

Standard NF T90-471

**Detection of Legionella
pneumophila via real time pCR**

www.afnor.org



**DOCUMENT PROTÉGÉ
PAR LE DROIT D'AUTEUR**

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans accord formel.

Contacteur :
AFNOR – Norm'Info
11, rue Francis de Pressensé
93571 La Plaine Saint-Denis Cedex
Tél : 01 41 62 76 44
Fax : 01 49 17 92 02
E-mail : norminfo@afnor.org

afnor

Diffusé avec l'autorisation de l'éditeur

Distributed under licence of the publisher

Qualité de l'eau — Détection et quantification des *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (qPCR)

E : Water quality — Detection and quantification of *Legionella* and/or *Legionella pneumophila* by concentration and genic amplification by real time polymerase chain reaction (qPCR)

D : Wasserbeschaffenheit – Nachweis und Quantifikation von *Legionella* und/oder *Legionella pneumophila* durch Konzentration und Genamplifikation mittels einer Echtzeit-Polymerisationskettenreaktion (q-PCR)

Norme française homologuée

par décision du Directeur Général d'AFNOR.

Remplace la norme homologuée NF T 90-471, d'avril 2010.

Correspondance

À la date de publication du présent document, il existe un projet de norme internationale traitant du même sujet.

Résumé

Le présent document s'adresse aux laboratoires ayant à détecter et quantifier des *Legionella* spp et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (qPCR).

Il décrit des exigences méthodologiques générales et des exigences d'évaluation des performances et de contrôle qualité.

Descripteurs

Thésaurus International Technique : EAU, QUALITE, ESSAI DES EAUX, POLLUTION DE L'EAU, ANALYSE MICROBIOLOGIQUE, DETECTION, COMPTAGE DES BACTERIES, BACTERIE, LEGIONELLE, CONCENTRATION, POLYMERISATION, PCR, METHODE ENZYMATIQUE, ADN, FILTRATION, METHODE PAR CENTRIFUGATION, MILIEU DE CULTURE, MODE OPERATOIRE, ECHANTILLONNAGE, CONDITIONS D'ESSAI.

Modifications

Par rapport au document remplacé, actualisation de la méthode décrite.

Corrections

La norme

La norme est destinée à servir de base dans les relations entre partenaires économiques, scientifiques, techniques et sociaux.

La norme par nature est d'application volontaire. Référencée dans un contrat, elle s'impose aux parties. Une réglementation peut rendre d'application obligatoire tout ou partie d'une norme.

La norme est un document élaboré par consensus au sein d'un organisme de normalisation par sollicitation des représentants de toutes les parties intéressées. Son adoption est précédée d'une enquête publique.

La norme fait l'objet d'un examen régulier pour évaluer sa pertinence dans le temps.

Toute norme est réputée en vigueur à partir de la date présente sur la première page.

Pour comprendre les normes

L'attention du lecteur est attirée sur les points suivants :

Seules les formes verbales **doit et doivent** sont utilisées pour exprimer une ou des exigences qui doivent être respectées pour se conformer au présent document. Ces exigences peuvent se trouver dans le corps de la norme ou en annexe qualifiée de «normative». Pour les méthodes d'essai, l'utilisation de l'infinitif correspond à une exigence.

Les expressions telles que, **il convient et il est recommandé** sont utilisées pour exprimer une possibilité préférée mais non exigée pour se conformer au présent document. Les formes verbales **peut et peuvent** sont utilisées pour exprimer une suggestion ou un conseil utiles mais non obligatoires, ou une autorisation.

En outre, le présent document peut fournir des renseignements supplémentaires destinés à faciliter la compréhension ou l'utilisation de certains éléments ou à en clarifier l'application, sans énoncer d'exigence à respecter. Ces éléments sont présentés sous forme de **notes ou d'annexes informatives**.

Commission de normalisation

Une commission de normalisation réunit, dans un domaine d'activité donné, les expertises nécessaires à l'élaboration des normes françaises et des positions françaises sur les projets de norme européenne ou internationale. Elle peut également préparer des normes expérimentales et des fascicules de documentation.

Si vous souhaitez commenter ce texte, faire des propositions d'évolution ou participer à sa révision, adressez-vous à <norminfo@afnor.org>.

La composition de la commission de normalisation qui a élaboré le présent document est donnée ci-après. Lorsqu'un expert représente un organisme différent de son organisme d'appartenance, cette information apparaît sous la forme : organisme d'appartenance (organisme représenté).

Microbiologie des eaux

AFNOR T90D

Composition de la commission de normalisation

Président : M PIERLOT

Secrétariat : M GAUDRIER — AFNOR

MME	BELAUBE	VILLE DE TOULON (LABORATOIRE DEPARTEMENTAL D ANALYSES)
M	BENISMAIL	NESTLE WATERS MANAGEMENT & TECHNOLOGY
MLLE	BERNARD	LABORATOIRE DEPARTEMENTAL D ANALYSES
MME	BINET	EDF R&D
MME	BOILLETOT	SOLABIA
M	BOISSONNOT	DION GENERALE DE LA SANTE
M	BOUTON	PALL GENEDISC TECHNOLOGIES
MME	BRUNEL	LABO DEPARTEMENTAL DE LA DROME
M	CABON	NESTLE WATERS MANAGEMENT & TECHNOLOGY
M	CAILLAUD	IQUARES / PHILIPPE CAILLAUD
MME	CALLIER	EAU DE PARIS
M	CANNOT	CTC
M	CARLIER	VILLE DE PARIS — LABORATOIRE D HYGIENE
M	CHABEAUD	EUROFINS LABO MICROBIOLOGIE OUEST
M	CHAPERON	CAPSIS
MME	CHAUMET	EHESP — ECOLE HAUTES ETUDES EN SANTE PUBLIQUE
M	CIRCAL	SGS MULTILAB
M	COLIN	INOVALYS (ASLAE)
MME	COLOCCI	LABORATOIRE DEPARTAL D ANALYSES ET DE CONSEIL (ASLAE)
M	CORNET	CLICK4TAG
MME	COURTOIS	SUEZ ENVIRONNEMENT (FP2E)
MME	COUTURIER	SGS MULTILAB
M	DAVID	BIOMERIEUX SA
MME	DE BUCHY	FRANCOISE DE BUCHY
MME	DEBEAUPUIS	SUEZ ENVIRONNEMENT (FP2E)
MME	DEFER	SILLIKER
MME	DELABRE	GIE DES LABORATOIRES (FP2E)
M	DELOM	CTC
MME	DESENCLOS	ALPA CHIMIES
MME	DESLOGES	DEPARTEMENT 77 — LDA (ASLAE)
MME	DESSERLE	GIE DES LABORATOIRES (FP2E)
MME	DIGONNET	AFNOR CERTIFICATION
MME	DIRUIT	SARL BIO-CLIN
MME	DUBROU	VILLE DE PARIS — LABORATOIRE D HYGIENE
MME	DUJARDIN	EAU DE PARIS
M	DUKAN	CLICK4TAG
MME	DUMOUTIER	SUEZ ENVIRONNEMENT (FP2E)
MME	ENKIRI	VILLE DE PARIS — LABORATOIRE D HYGIENE
MME	FABRE	LD21 — LABO DEPT COTE D OR
M	FACON	BIO-RAD
M	FEINBERG	MAX FEINBERG
M	FESTOC	PALL GENEDISC TECHNOLOGIES
M	FONTAN	LABO DEPT DE L'EAU — CONSEIL GENERAL (ASLAE)
M	FREMAUX	EDF CEIDRE DLAB (EDF R&D)
MME	GALLIOT	EAU DE PARIS
MME	GARAU	LD2H — LABO DEPT HYDROLOGIE HYGIENE (ASLAE)
M	GARRELLY	GL BIOCONTROL
M	GASSILLOUD	ANSES NANCY HYDROLOGIE
MLLE	GAUDET	SILLIKER
MME	GENTIEN	SOLABIA
MME	GERARD	EHESP — ECOLE HAUTES ETUDES EN SANTE PUBLIQUE

