Legionella pneumophila</i>
<i>L.anisa</i>	Absence
<i>L.birminghamsis</i>	Absence
<i>L.bozemanii 1</i>	Absence
<i>L.bozemanii 2</i>	Absence
<i>L.cherrii</i>	Absence
<i>L.cincinnatiensis</i>	Absence
<i>L.dumofii</i>	Absence
<i>L.erythra 2</i>	Absence
<i>L.feeleii 1-2</i>	Absence

<i>L.gormanii</i>	Absence
<i>L.hackeliae</i> 1-2	Absence
<i>L.jordanis</i>	Absence
<i>L.lansingensis</i>	Absence
<i>L.longbeachae</i> 1-2	Absence
<i>L.maceachernii</i>	Absence
<i>L.micdadei</i>	Absence
<i>L.oackridgensis</i>	Absence
<i>L.pariensis</i>	Absence
<i>L.sainthelensis</i> 1-2	Absence
<i>L.tucsonensis</i>	Absence
<i>L.wadsworthii</i>	Absence
<i>L.pneumophila</i> s1	Présence
<i>L.pneumophila</i> s2	Présence
<i>L.pneumophila</i> s3	Présence
<i>L.pneumophila</i> s4	Présence
<i>L.pneumophila</i> s5	Présence
<i>L.pneumophila</i> s6	Présence
<i>L.pneumophila</i> s7	Présence
<i>L.pneumophila</i> s8	Présence
<i>L.pneumophila</i> s9	Présence
<i>L.pneumophila</i> s10	Présence
<i>L.pneumophila</i> s11	Présence
<i>L.pneumophila</i> s12	Présence
<i>L.pneumophila</i> s13	Présence
<i>L.pneumophila</i> s14	Présence
<i>L.pneumophila</i> s15	Présence

2.5. PRATICABILITE

Les 18 critères définis dans le protocole de validation AFNOR ont été étudiés.

MODE DE CONDITIONNEMENT DES REACTIFS

Les réactifs sont présentés dans les conditionnements suivants.

- *Legionella* Extraction Pack 01 (water samples)

Les éléments sont donnés sur l'emballage et page 2 de la notice.
Les réactifs d'extraction sont :

- ✓ « Tampon de lyse ».
- ✓ « Tampon de rinçage ».
- ✓ « Tampon de liaison » utilisable après ajout d'un « supplément Tampon de liaison ».
- ✓ « Tampon de lavage 1 ».
- ✓ « Tampon de lavage 2 ».
- ✓ « Tampon d'éluion ».
- ✓ Colonnes Filter.
- ✓ Colonne de Silice.

- **Genedisc pack *Premium***

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

Il existe deux Genediscs pack *Premium*:

- ✓ « *Legionella* spp Genedisc Pack *Premium* ».
- ✓ « *Legionella pneumophila* Genedisc Pack *Premium* ».

Chaque Genedisc pack *Premium* 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 « *Legionella* Extraction Pack 01 » (water samples).

CONDITION DE STOCKAGE DES ELEMENTS ET PEREMPTION DES PRODUITS

La température de stockage est indiquée sur les packs et à la page 3 de la notice du pack d'extraction et à la page 1 de la notice du Genedisc pack *Premium*.

Les Colonnes de Silice « Silica Columns » ainsi que les Genediscs Pack premium 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. Les GeneDisc périmés ne sont pas reconnus par le GeneDisc Cyclor et ne peuvent donc pas être utilisés par erreur.

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 2 de chacune des notices des deux packs.

Les mesures de sécurité nécessaires sont indiquées page 3 de la notice du Pack d'extraction.

REACTIFS PRETS A L'EMPLOI OU A RECONSTITUER

- ✓ **Pack d'extraction :**

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

- « Binding buffer »
- « Washing buffer 2 »
- « Elution Buffer »

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

✓ **GeneDisc pack Premium :**

Les réactifs sont prêts à l'emploi. Cependant, pour chaque numéro de lot de GeneDiscs GDLSP-471 ou GDLP-471 une droite d'étalonnage doit être validée préalablement. Pour cela, il faut reconstituer un tube d'ADN calibré à 250 000UG.

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

La formation initiale du technicien est de 2 jours.