M	GIRONNET	ADGENE LABORATOIRE
MME	GODARD	CHU BESANCON-HOPITAL JEAN MINJOZ
MME	GRILLON	CAR
M	GROULT	CAR
M	GUARINI	AGLAE
MLLE	GUICHET	EUROFINS LABO MICROBIOLOGIE OUEST
MME	HALLIER SOULIER	PALL GENEDISC TECHNOLOGIES
MME	HARDOUIN	AFNOR
M	HERNANDEZ	EUROFINS IPL ILE DE FRANCE
MME	JACQUES	EUROFINS ANALYSES ENVIRON FRANCE
MME	KENTZINGER	MILLIPORE SAS
M	LE BIHAN	OXOID SAS
M	LE GENDRE	IDEXX
M	LE GENT	LABOCEA QUIMPER (ASLAE)
MME	LEBRETON	LABEO MANCHE (ASLAE)
MME	LEPEUPLE	ANJOU RECHERCHE GIE — VEOLIA ENVIRONNEMENT
M	LOISY	CEERAM
M	MAMODALY	COFRAC
MME	MARSAC	BIOMERIEUX SA
MME	MESSINEO	BIPEA
M	MOLINIER	AGLAE
M	MOULIN	EAU DE PARIS
MME	NAKACHE — DANGLLOT	SAUR (FP2E)
M	PAIXAO	SOLABIA SAS (SOLABIA)
MME	PARIS	SAEME — SA EAUX MINERALES EVIAN
M	PASTORI	BIO-RAD
M	PAVAGEAU	DION GENERALE DE LA SANTE
MME	PAYS-INGLESE	DEPARTEMENT HTE LOIRE — LABO DEPT ANALYSES (ASLAE)
M	PIERLOT	AGLAE
M	PLESIAT	CHU BESANCON-HOPITAL JEAN MINJOZ
M	POINTILLART	LASAT — SYND MIXTE LABO ANALYSES SEVRES ATLANTIQUE
MME	POTY	GIE DES LABORATOIRES (FP2E)
MME	PRODHOMME	LABOCEA PLOUFRAGAN (ASLAE)
MME	PY	ANSES NANCY HYDROLOGIE
M	QUIGNON	IUT
MME	RICHARD	LABO ALPA
M	RICHARD	LABO ALPA
M	ROCQUE	ADGENE LABORATOIRE
MME	RODRIGUES	ISHA — INST SCIENTIFIQUE HYGIENE ANALYSE
M	ROUSSELIN	IDEXX
MME	ROUXEL	EHESP — ECOLE HAUTES ETUDES EN SANTE PUBLIQUE
MLLE	SAMMARTANO	AFNOR CERTIFICATION
M	SEILLER	BIPEA
MME	SELVE	LDA 19 — LABO DEPT ANALYSES CORREZE (ASLAE)
MME	SIBELET	LASAT — SYND MIXTE LABO ANALYSES SEVRES ATLANTIQUE
MME	SINTONI	SARTORIUS STEDIM FRANCE SAS
M	THOMAS	EUROFINS IPL NORD (EUROFINS ANALYSES ENVIRON FRANCE)
MME	VASSAL	SARL BIO-CLIN
M	WAGNER	LABORATOIRE DEPARTEMENTAL D ANALYSES
MME	WELTE	EAU DE PARIS
MME	ZOUICHA	PALL GENEDISC TECHNOLOGIES

Les experts du groupe de travail, animé par M GARRELLY « Détection des *Legionella* — méthodes alternatives » dédié à la révision, ont particulièrement participé à l'élaboration de ce document :

MME	OGER-DUROY	VILLE DE TOULON – BIO-RAD
MME	HALLIER-SOULIER	PALL GeneDisc Technologies
M	FACON	BIO-RAD
M	GARRELLY	GL BIOCONTROL

Sommaire

	Page
Introduction	7
1 Domaine d'application	9
2 Références normatives	9
3 Termes et définitions	9
4 Principe	10
5 Échantillonnage	10
6 Conditions générales de réalisation des essais	11
6.1 Généralités	11
6.2 Personnel	11
6.3 Locaux	11
6.4 Appareillage et consommables hors réactifs	11
6.4.1 Généralités	11
6.4.2 Concentration	12
6.4.3 Extraction, amplification, détection et quantification	12
6.5 Réactifs	12
6.5.1 Généralités	12
6.5.2 Réactifs qPCR	12
6.5.3 Solutions de raccordement	13
6.5.4 Autres réactifs	13
6.6 Décontamination des matériels et locaux	13
6.7 Traitement et élimination des déchets	14
7 Mode opératoire	14
7.1 Concentration	14
7.2 Extraction : Lyse cellulaire et purification de l'ADN	14
7.2.1 Généralités	14
7.2.2 Stabilité de l'ADN extrait	14
7.3 Amplification de l'ADN par qPCR	14
7.3.1 Généralités	14
7.3.2 Séquences cibles, amorces et sondes	15
7.3.3 Protocole	15
7.4 Détection quantitative	15
7.4.1 Généralités	15
7.4.2 Protocole	16
7.5 Détection qualitative	16
8 Expression des résultats	16
9 Rapport d'essai	18
10 Évaluation des performances	18
10.1 Généralités	18
10.2 Inclusivité et exclusivité des sondes et amorces	19
10.3 Étude de la fonction de calibrage de l'étape qPCR quantitative	19
10.3.1 Généralités	19
10.3.2 Principe de vérification de la droite de calibrage	19
10.3.3 Protocole d'évaluation de la droite de calibrage	20
10.3.4 Analyse des résultats	21
10.3.5 Utilisation de la droite de calibrage	23

Sommaire

	Page
10.4	Vérification de la limite de quantification de la qPCR (LQ_{PCR}) et calcul de la LQ théorique de la méthode 23
10.4.1	Principe 23
10.4.2	Protocole 23
10.4.3	Analyse des résultats 24
10.4.4	Limite de quantification théorique de la méthode 25
10.5	Vérification de la limite de détection de la qPCR (LD_{PCR}) 26
10.5.1	Principe 26
10.5.2	Protocole 26
10.6	Rendement de la méthode 26
10.6.1	Principe 26
10.6.2	Protocole 26
10.6.3	Calculs 27
10.7	Robustesse 27
10.8	Incertitude de mesure sur l'ensemble de la méthode 28
11	Contrôles qualité et suivi des performances 29
11.1	Généralités 29
11.2	Raccordement de la solution calibrante et du matériau de référence à l'étalon primaire 29
11.2.1	Principe 29
11.2.2	Protocole 29
11.2.3	Analyse des données 29
11.3	Suivi des performances 31
11.3.1	Suivi des performances de calibrage 31
11.3.2	Suivi des performances de la limite de quantification 31
11.4	Contrôles positifs et négatifs de la méthode 31
11.5	Blanc réactif PCR 31
11.6	Témoin d'inhibition 31
11.6.1	Généralités 31
11.6.2	Le témoin d'inhibition est la cible elle-même 31
11.6.3	Le témoin d'inhibition est soit un plasmide ou oligonucléotide 32
Annexe A	(informative) Exemple de protocole de réalisation d'une solution calibrante de travail 33
Annexe B	(informative) Exemple de méthode de calcul des CT et du log d'unités génomes 34
Annexe C	(informative) Exemple d'étude de la fonction de calibrage de l'étape PCR quantitative 35
Annexe D	(normative) Table statistique — Loi de Student 38
Annexe E	(informative) Exemple d'évaluation du rendement 39
Annexe F	(informative) Exemple d'évaluation de l'incertitude globale 40
Annexe G	(normative) Données d'essais interlaboratoires 41
Annexe H	(normative) Évaluation des performances dans le cadre d'une Vérification de méthode validée tierce partie 44
Bibliographie 45

Introduction

Le genre *Legionella* est responsable d'infections pulmonaires appelées légionelloses. En particulier, l'espèce *Legionella pneumophila* est responsable de la majorité des cas de légionelloses.

L'objectif du présent document est de :

- répondre aux attentes analytiques, notamment en termes de délai des administrations et des utilisateurs confrontés à la gestion des risques associés aux *Legionella* ;
- permettre l'utilisation d'une technologie d'analyse nouvellement adaptée à la recherche des *Legionella* tout en cadrant les travaux de développement des différents acteurs de la filière.

Le présent document a pour objet de fournir une méthode d'essai rapide pour détecter et quantifier les *Legionella* notamment dans les circuits d'eau chaude sanitaire (ECS) et les circuits de tours aéroréfrigérées (TAR) par une méthode d'amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (qPCR).

L'obtention rapide des résultats rend cette méthode particulièrement adaptée à :

- la prévention et la gestion du risque *Legionella* au service des processus de maîtrise des installations pouvant présenter un risque sanitaire lié à la présence de *Legionella*. Dans ce cas, elle sert d'indicateur de suivi microbiologique applicable à la surveillance d'équipements à risque ou à l'optimisation des conditions d'exploitation d'une installation ;
- la gestion de crise, en cas d'épidémie localisée ou étendue de *Legionella*, en permettant d'identifier en moins de 48 h les sites ou équipements contaminés.

Cette méthode concerne à la fois ;

— par sa finalité :

- les autorités publiques et les collectivités territoriales dans le cadre de leur mission générale de prévention des risques, de sécurité, de santé et de protection de l'environnement ;
- les acteurs intervenant dans l'eau pour l'approvisionnement, la fourniture, l'équipement, la maintenance et le traitement des réseaux, des installations et des circuits ;
- les chefs d'installations classées et d'établissements industriels ;
- les directeurs d'établissements de santé, d'établissements d'hébergement pour personnes âgées dépendantes (EHPAD médicalisés ou non) et d'établissements thermaux ;
- les chefs d'établissements recevant du public (ERP), notamment les établissements de tourisme (hôtels, camping, hébergement d'activités saisonnières, etc.), les musées, les piscines, la distribution (centres commerciaux, commerces), etc. ;
- les gestionnaires d'établissements du tertiaire ;
- les gestionnaires d'immeubles d'habitation aussi bien que les particuliers ;

— par son contenu et ses exigences méthodologiques :

- les fournisseurs d'équipements et de consommables de laboratoire ;
- les laboratoires d'analyses à l'usage desquels elle est plus spécifiquement destinée.

Les résultats d'analyses obtenus par le présent document fournissent des informations qui peuvent être exploitées de façon complémentaire à ceux obtenus par la méthode par culture selon la norme NF T 90-431, chacune des méthodes d'essai présentant des avantages, des inconvénients et des particularités.

Les avantages de la méthode décrite dans le présent document sont :

- rapidité d'obtention des résultats définitifs en moins de 48 h ;
- détection et quantification des *Legionella* viables mais non cultivables (état pouvant résulter de traitements par biocide) ;
- détection des éventuels effets inhibiteurs des échantillons (pas de risque de faux négatifs liés à ces effets inhibiteurs) ;
- insensibilité à la présence d'une flore interférente.
- Corrélation quantitative avec la méthode NF ISO 11731:2004 sur la cible *Legionella pneumophila* suggérant un écart moyen de 0,6 log (An international trial of quantitative PCR for monitoring Legionella in artificial water systems. J.V. Lee et al Journal of Applied Microbiology 110, 1032–1044 ^a 2011)

Les inconvénients de la méthode décrite dans le présent document sont :

- absence de corrélation quantitative directe avec la méthode par culture pour la cible *Legionella* spp rendant toute comparaison difficile.

Les particularités de la méthode décrite dans le présent document sont :

- détection de l'ensemble des *Legionella* présentes dans un échantillon quel que soit leur état physiologique, indépendamment de leur cultivabilité ;
- permet une comparaison quantitative et l'interprétation des résultats dans le temps sur une installation ;
- la méthode permet la détection et la gestion des éventuels inhibiteurs de la réaction d'amplification.

Les deux méthodes donnent [11 — 12] :

- des informations équivalentes pour la recherche des *Legionella pneumophila* dans les circuits d'eaux chaudes sanitaires à distance de tout traitement choc ou par biocide. Un résultat qPCR négatif est prédictif d'un résultat négatif par culture ;
- le plus souvent des résultats supérieurs sur la cible *Legionella* spp.

AVERTISSEMENT — Les *Legionella* sont des bactéries appartenant au groupe 2 de risque. Elles sont susceptibles de causer des infections humaines par inhalation. Par conséquent, les manipulations suivantes doivent être effectuées par du personnel averti, avec toutes les précautions d'usage : travailler en conditions aseptiques, éviter la formation d'aérosols, stériliser les déchets, etc. ([8], [9]).

AFNOR attire l'attention sur le fait qu'il est déclaré que la conformité avec les dispositions du présent document peut impliquer l'utilisation d'un brevet intéressant la technologie de la réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (qPCR). AFNOR ne prend pas position quant à la preuve, à la validité et à la portée de ces droits de propriété. AFNOR a été informée par l'Organisation internationale de normalisation (ISO) que Applied Biosystems, Roche Molecular Systems, Inc. et F. Hoffman-La Roche Ltd. détiennent les droits de propriété de la technologie de la PCR. Les compagnies ont donné l'assurance à l'ISO qu'elles consentent à négocier des licences avec des demandeurs du monde entier, à des termes et conditions raisonnables et non discriminatoires. À ce propos, les déclarations des détenteurs des droits de propriété sont enregistrées à l'ISO. Des informations peuvent être demandées à :

Licensing Department
Applied Biosystems
850 Lincoln Centre Drive
Foster City, CA 94404
États-Unis

et

Roche Molecular Systems, Inc.
Licensing Department
1145 Atlantic Avenue
Alameda, CA 94501
Etats-Unis

L'attention est d'autre part attirée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété autres que ceux qui ont été mentionnés ci-dessus. AFNOR ne saurait être tenue pour responsable de l'identification de ces droits de propriété en tout ou partie.

Pour toute information supplémentaire :

Legal Services/Intellectual Property
ISO Central Secretariat
1, ch de la Voie-creuse
P.O BOX 56
CH-1211 Geneva 20
Switzerland
WWW.iso.org

1 Domaine d'application

Le présent document décrit des exigences méthodologiques générales et des exigences d'évaluation des performances, ainsi que les contrôles qualité requis pour la détection et quantification des *Legionella* spp et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (qPCR).

La méthode décrite dans le présent document est applicable à tout type d'eau sous réserve de validation sur le type de matrice étudiée (voir 10.7).

NOTE Les résultats sont exprimés en nombre d'unités génome de *Legionella* spp et/ou *Legionella pneumophila* par litre d'échantillon.

2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

NF X 06-030, *Application de la statistique — Guide pour la mise en place de la Maîtrise Statistique des Processus*.

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

3.1

***Legionella* (définition génotypique)**

genre bactérien pouvant être défini par des séquences d'ADN des gènes codant pour les ARN ribosomiques 16S qui lui sont spécifiques

Note 1 à l'article : ADN est l'abréviation d'acide désoxyribonucléique. ARN est l'abréviation d'acide ribonucléique.