TEMPS REELS DE MANIPULATION

Etapes	Temps nécessaire pour 6 échantillons
Filtration	En fonction du type d'eau ente 5 à 30 minutes
Extraction de l'ADN	1h45
PCR	15 min de préparation /durée de la PCR : 55min
Analyse des résultats	10 minutes

DELAI D'OBTENTION DES RESULTATS

- **Délai minimum :**

5h pour 5 échantillons. Le résultat peut être délivré à JO.
En cas de présence d'inhibition, la durée est augmentée de 1h30.

- **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 fichiers informatique ne peuvent pas être modifiés par l'opérateur. Les étapes autres que la PCR sont tracées dans des documents prévus par le laboratoire. Le GeneDisc Cyclor[®] et le GeneExtract[®] 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 Genesystems : métrologie thermique, optique et validation biologique.

VOLUME MINIMUM A PIPETER

Le volume minimal à pipeter est de 20 µl, dans le cas d'inhibition, il est de 10µl.

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. Les différents réactifs du pack « *Legionella* Extraction Pack 01 » sont aliquotés pour pouvoir effectuer deux séries d'analyses.

UNG

Les conseils de prévention des contaminations sont indiqués à la page 8 de la notice du « *Legionella* Extraction Pack 01 » et page 3 de la notice du « GeneDisc Pack Premium ».

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, une amplification d'un étalon d'ADN d'origine différente de celui utilisé pour la gamme et pré-déposé dans le secteur 6 du disque est réalisée. (cf. Page 2 de la notice du « GeneDisc Pack Premium »).

CONTROLE D'ABSENCE D'INHIBITEURS

A chaque analyse, la présence d'inhibiteur de la PCR dans l'extrait d'ADN est contrôlée.

Deux témoins internes d'inhibition sont présents dans chaque secteur d'analyse. Il s'agit d'oligonucléotides calibrés comportant les amorces spécifiques de *Legionella pneumophila*.

Ces témoins sont amplifiés en même temps que les échantillons.

(Cf. Page 2 de la notice du « GeneDisc Pack Premium »).

3. ETUDE INTER-LABORATOIRE

3.1. OBJECTIF

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

3.2. PLAN D'ESSAI ET ANALYSES REALISEES

3.2.1. 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.

3.2.2. 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.

3.3. RESULTATS

3.3.1. 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

3.3.2. REPETABILITE ET REPRODUCTIBILITE

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

Valeurs de fidélité - *Legionella pneumophila* :

Paramètre	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
Echantillon	A	B	C	D	E
Nombre de laboratoires retenus	14	14	15	14	11
Nombre initial de laboratoires	16	16	16	16	16
M = Moyenne générale (n/l)	176 420	1 854 464	55 968	550 357	116 858
Sr (n/l)	25 047	226 966	16 264	146 341	34 276
SR (n/l)	52 490	491 431	53 013	574 398	102 609
CVr (%)	14,2%	12,2%	29,1%	26,6%	29,3%
CVR (%)	29,8%	26,5%	94,7%	104,4%	87,8%
M = Moyenne générale (en log)	5,228	6,255	4,577	5,512	4,908
Sr (en log)	0,068	0,056	0,104	0,120	0,159
SR (en log)	0,134	0,110	0,414	0,493	0,414
CVr (%)	1,3%	0,9%	2,3%	2,2%	3,2%
CVR (%)	2,6%	1,8%	9,0%	8,9%	8,4%

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 0,159 Log (échantillon E).

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 0,134 Log, il peut atteindre 0,493 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, réalisée par le Laboratoire Expert, ainsi que l'étude inter-laboratoire montrent que les performances de la méthode Genesystems pour la détection de *Legionella pneumophila* sont conformes aux exigences de la norme XP T 90-471.

En conclusion de cette validation, la méthode Genesystems a reçu le numéro d'attestation GEN 25/03-12/07 par AFNOR Validation. La méthode GeneSystems *Legionella pneumophila* s'applique à tout type d'eau, sans restriction d'emploi.

PARTIE 2 : Extension de la validation AFNOR de la méthode Genesystems pour la détection et la quantification de *Legionella pneumophila* dans le domaine des eaux

1. OBJET DE L'ETUDE

L'étude présentée rentre dans le cadre de l'extension de la validation AFNOR de la méthode GeneSystems *Legionella pneumophila* pour la détection et la quantification de *Legionella pneumophila* par PCR dans le domaine des eaux.

Elle a été conduite selon le « protocole de validation pour les kits de détection et de dénombrement de *Legionella* et *L.pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction en chaîne de polymérisation (PCR) (Révision 0 adopté par AFNOR certification le 26.09.2006) ». Les modifications définies lors de la réunion du 07 septembre 2007 ont également été prises en compte pour cette étude.

Les phases 1 et 2 permettent l'étude par un laboratoire expert des performances annoncées par le fournisseur. En particulier sont examinés le rendement d'extraction, les limites de détection et quantification de l'étape PCR, la linéarité de la quantification ainsi que la praticabilité de la méthode. Il a été convenu, en accord avec le bureau technique, que l'inclusivité et l'exclusivité de la détection et quantification ainsi que la phase 3 (étude interlaboratoire) n'étaient pas nécessaires compte-tenu des modifications apportées à la méthode.

1.1. REFERENTIEL DE VALIDATION

Le protocole AFNOR de validation est basé sur les critères plans d'expérience et mode de calcul définis dans la norme XP T 90-471 (avril 2006) concernant le dénombrement de *Legionella* et *L.pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction en chaîne de polymérisation (PCR).

1.2. PRINCIPE DE LA METHODE GENESYSTEMS

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

- Extraction de l'ADN bactérien :
 - o *Legionella* Extraction Pack 05 (Notices PELEG05-96_04.F et PELEG05-96_01.EN)
 - o *Legionella* Extraction Pack 06 (Notices PELEG06-48_01.F et PELEG06-48_01.EN)

- Détection et quantification par PCR en temps réel :
 - o *Legionella* spp. GeneDisc Pack 12 secteurs (Notices GDLSP-471-12_01.F et GDLSP-471-12_01.EN)
 - o *Legionella pneumophila* GeneDisc Pack 12 secteurs (Notices GDLPN-471-12_01.F et GDLPN-471-12_01.EN)
 - o Duo *Legionella pneumophila*-spp. GeneDisc Pack (Notices GDLPLG-471_01.F et GDLPLG-471_01.EN)

L'objet de l'extension concerne la miniaturisation des colonnes de silice, permettant l'analyse de 48 échantillons simultanément (*Legionella* Extraction Pack 05) ainsi que l'analyse PCR réalisée en duplicat (*Legionella* spp. GeneDisc Pack 12 secteurs et Duo *Legionella pneumophila*-spp. GeneDisc Pack).

Le *Legionella* extraction Pack 05 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 colonnes de silice. L'ensemble du protocole de préparation d'ADN est géré par le GeneExtract.

L'ADN de *Legionella* est ensuite quantifié par PCR en temps réel grâce aux *Legionella* GeneDiscs Packs.

Le test PCR GeneSystems *Legionella* repose sur l'amplification génique par PCR en temps réel d'une séquence nucléique spécifique du genre *Legionella* spp ou de l'espèce *L. 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, séparée physiquement du Quencher, émet une fluorescence. Cette fluorescence est mesurée directement par le module optique du GeneDisc Cycleur.

Pour chaque analyse, le mélange ADN/Master Mix, déposé dans un secteur du GeneDisc, est adressé par dépression dans 6 chambres réactionnelles pré-chargées en réactifs (amorces, sondes, ADN). La composition des 6 chambres réactionnelles de chaque secteur des différents types de GeneDiscs entrant dans le cadre de la méthode est indiquée dans les tableaux suivants :

GDLPN-471-12		Détection FAM	Détection ROX
N° secteur analyse	N° puits PCR		
1-11	1	Contrôle interne d'inhibition	-
	2	Analyse <i>L. pneumophila</i>	Contrôle négatif -
	3	Analyse <i>L. pneumophila</i>	-
12	1	Analyse <i>L. pneumophila</i>	Contrôle négatif
	2	Contrôle interne d'inhibition	-
	3	Contrôle externe quantitatif	-