3.2

***Legionella* (définition phénotypique)**

genre bactérien dont les membres sont des bacilles, non sporogènes, Gram négatif, aérobies, flagellés ou non, exigeants en L-cystéine, caractérisés par leur richesse en acides gras ramifiés, propriété très inhabituelle pour des germes à Gram négatif

3.3

***Legionella pneumophila* (définition génotypique)**

espèce appartenant au genre bactérien *Legionella* pouvant être définie par des séquences d'ADN qui lui sont spécifiques

3.4

***Legionella pneumophila* (définition phénotypique)**

espèce appartenant au genre *Legionella*, donnant une réaction positive en présence d'un sérum anti-*L. pneumophila*

3.5

PCR

Polymerase Chain Reaction

3.6

série d'amplifications d'échantillons

réactions qPCR réalisées avec les mêmes lots de réactifs qPCR et le même thermocycleur

3.7

série de mesures

réactions PCR réalisées simultanément sur un même thermocycleur

3.8

matériau de référence

solution d'ADN de *Legionella pneumophila* WDCM 00107 de concentration connue et raccordée à l'étalon primaire, utilisée sans dilution pour valider chaque série de mesures

NOTE 1 La collection WDCM (World Data Center for Microorganisms) référence la souche *L.pneumophila* WDCM 00107.

NOTE 2 Se reporter au site <http://refs.wdcm.org/species.htm> pour trouver les références équivalentes des souches WDCM citées dans d'autres collections.

3.9

solutions calibrantes de travail

solutions d'ADN de *Legionella pneumophila* WDCM 00107 de concentration connue et raccordée à l'étalon primaire, utilisées pour établir l'équation de la droite de calibrage

3.10

étalon primaire (SRM_LEGDNA_01)

solution d'ADN de *Legionella pneumophila* WDCM 00107 de concentration déterminée par une méthode de mesure primaire, utilisée comme référence pour raccorder les solutions calibrantes de travail

4 Principe

La recherche et la quantification des *Legionella* par PCR quantitative (qPCR) s'effectuent en trois phases :

- concentration des microorganismes contenus dans les échantillons par filtration ;
- extraction de l'ADN ;
- amplification d'une ou de plusieurs séquences spécifiques d'ADN appartenant au genre *Legionella* et/ou à l'espèce *L. pneumophila* contenues dans l'extrait d'ADN. Identification et quantification des amplicons en temps réel.

5 Échantillonnage

Les échantillons doivent être prélevés dans des récipients stériles avec toutes les précautions nécessaires. Les conditions du prélèvement doivent figurer dans le rapport d'essai si elles sont connues.

Les échantillons prélevés doivent parvenir au laboratoire chargé des analyses le plus rapidement possible et au plus tard le lendemain suivant le prélèvement.

Le transport et la conservation de l'échantillon sont réalisés à température ambiante de préférence en enceinte isotherme non réfrigérée.

En cas de réception tardive d'échantillon liée à un évènement imprévisible, les analyses peuvent être réalisées le surlendemain du prélèvement. Dans ce cas exceptionnel, le transport dans une enceinte à $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ est nécessaire jusqu'à l'extraction d'ADN.

L'extraction d'ADN doit être réalisée le plus rapidement possible. Si l'amplification de l'extrait d'ADN n'est pas réalisée le jour même, l'extrait doit être conservé congelé à une température inférieure à $-18 ^\circ\text{C}$. Toute conservation à $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ sur une durée supérieure à 24 h doit faire l'objet d'une validation.

Dans le cas d'échantillons provenant d'eaux traitées par un biocide oxydant, le récipient collecteur stérile doit de plus, contenir du thiosulfate de sodium, en quantité suffisante pour neutraliser les oxydants (par exemple, à une concentration de 20 mg/l), introduit stérilement après stérilisation du flacon ou préalablement à celle-ci, mais en tenant compte des pertes par oxydation.

D'autres produits biocides (bactéricides ou bactériostatiques) sont parfois utilisés, en particulier dans les tours d'aéroréfrigération. Leur présence, qui peut conduire à une sous-estimation, devrait donc être déclarée et figurer dans le rapport d'essai si elle est connue. Il n'est toutefois pas toujours possible de neutraliser ces produits.

6 Conditions générales de réalisation des essais

6.1 Généralités

La qPCR est une méthode de détection sensible. Les aérosols, les poussières et autres particules sont autant de vecteurs d'ADN contaminant. Il est alors impératif de séparer dans l'espace et/ou dans le temps, les différentes étapes «contaminantes» et d'assurer une maintenance adaptée des locaux et appareillages.

Les principes à appliquer sont les suivants :

- il est recommandé d'utiliser des consommables à usage unique compatibles avec les méthodes qPCR ;
- une procédure d'élimination de traces d'ADN doit être appliquée en cas de contamination accidentelle des locaux ou des appareils ;
- des contrôles réguliers doivent démontrer l'efficacité des procédures de maintenance. L'objectif est de vérifier l'absence d'ADN de *Legionella* (voir 11.4).

6.2 Personnel

Le personnel doit être formé et qualifié à la fois pour les techniques de bactériologie et la biologie moléculaire.

Le personnel doit revêtir une blouse différente pour les activités de microbiologie faisant appel à la culture et les activités de biologie moléculaire. Lorsque des gants sont utilisés, ils doivent être à usage unique et non-talqués.

Il est nécessaire de changer de blouse entre les zones de basse concentration en ADN et les zones de haute concentration en ADN de *Legionella*. Lorsque les blouses utilisées ne sont pas à usage unique, leur remplacement et nettoyage périodique doivent être gérés.

Seul le personnel dûment équipé doit accéder aux locaux spécifiques à ces essais.

6.3 Locaux

Le laboratoire doit comporter au minimum deux zones physiquement séparées (par exemple : hotte qPCR), la zone comprenant les activités pré-qPCR a) b) et qPCR c). Cependant, il peut être intéressant de disposer de trois zones physiquement séparées a) b) c) :

- a) une zone pour la concentration des échantillons, pour l'extraction de l'ADN ;
- b) une zone pour la préparation des réactifs PCR (mélanges réactionnels) ;
- c) une zone pour le dépôt des extraits ;
- d) une zone protégée pour l'amplification.

En cas d'utilisation d'automates, certaines activités peuvent être regroupées dans une même zone. Dans tous les cas, l'absence de contamination doit être vérifiée (voir 11.4).

Quel que soit le système d'amplification et de détection des amplicons utilisé, aucun tube ne doit être ouvert après amplification dans les zones a), b) et c).

6.4 Appareillage et consommables hors réactifs

6.4.1 Généralités

- Matériel courant de laboratoire : Hotte, centrifugeuse, bain-marie, etc.
- Thermocycleur temps réel : appareil permettant une amplification par qPCR avec acquisition à chaque cycle d'un signal de fluorescence proportionnel au nombre d'unités génomes de l'amplicon.

6.4.2 Concentration

Lorsque des membranes filtrantes sont utilisées, elles doivent être en polycarbonate ou tout autre composé ayant une faible capacité d'adsorption des protéines et de l'ADN, de porosité nominale inférieure ou égale à 0,45 µm. Ne surtout pas utiliser de membrane contenant de la cellulose.

6.4.3 Extraction, amplification, détection et quantification

En dehors de l'étape de concentration, il est rappelé que les appareillages ne doivent pas être en contact avec l'échantillon d'eau, afin d'éviter toute contamination croisée. Il est recommandé d'utiliser du matériel à usage unique. À défaut, le contrôle qualité doit démontrer l'efficacité de décontamination des consommables. Il est usuel d'utiliser des consommables de qualité dite de « biologie moléculaire ».