GDLSP-471-12		Détection FAM	Détection ROX
N° secteur analyse	N° puits PCR		
1-11	1	-	Contrôle interne d'inhibition
	2	Contrôle négatif	Analyse <i>Legionella spp.</i>
	3	-	Analyse <i>Legionella spp.</i>
12	1	Contrôle négatif	Analyse <i>Legionella spp.</i>
	2	-	Contrôle interne d'inhibition
	3	-	Contrôle externe quantitatif

GDLPLG-471		Détection FAM	Détection ROX
N° secteur analyse	N° puits PCR		
1-5	1	Contrôle interne d'inhibition Lp	-
	2	Analyse <i>L. pneumophila</i>	-
	3	Analyse <i>L. pneumophila</i>	Contrôle négatif -
	4	Contrôle négatif	Analyse <i>Legionella spp.</i>
	5	-	Analyse <i>Legionella spp.</i>
	6	-	Contrôle interne d'inhibition L.g
6	1	Analyse <i>Legionella spp.</i>	Contrôle négatif
	2	Contrôle interne d'inhibition Lp	-
	3	Analyse <i>L. pneumophila</i>	Contrôle négatif
	4	Contrôle interne d'inhibition Lg	-
	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, 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(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 GeneDiscs d'un même lot, sur un GeneDisc Cyclor donné, conformément à la définition de la série PCR selon la norme XP T90-471.

Pour chaque échantillon analysé, dans les mêmes conditions expérimentales que celles du GeneDisc 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.

2. RESULTATS DE L'ETUDE PRELIMINAIRE

2.1. DETERMINATION DU RENDEMENT

Le rendement a été évalué afin de vérifier la conformité de la méthode. Il a été évalué sur 6 échantillons indépendants, pour trois matrices différentes et pour trois niveaux de concentration différents. Au total, 54 échantillons ont été analysés. Le rendement a été évalué avec le «*Legionella pneumophila* GeneDisc pack» (Réf. GDLPN-471-12 HT *L. pneumophila*).

Matrices testées : - eau chaude sanitaire prélevée au laboratoire *
- eau de TAR**
- eau minérale d'Evian*

* exempte d'acides nucléiques de *Legionella*

** exempte d'acides nucléiques de *Legionella pneumophila*

Niveaux de concentration évalués : 1000, 10 000 et 100 000 UG/250 ml.

Inoculum : culture de *L. pneumophila* (souche ATCC 33152 T)

La suspension-mère de *L. pneumophila* a été titrée par lyse directe et dénombrement microscopique après marquage des cellules au DAPI.

Les analyses sont réalisées pendant 3 jours.

■ Incertitudes liées à la lyse directe

	<i>L. pneumophila</i>		DAPI*
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne
Jour 1	8,39	0,17	7,7
Jour 2	8,34	0,03	7,8
Jour 3	8,55	0,19	7,9

* Le dénombrement après marquage par le DAPI est obtenu à partir de la moyenne du nombre de bactéries comptés sur 20 champs.

- Etude du rendement optimal de la méthode GeneSystems *Legionella*

Type d'eau	Niveau de concentration visé	Moyenne du rendement obtenu (%)	Moyenne du rendement par type d'eau (%)	Moyenne du biais obtenu (Log)	Ecart-type du biais (S _R)	Incertitude ⁽¹⁾
Eau d'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				

⁽¹⁾ Incertitude = $(2x\sqrt{(\text{biais})^2 + (S_R)^2})$

CONCLUSION

Les rendements moyens obtenus sont supérieurs à 25%. Aucune inhibition n'a été observée lors de ces essais. La méthode est robuste vis-à-vis des différents types d'eau analysés, le rendement moyen obtenu pour chaque matrice n'étant pas significativement différent.

2.2. LIMITE DE DETECTION

La limite de détection a été testée sur le «Legionella pneumophila GeneDisc pack» (Réf. GDLPN-471-12 HT L. pneumophila) destiné à la détection de *L.pneumophila* (Réf. GDLPN-471-12 HT L. pneumophila).

Sur les 30 essais réalisés en dupliquât, il n'y a pas de résultat négatif.

CONCLUSION

La limite de détection est validée à 5 UG/puits pour le «Legionella pneumophila GeneDisc pack» (Réf. GDLPN-471-12 HT L. pneumophila), conformément aux performances annoncées par le fournisseur.

2.3. LIMITE DE QUANTIFICATION

De la même façon que pour la limite de détection, la limite de quantification de 25 UG/puits a été testée avec le «Legionella pneumophila GeneDisc pack» (Réf. GDLPN-471-12 HT L. pneumophila) destiné à la détection de *L.pneumophila*. Trente analyses, en dupliquât, ont été réalisées en condition de répétabilité.

- Résultats obtenus avec le « *L. pneumophila* GeneDisc Pack »

	Valeur cible	Valeur cible (log)	Valeur moyenne mesurée (n = 30)	Biais (log)	Intervalle de confiance à 95% (2.t.s)	Test de justesse (t calculé)	Incertitude de mesure*
Critères de validation					< 0,50	< 2,045	< 0,30
Résultats obtenus	25	1,39	23	0,03	0,390	0,118	0,208
Conclusion					conforme	conforme	conforme

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

CONCLUSION

Pour les deux GeneDisc Pack (*Legionella* spp. et *L. pneumophila*), quand l'analyse PCR est réalisée en deux puits, la limite de quantification est répétable et juste à 25 UG/puits. En terme d'incertitude de mesure, elle est conforme au nouveau modèle statistique de la norme XP T90-471 en cours de révision.

2.4. DETERMINATION DE LA LINEARITE

La linéarité a été évaluée par l'analyse de 5 gammes réalisées à partir d'ADN étalon de *L. pneumophila* ATCC33152 fourni par la société Genesystems (Réf. SDNA-Lp). L'étude de linéarité a été réalisée pour les valeurs de 25, 250, 2 500, 25 000, 250 000 UG/puits.

La détection et l'amplification ont été réalisées avec le « Duo *L.pneumophila* - spp. Pack ».

- Résultats

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 régression	10444,6	4,35	Non conforme
F erreur de modèle	4,13	3,10	Non conforme

	Analyse de l'incertitude - modèle en cours d'évaluation (XP T90-471)				
Cible UG	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
Incertain	+/- 0.18 Log	+/- 0.09 Log	+/- 0.25 Log	+/- 0.07 Log	+/- 0.15 Log

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

CONCLUSION

En considérant l'Elin, le domaine linéaire est validé entre 25 et 250 000 UG d'ADN génomique de *L.pneumophila* ATCC 33152 pour le « Duo *L.pneumophila* - spp. Pack ». Une trop bonne répétabilité (écart-type < 0,12Log) ne permet pas de valider le domaine linéaire par le test de Fisher.

2.5. INCLUSIVITE ET EXCLUSIVITE

L'inclusivité et l'exclusivité ont été testées sur le « Legionella pneumophila GeneDisc pack » (Réf. GDLPN-471-12 HT *L. pneumophila*).

- Souches bactériennes n'appartenant pas à l'espèce *Legionella pneumophila*

Souches bactériennes	<i>L.pneumophila GeneDisc Pack</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Absence
<i>E.coli</i>	Absence
<i>P.aeruginosa</i>	Absence
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Absence
<i>Flavobacterium</i>	Absence
<i>P.fluorescens</i>	Absence
<i>Bacillus subtilis</i>	Absence
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Absence
<i>Pseudomonas putida</i>	Absence
<i>Burkholderia cepacia</i>	Absence
<i>L.monocytogenes</i>	Absence
<i>Serratia marcescens</i>	Absence
<i>Clostridium</i>	Absence
<i>S.maltophilia</i>	Absence

E.aerogenes	Absence
Proteus vulgaris	Absence
Xanthomonas	Absence
L.micdadei	Absence
L.bozemanii	Absence
L.jordanis	Absence
L.dunmofii	Absence
L.gormanii	Absence
L.parisiensis	Absence
L.anisa	Absence
L.longbeachae	Absence
L.tucsonensis	Absence