Les appareillages et consommables suivants sont importants et doivent faire l'objet d'attentions particulières :

- micropipette : afin d'éviter les contaminations croisées par aérosols, utiliser impérativement des cônes à filtre hydrophobe. Posséder un jeu de micropipettes par zone d'activité ;
- les blocs chauffants sont préconisés afin d'éviter les contaminations par les aérosols ;
- hotte qPCR. Il est recommandé qu'elle soit munie de lampes UV (voir 6.6) pour assurer la décontamination du matériel utilisé.

6.5 Réactifs

6.5.1 Généralités

Tous les réactifs utilisés dans le cadre du présent document doivent être stériles, exempts de nucléases, d'inhibiteurs de la qPCR et d'ADN (ou à défaut d'ADN de *Legionella*).

Dans la mesure du possible, tous les réactifs doivent être aliquotés de façon à ne pas réutiliser les aliquotes. Cette règle permet d'améliorer la répétabilité des méthodes. L'aliquotage doit être complété d'un système de traçabilité.

Suivre les recommandations des fournisseurs pour le stockage et la manipulation des réactifs.

6.5.2 Réactifs qPCR

En règle générale, un mélange réactionnel de PCR contient les composants figurant dans le Tableau 1.

Afin d'améliorer la répétabilité des qPCR en diminuant l'incertitude associée à la manipulation des petits volumes, il est conseillé de préparer des mélanges réactionnels de volume suffisant, pour éviter le pipetage de volume inférieur à 5 µL.

Il est préférable de préparer les mélanges réactionnels extemporanément. En cas de conservation du mélange réactionnel, sa stabilité doit être validée sur une période définie en effectuant une vérification du modèle linéaire de la fonction de calibrage en fin de période (voir 10.3). Cette validation doit répondre aux critères définis en 10.3.4. Elle permet de fixer la date limite d'utilisation notée DLU.

Les mélanges réactionnels prêts à l'emploi doivent également comporter une DLU.

Enfin, la règle de l'aliquotage décrite en 6.5.1 s'applique également aux mélanges réactionnels.

Tableau 1 — Composants utilisés dans une réaction qPCR typique

Composant ^a	Explication
Eau de dilution	Diluant
Solution tampon de qPCR	La composition varie de manière importante selon les systèmes proposés et divers additifs (sérumalbumine bovine, diméthyl sulfoxyde (DMSO), tensio-actif...) appropriés entre autre à l'activité ou à la stabilité de l'ADN polymérase thermostable utilisée, peuvent être ajoutés.
MgCl ₂	Le magnésium sous forme de di-cation est un cofacteur essentiel de l'activité de l'ADN polymérase. Il forme un complexe soluble avec les dNTP. Sa concentration finale est donc dépendante des concentrations en dNTP, amorces, sonde et ADN cible. Elle doit être optimisée.
dNTP	Désoxyribonucléosides triphosphates utilisés dans la synthèse d'ADN par l'ADN polymérase. ^b dATP : 2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate dTTP : 2'-deoxythymidine 5'-triphosphate dCTP : 2'-deoxycytidine 5'-triphosphate dGTP : 2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate
Amorces	Oligonucléotides de taille et de séquences déterminées permettant de délimiter la séquence spécifique à amplifier par qPCR.
Polymérase thermostable	Enzyme ou mélange d'enzymes utilisé pour la réaction de polymérisation d'ADN <i>in vitro</i> .
Sondes	Oligonucléotides de taille et de séquences déterminées allant s'hybrider spécifiquement sur une portion de l'amplicon et portant un système de génération de fluorescence conditionné à la reconnaissance du fragment.
^a Selon leur provenance, certains de ces composants peuvent être déjà mélangés dans le tampon de réaction concentré. ^b Un mélange dTTP/dUTP (2'-deoxyuridine 5'-triphosphate) ainsi qu'une enzyme uracyle N glycosylase (UNG) peuvent être utilisés. Tout système équivalent, capable de détruire spécifiquement les amplicons issus de qPCR antérieures, et ce dans le mélange réactionnel, peut être utilisé.	

6.5.3 Solutions de raccordement

La justesse de la mesure par qPCR en temps réel sera garantie par trois niveaux de raccordement. Leur utilisation est décrite dans le paragraphe 11.2 :

- matériau de référence ;
- solutions calibrantes de travail ;
- étalon primaire.

6.5.4 Autres réactifs

Les co-précipitants d'ADN, éventuellement utilisés pour améliorer le rendement de la précipitation au cours de l'extraction de l'ADN ne doivent pas contenir d'activité nucléasique, de séquence homologue aux séquences cibles des tests qPCR ou d'inhibiteur de la qPCR.

6.6 Décontamination des matériels et locaux

Après souillure accidentelle ou non, tout matériel recyclable doit être, soit traité par immersion ou imbibé par exemple dans une solution d'eau de Javel à 1,7 % (v/v) de chlore actif ou d'acide chlorhydrique à 1 % (v/v), ou de détergent.

L'utilisation des UV peut être également adaptée pour la décontamination du petit matériel, des paillasses, voire même de l'ensemble d'une salle, en complément des solutions décontaminantes.

6.7 Traitement et élimination des déchets

Les déchets toxiques doivent être stockés, utilisés et éliminés selon les règles en vigueur.

Il est recommandé que les consommables contaminés par des produits d'amplification soient évacués, voire éliminés dans la journée qui suit leur production.

7 Mode opératoire

7.1 Concentration

Concentrer l'échantillon en filtrant le volume maximal d'échantillon (voir 6.4.2).

Le volume filtré d'échantillon doit être si possible compris entre 50 mL et 1 l. Ce volume doit être pris en compte pour l'expression de la limite de quantification LQ (voir 10.4) et la limite de détection LD (voir 10.5). La réduction du volume filtré a un impact important sur les valeurs de LQ et LD qui augmentent proportionnellement.

7.2 Extraction : Lyse cellulaire et purification de l'ADN

7.2.1 Généralités

Le principe de l'extraction consiste à libérer l'ADN en lysant les micro-organismes, puis (ou en parallèle) à purifier l'ADN en éliminant autant que possible les autres composants, en particulier les inhibiteurs de qPCR. La purification peut être évitée sous réserve que l'absence d'inhibition soit vérifiée (voir 11.6).

Pour lyser les bactéries, de nombreuses méthodes adaptées peuvent être utilisées telles que des méthodes physiques (par exemple, cycle de congélation-décongélation), chimiques (par exemple : tampon au thiocyanate de guanidine) ou biologiques (par exemple : digestion enzymatique).

Quant à la purification d'ADN, elle peut avoir lieu suite à la lyse ou simultanément à cette dernière. Cette purification peut se faire, par exemple, à l'aide du chloroforme et/ou par précipitation fractionnée, avec des solvants tels que l'éthanol, l'isopropanol.

L'ADN purifié doit être remis en suspension dans une solution garantissant la stabilité de l'ADN et la qualité de la qPCR (par exemple un tampon contenant un chélateur de magnésium (EDTA, etc.) ou des protéines (Albumine de Sérum Bovin, etc.).

Les déterminations du nombre d'unités génomes de *Legionella* spp et *Legionella pneumophila* doivent être effectuées à partir du même extrait d'ADN.

7.2.2 Stabilité de l'ADN extrait

Les extraits d'ADN sont conservés à $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ et sont analysés dans la journée ; toute conservation à $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ sur une durée supérieure doit faire l'objet d'une validation. Les extraits non analysés dans la journée seront conservés à une température inférieure à $- 18 ^\circ\text{C}$.

Les extraits d'ADN congelés à une température inférieure à $- 18 ^\circ\text{C}$ sont stables plusieurs mois.

7.3 Amplification de l'ADN par qPCR

7.3.1 Généralités

Les étapes préalables de développement d'essais qPCR passent par le choix et l'optimisation des séquences cibles, amorces et sondes, des paramètres d'amplification (nombre de cycles, température d'hybridation...) et de la composition du mélange réactionnel (dNTP, magnésium, amorces, tampon...). Une fois ces paramètres fixés, les performances de la méthode doivent être évaluées (voir Article 10).

7.3.2 Séquences cibles, amorces et sondes

Une ou plusieurs séquences peuvent être amplifiées afin de détecter et différencier l'ADN provenant de bactéries appartenant au genre *Legionella* et à l'espèce *L. pneumophila*. Ces séquences ne doivent pas être plasmidiques.

La spécificité des amorces et sondes utilisées doit être vérifiée :

- de manière théorique par des recherches d'homologie, à l'aide de logiciels appropriés, dans les principales bases de données telles que : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html>;
<http://www.ebi.ac.uk/embl>

et

- par des essais, sur des souches de *Legionella*, de *L. pneumophila* et des souches de micro-organismes susceptibles de se retrouver dans les mêmes niches écologiques que les *Legionella*. Une liste minimale des souches à tester est donnée en 10.2. Pour les souches n'appartenant pas au genre *Legionella*, aucun produit d'amplification ne doit être détecté par qPCR temps réel.

7.3.3 Protocole

Le principe consiste à amplifier en chaîne sur chaque brin d'ADN dans le sens 5'→3' une séquence cible bornée sur chacun des brins par une amorce complémentaire.

Le mélange réactionnel et l'ADN extrait doivent être mélangés juste avant l'amplification. Afin de prévenir les conséquences d'une contamination accidentelle, les amplifications qPCR peuvent être réalisées à partir de dUTP afin de pouvoir activer une UNG (uracyle N glycosylase) qui dégraderait les traces d'amplicon avant toute nouvelle amplification.

Dans le but d'obtenir des performances optimales (justesse et fidélité), il est conseillé de réaliser plusieurs essais à partir du même extrait d'ADN.

7.4 Détection quantitative

7.4.1 Généralités

Cette détection doit permettre l'identification et la quantification des amplicons spécifiques du genre *Legionella* et/ou spécifiques de l'espèce *L. pneumophila*. Cette quantification sera possible dans l'intervalle (point haut – point bas de la gamme d'étalonnage). Il sera également possible de détecter la présence de la cible sans la quantifier.

La spécificité des qPCR quantitatives doit être assurée par l'utilisation de sondes spécifiques fluorescentes.

Pour assurer la qualité de la détection quantitative, il est nécessaire d'utiliser a), b) :

- a) des gammes étalons externes à l'extrait de l'échantillon (solutions de concentration calibrées en unités génomes de *Legionella pneumophila* amplifiées et étalonnées par comparaison avec l'étalon primaire (voir 11.2) ;
- b) un témoin d'inhibition interne, tel qu'une solution de concentration calibrée de plasmide ou d'oligonucléotide ou d'unités génome de *Legionella pneumophila* co-amplifiée avec l'ADN de l'échantillon. Cette approche permet de mettre en évidence un éventuel effet d'inhibition présent dans l'extrait d'ADN de l'échantillon (voir 11.6).

Concernant la détection (présence ou absence) de la cible il faudra considérer une valeur de Ct supérieure à la valeur de l'intercepte (Ct d'une unité génome Ct 0) comme un échantillon négatif. Le Ct 0 doit être calculé au cours de l'évaluation de la fonction de calibrage (moyenne des interceptes, voir 10.3).

Il est nécessaire d'amplifier les étalons calibrés externes et le témoin d'inhibition par les mêmes amorces que celles utilisées pour l'amplification des séquences cibles de l'échantillon.

Dans les approches a) et b), la quantification est effectuée par interpolation, au sein d'une zone de réponse linéaire de la méthode de quantification de l'ADN. Cette plage de concentration doit être déterminée au préalable (voir 10.3). L'ADN extrait peut, si nécessaire, être dilué afin d'obtenir une concentration située au sein de cette zone de réponse linéaire.

L'amplification doit être réalisée dans un thermocycleur temps réel sur un nombre de cycles suffisant. Ce nombre de cycles ne doit pas être inférieur à la valeur estimée de l'intercepte de la fonction de calibrage (voir 10.3) augmentée de 5.

7.4.2 Protocole

7.4.2.1 Généralités

L'approche suivante peut être utilisée pour une détection/quantification des amplicons.

En cours d'amplification : la mesure s'effectue sur la base du suivi de la qPCR par un signal de fluorescence, avec hybridation d'au moins une sonde marquée interne au fragment amplifié.

Une gamme de calibrage de travail (externe) comprenant au moins quatre niveaux (par exemple : des solutions à 25, 250, 2 500 et 25 000 unités génome de *Legionella pneumophila* par tube réactionnel) est préparée à partir de la solution calibrante de travail (solution commerciale ou solution préparée selon l'Annexe A). Le premier point de la gamme doit être égal à la limite de quantification LQ_{PCR} .

La solution calibrante de travail doit être raccordée à l'étalon primaire ADN de *Legionella* (voir 11.2). Une date limite d'utilisation DLU de cette solution doit être fixée dans les conditions de stockage prévues et vérifiée par le raccordement à l'étalon primaire.

Au minimum à chaque série d'amplifications d'échantillons (mêmes lots de réactifs qPCR, mêmes matériels), analyser cette gamme de calibrage dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les échantillons.

La stabilité du calibrage au sein d'une série et/ou la réutilisation d'une gamme doit être vérifiée par la mesure du matériau de référence à chaque utilisation du thermocycleur (voir 11.3).

AVERTISSEMENT — Plusieurs copies des séquences cibles spécifiques de *Legionella* peuvent être présentes par génome. Dans tous les cas, la concentration des étalons externes ou internes doit être exprimée en unités génome de *Legionella pneumophila* (souche WDCM 00107).

7.4.2.2 Quantification en temps réel

Au-delà de l'intérêt de la détection *in situ* des produits d'amplification, les thermocycleurs en temps réel sont particulièrement adaptés à la qPCR quantitative. En effet, les systèmes de détection utilisés permettent de contourner les limites associées à l'effet plateau, en mesurant directement la quantité d'amplicons produite lors de la phase exponentielle d'amplification. Ces procédés utilisent des systèmes de détection et quantification d'émissions fluorescentes extrêmement sensibles. Le principe actuellement utilisé pour le calibrage est basé sur la quantification par reconnaissance spécifique des amplicons produits à l'aide d'au moins une sonde respectant le principe d'une sonde marquée par un fluorophore. La quantification est basée sur la détermination des CT (« Cycle Threshold ») inversement proportionnels au logarithme décimal du nombre d'unités génomes présentes au départ dans le mélange réactionnel.

NOTE « Cycle Threshold ou Cycle quantification » se traduit en français par « cycle au seuil ou cycle de quantification ».

À titre d'exemple, une méthode de détermination des CT est décrite en Annexe B.

D'autres méthodes mathématiques de détermination des CT peuvent être utilisées. Dans ce cas, la méthode utilisée doit être décrite et son incidence en termes de fidélité de mesure de la droite de calibrage devra être vérifiée selon le protocole d'évaluation de la droite de calibrage (voir 10.3).

7.5 Détection qualitative

Dans le cas d'une détection qualitative, il n'est pas nécessaire de déposer une gamme d'étalons externes. Dans ce cas, une valeur seuil, telle que définie au paragraphe 7.4, pourra être utilisée pour caractériser un échantillon sur l'aspect présence ou absence de la cible (*Legionella pneumophila* ou *Legionella spp*).

8 Expression des résultats

Exprimer le résultat selon le Tableau 2, en nombre d'unités génome (noté UG) de *Legionella spp* et/ou *Legionella pneumophila* par litre d'échantillon (quel que soit le volume d'échantillon d'eau traitée) avec deux chiffres significatifs.