- Souches bactériennes appartenant à l'espèce *Legionella pneumophila*

Souches bactériennes	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>L.pneumophila</i> s1	Présence
<i>L.pneumophila</i> s2	Présence
<i>L.pneumophila</i> s3	Présence
<i>L.pneumophila</i> s4	Présence
<i>L.pneumophila</i> s5	Présence
<i>L.pneumophila</i> s6	Présence
<i>L.pneumophila</i> s7	Présence
<i>L.pneumophila</i> s8	Présence
<i>L.pneumophila</i> s9	Présence
<i>L.pneumophila</i> s10	Présence
<i>L.pneumophila</i> s11	Présence
<i>L.pneumophila</i> s12	Présence
<i>L.pneumophila</i> s13	Présence
<i>L.pneumophila</i> s14	Présence
<i>L.pneumophila</i> s15	Présence
Souche modifiée 1*	Présence
Souche modifiée 2*	Présence
Souche modifiée 3*	Présence

* : souches de *L.pneumophila* mutantes non détectées sur l'ancienne version des GeneDisc.

2.6. PRATICABILITE

Les 18 critères définis dans le protocole de validation AFNOR ont été étudiés.

MODE DE CONDITIONNEMENT DES REACTIFS

Les réactifs sont présentés dans les conditionnements suivants.

- **Legionella Extraction Pack 05**

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.

- **Legionella GeneDisc Pack**

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

Il existe deux GeneDiscs pack :

- ✓ « Legionella spp GeneDisc Pack ».
- ✓ « Legionella pneumophila GeneDisc pack » (Réf. GDLPN-471-12 HT L. pneumophila).

Chaque GeneDisc pack contient :

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

- **Duo Legionella pneumophila – spp GeneDisc Pack**

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

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 « Legionella Extraction Pack 05 ».

CONDITION DE STOCKAGE DES ELEMENTS ET PEREMPTION DES PRODUITS

La température de stockage est indiquée sur les packs ainsi que sur les notices : à la page 3 de la notice du pack d'extraction et à la page 1 de la notice du GeneDisc pack et les Duo GeneDisc.

Les GeneDiscs Pack 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 de chacune des notices des deux GeneDiscs packs et la page 2 de la notice du pack d'extraction.

Les mesures de sécurité nécessaires sont indiquées page 2 de la notice du Pack d'extraction.

REACTIFS PRETS A L'EMPLOI OU A RECONSTITUER

✓ Pack d'extraction :

Lors de la première utilisation du *Legionella* Extraction Pack 05, 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.

✓ GeneDisc pack et DUO :

Les réactifs sont prêts à l'emploi. Cependant, pour chaque numéro de lot de GeneDiscs GDLSP-471-12 ou GDLP-471-12 ou GDLPLG-471 une droite d'étalonnage doit être validée préalablement. Pour cela, il faut reconstituer un tube d'ADN calibré à 250 000UG.

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

La formation initiale du technicien est de 2 jours.

TEMPS REELS DE MANIPULATION

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

DELAI D'OBTENTION DES RESULTATS

• Délai minimum :

2h15 pour 5 échantillons (GeneDiscs DUO *Legionella pneumophila* – spp.), 2h15 pour 11 échantillons (GeneDiscs Pack *Legionella* ou *Legionella pneumophila*) ou 3h15 pour les GeneDiscs Pack 12 échantillons (Pack *Legionella* et *Legionella pneumophila*). Le résultat peut être délivré à J0. En cas de présence d'inhibition, la durée est augmentée de 1h30.

• 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 Cycliser[®] et le GeneExtract[®] 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 Genesystems : 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 8 de la notice du « *Legionella* Extraction Pack 05 » et page 3 de la notice du « GeneDisc Pack ».

En effet, la prévention passe par la décontamination 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, une amplification d'un étalon d'ADN d'origine différente de celui utilisé pour la gamme et pré-déposé dans le secteur 12 du disque 12 secteurs (et dans le secteur 6 pour les disques DUO) 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-LABORATOIRE

En accord avec le bureau technique, l'étude inter-laboratoire n'a pas été réalisée dans le cadre de l'extension de validation de cette méthode.

3. CONCLUSION

Les résultats du Laboratoire Expert montrent des performances conformes aux exigences de la norme XP T 90-471 pour l'évaluation de la méthode Genesystems pour la détection de *Legionella pneumophila*.

En conclusion de cette validation, la méthode Genesystems a reçu le numéro d'attestation GEN 25/03-12/07 par AFNOR Validation. La méthode GeneSystems *Legionella pneumophila*. s'applique à tout type d'eau, sans restriction d'emploi.