EXEMPLE 12 312 UG/l de *Legionella spp* est exprimé par « 12 000 UG/l de *Legionella spp* »

723 UG/l de *Legionella pneumophila* est exprimé par « 720 UG/l de *Legionella pneumophila* »

Tableau 2 — Expression des résultats pour une analyse quantitative

Nombre d'unités génome par puits	Dilution de l'extrait d'ADN, due à la présence d'inhibiteurs ^a	Résultat (en UG/l)	Conclusion
< 1	Pur	$< \frac{LD_{PCR} \times F}{V}$	<i>Legionella</i> ^b non détectée
	1/5	$< \frac{LD_{PCR} \times 5 \times F}{V}$	Présence d'inhibiteurs ayant nécessité la dilution de l'extrait. <i>Legionella</i> ^b non détectée
Entre 1 et LQ_{PCR}	Pur	$< \frac{LQ_{PCR} \times F}{V}$	Présence de <i>Legionella</i> ^b non quantifiable
	1/5	$< \frac{LQ_{PCR} \times 5 \times F}{V}$	Présence d'inhibiteurs ayant nécessité la dilution de l'extrait. Présence de <i>Legionella</i> ^b non quantifiable
> LQ_{PCR}	Pur	$\frac{x \times F}{V}$	Présence de <i>Legionella</i> ^b
	1/5	$\frac{x \times 5 \times F}{V}$	Présence d'inhibiteurs ayant nécessité la dilution de l'extrait. Présence de <i>Legionella</i> ^b
> C	Pur	$> \frac{C \times F}{V}$	Présence de <i>Legionella</i> ^b non quantifiée ^c
	1/5	$> \frac{C \times 5 \times F}{V}$	Présence d'inhibiteurs ayant nécessité la dilution de l'extrait. Présence de <i>Legionella</i> ^b non quantifiée ^c
<p>où</p> <p>LD_{PCR} est la limite de détection déterminée selon 10.5 ;</p> <p>LQ_{PCR} est la limite de quantification déterminée selon 10.4 ;</p> <p>x est le nombre d'unités génome calculé à partir des mesures ;</p> <p>C est la valeur haute de la gamme de calibrage déterminée selon 10.3 ;</p> <p>F est le facteur multiplicatif (des unités génome par puits aux unités génome par litre) ;</p> <p>V est le volume d'échantillon filtré, exprimé en litre.</p>			
<p>^a La valeur de 1/5 est donnée à titre d'exemple. Le laboratoire peut être amené à diluer l'extrait au 1/10, 1/100 pour éliminer l'effet inhibiteur. Dans certains cas, la dilution ne permet pas de fournir un résultat, le rapport d'essai doit alors mentionner « Présence d'inhibiteurs, résultat inexploitable ».</p> <p>^b Selon le système qPCR, préciser <i>Legionella spp</i> ou <i>Legionella pneumophila</i>.</p> <p>^c Dans ce cas, la quantification peut être réalisée par dilution.</p>			

Un échantillon avec une valeur de CT (correspondant à l'amplification d'une UG) supérieure à la valeur de l'intercepte b (équations 2 en 10.3.4.1) ne sera pas considéré comme positif.

NOTE L'interprétation des résultats des échantillons, des contrôles positifs et négatifs ainsi que des blancs qPCR doit se faire suivant les instructions du fabricant, pour les kits validés tierce partie.

Tableau 3 — Expression des résultats pour une analyse qualitative

Nombre d'unités génome par puits	Dilution de l'extrait d'ADN, due à la présence d'inhibiteurs ^a	Résultat (en UG/l)	Conclusion
< 1	Pur	$< \frac{LD_{PCR}}{V}$	<i>Legionella</i> ^b non détectée
	1/5	$< \frac{LD_{PCR} \times 5}{V}$	Présence d'inhibiteurs ayant nécessité la dilution de l'extrait. <i>Legionella</i> ^b non détectée
>1	Pur	$< \frac{LQ_{PCR}}{V}$	Présence de <i>Legionella</i> ^b
	1/5	$< \frac{LQ_{PCR} \times 5}{V}$	Présence d'inhibiteurs ayant nécessité la dilution de l'extrait. Présence de <i>Legionella</i> ^b
<p>où</p> <p>LD_{PCR} est la limite de détection déterminée selon 10.5 ;</p> <p>V est le volume d'échantillon filtré, exprimé en litres.</p>			
<p>^a La valeur de 1/5 est donnée à titre d'exemple. Le laboratoire peut être amené à diluer l'extrait au 1/10, 1/100 pour éliminer l'effet inhibiteur. Dans certains cas, la dilution ne permet pas de fournir un résultat, le rapport d'essai doit alors mentionner « Présence d'inhibiteurs, résultat inexploitable ».</p> <p>^b Selon le système qPCR, préciser <i>Legionella spp</i> ou <i>Legionella pneumophila</i>.</p>			

Un échantillon avec une valeur de Ct supérieure à la valeur de l'intercept telle que définie en 7.4 sera considéré négatif.

9 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit contenir les indications suivantes :

- la référence au présent document ;
- toutes les informations nécessaires à l'identification et à la description de l'échantillon ;
- la date et les conditions de prélèvement ;
- le volume de l'échantillon traité ;
- les résultats exprimés sous la forme indiquée à l'Article 8 ;
- tout détail opératoire non prévu dans le présent document et susceptible d'avoir agi sur les résultats.

10 Évaluation des performances

10.1 Généralités

L'ensemble des critères de performance décrit ci-dessous de 10.2 à 10.8 doit être évalué pour tout laboratoire ayant conçu son système qPCR. Pour certains critères, des performances minimales sont exigées.

Dans le cas d'une méthode certifiée tierce partie pour l'évaluation des performances se référer à l'Annexe H (normative).

Cette caractérisation doit être faite lors de la mise en place de la méthode et à chaque changement significatif (exemples : changement de kit qPCR, changement de méthode de purification, changement de composition des kits, etc.).

10.2 Inclusivité et exclusivité des sondes et amorces

Les souches citées ci-dessous doivent provenir de collection ou d'échantillons cliniques ou environnementaux et être identifiées.

Les amorces et sondes utilisées doivent donner les résultats attendus (résultat positif pour l'inclusivité, et résultat négatif pour l'exclusivité) 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 UG/puits. Cette quantité doit être estimée sur la suspension bactérienne, par exemple à partir de la mesure de la densité optique à 600 nm. Une densité optique de 0,5 nm à 600 nm correspond à 10^9 bactéries /mL (en considérant 1 bactérie = 1 UG) :

- liste d'inclusivité (micro-organismes à tester pour une méthode *Legionella spp*) : *L. anisa*, *L. birminghamensis*, *L. bozemanii*, *L. cherrii*, *L. cincinnatiensis*, *L. dumoffii*, *L. erythra*, *L. feeleii*, *L. gormanii*, *L. hackeliae*, *L. jordanis*, *L. lansingensis*, *L. longbeachae*, *L. maceachernii*, *L. micdadei*, *L. oakridgensis*, *L. parisiensis*, *L. pneumophila 1 à 15*, *L. sainthelensi*, *L. tucsonensis*, *L. wadsworthii* ;
- liste d'inclusivité (micro-organismes à tester pour une méthode *Legionella pneumophila*) : quinze sérogroupes de l'espèce.

Réaliser les essais d'exclusivité sur des extraits d'ADN contenant au minimum l'équivalent de 10 000 UG / puits. Cette quantité doit être estimée sur la suspension bactérienne, par exemple à partir de la mesure de la densité optique à 600 nm. Une densité optique de 0,5 nm à 600 nm correspond à 10^9 bactéries /ml (en considérant 1 bactérie = 1 UG) :

- liste d'exclusivité (micro-organismes testés reconnus comme n'appartenant pas au genre *Legionella*). Ces souches doivent préférentiellement être retrouvées dans les mêmes niches écologiques que les *Legionella* et/ou être phylogénétiquement proches. Au minimum, la liste suivante doit être testée : *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Clostridium*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium*, *Klebsiella oxytoca*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia* ;
- liste d'exclusivité (micro-organismes testés reconnus comme n'appartenant pas à l'espèce *L. pneumophila*).

En plus des souches d'exclusivité listées ci-dessus, ajouter les espèces suivantes :

- *L. anisa*, *L. birminghamensis*, *L. bozemanii*, *L. cherrii*, *L. cincinnatiensis*, *L. dumoffii*, *L. erythra*, *L. feeleii*, *L. gormanii*, *L. hackeliae*, *L. jordanis*, *L. lansingensis*, *L. longbeachae*, *L. maceachernii*, *L. micdadei*, *L. oakridgensis*, *L. parisiensis*, *L. sainthelensi*, *L. tucsonensis*, *L. wadsworthii* ;

10.3 Étude de la fonction de calibrage de l'étape qPCR quantitative

10.3.1 Généralités

Seul le calibrage de la quantification par qPCR temps réel (sur une gamme d'ADN) est décrit ci-après. Ceci n'exclut pas la possibilité d'appliquer les mêmes règles de caractérisation de la fonction de calibrage à l'ensemble de la méthode, par exemple sur des échantillons d'eau artificiellement contaminés en *Legionelles*.

L'étude de la fonction de calibrage doit être réalisée en utilisant l'étalon primaire ou à défaut, une solution calibrante de travail raccordée à l'étalon primaire (voir 11.2).

Pour l'analyse statistique, les concentrations en unités génome par réaction de qPCR sont exprimées en logarithme décimal.

10.3.2 Principe de vérification de la droite de calibrage

L'expérience a montré que les moyennes des mesures de *CT* obtenues pour différents niveaux du nombre d'unités génome (exprimé en log) pouvaient être représentées suivant un modèle de régression linéaire, c'est-à-dire par une droite d'équation de type : $y = ax + b$.

Lorsque les paramètres de la droite ont été estimés, il est ensuite possible pour une mesure de *CT* obtenue sur un échantillon de calculer, grâce à l'équation de cette droite, le nombre d'unités génome de *Legionella* présentes dans l'extrait (voir 10.3.5).

L'établissement des paramètres nécessite tout d'abord le respect d'un protocole d'évaluation décrit en 10.3.3. Il est suivi d'une analyse statistique des données (voir 10.3.4) qui a plusieurs objectifs :

- 1) établir l'équation de la droite de régression (voir 10.3.4.1) ;
- 2) vérifier l'efficacité (voir 10.3.4.2) ;
- 3) vérifier les performances de la régression linéaire (voir 10.3.4.3).

10.3.3 Protocole d'évaluation de la droite de calibrage

L'évaluation de la fonction de calibrage doit être réalisée en conditions de reproductibilité intermédiaire (*a minima* jours différents et/ou opérateurs différents) (par exemple une gamme par jour sur cinq jours).

Préparer une gamme de p niveaux de concentration d'unités génomes de *Legionella pneumophila* (préparée de préférence à partir de l'étalon primaire et dans tous les cas à partir d'une souche *Legionella pneumophila* WDCM 00107), p étant au moins égal à 4 ; par exemple : à 25, 250, 2 500, 25 000 unités génomes de *Legionella pneumophila* par tube réactionnel. Le premier point de la gamme doit être égal à la limite de quantification (LQ_{PCR}) (voir 10.4). À 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 suivant l'exemple donné dans le Tableau 4 (voir également l'Annexe C.1). Effectuer les calculs indiqués dans le Tableau 3.

Tableau 4 — Mise en forme des résultats et calculs

Niveau x_i	$x_1 = LQ_{PCR}$	$x_2 = 10LQ_{PCR}$	$x_3 = 100LQ_{PCR}$	$x_4 = 1\,000LQ_{PCR}$	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) ;
- $y_{i,j}$ 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) ;
- x'_i est le logarithme décimal de x_i ;
- 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.

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

$$N = k \times p \quad \dots (1)$$

Voir en Annexe C un exemple complet des calculs.

10.3.4 Analyse des résultats

10.3.4.1 Estimation de la droite de régression

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

$$y = CT_{\text{moyen}} = ax' + b \quad \dots (2)$$

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 satisfaisant, procéder aux calculs suivants (voir également l'Annexe C.2) :

$$\sum_{i=1}^p x'_i = k(x'_1 + x'_2 + x'_3 + x'_4 + \dots + x'_p) \quad \dots (3)$$

$$\sum_{i=1}^p x'^2_i = k(x'^2_1 + x'^2_2 + x'^2_3 + x'^2_4 + \dots + x'^2_p) \quad \dots (4)$$

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

$$\text{Variance de } x'_i = \frac{\sum x'^2_i - \frac{\left(\sum x'_i\right)^2}{N}}{N-1} \quad \dots (5)$$

$$\text{Covariance de } x'y = \frac{\sum x'_i \times T_G - \frac{\sum x'_i \times T_G}{N}}{N-1} \quad \dots (6)$$

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

$$a = \frac{\text{covariancede } x'y}{\text{variance de } x'} \quad \dots (7)$$

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

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

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

b est la valeur de l'intercepte nécessaire à l'interprétation des résultats dans le cas d'une détection qualitative (7.4).

10.3.4.2 Estimation et Vérification de l'efficacité

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

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

$$e = \left(10^{\frac{1}{a}} - 1\right) \times 100 \quad \dots (8)$$

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.

10.3.4.3 Vérification des performances de la régression linéaire

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) :

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

où

E_{LIN} (exprimé en Log_{10}) est l'exactitude de linéarité.

Pour ce faire, procéder aux calculs indiqués au Tableau 4 (voir également l'Annexe C.4).

Tableau 5 — 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'_{ij}	$x'_{1,1}$	$x'_{2,1}$	$x'_{3,1}$	$x'_{4,1}$	$x'_{p,1}$
	$x'_{1,2}$	$x'_{2,2}$	$x'_{3,2}$	$x'_{4,2}$	$x'_{p,2}$
	$x'_{1,3}$	$x'_{2,3}$	$x'_{3,3}$	$x'_{4,3}$	$x'_{p,3}$
	$x'_{1,4}$	$x'_{2,4}$	$x'_{3,4}$	$x'_{4,4}$	$x'_{p,4}$
	$x'_{1,k}$	$x'_{2,k}$	$x'_{3,k}$	$x'_{4,k}$	$x'_{p,k}$
$\overline{x'_i} = \frac{\sum x'_{ij}}{k}$	$\overline{x'_1}$	$\overline{x'_2}$	$\overline{x'_3}$	$\overline{x'_4}$	$\overline{x'_p}$
Biais = $\overline{x'_i} - x'_i$	$\overline{x'_1} - x'_1$	$\overline{x'_2} - x'_2$	$\overline{x'_3} - x'_3$	$\overline{x'_4} - x'_4$	$\overline{x'_p} - x'_p$
$s'_i = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^k x'^2_{ij} - \frac{\left(\sum_{j=1}^k x'_{ij}\right)^2}{k}}{k-1}}$	s'_1	s'_2	s'_3	s'_4	s'_p
$E_{\text{LIN}i} = \sqrt{s'^2_i + \left(\overline{x'_i} - x'_i\right)^2}$	$E_{\text{LIN}1}$	$E_{\text{LIN}2}$	$E_{\text{LIN}3}$	$E_{\text{LIN}4}$	$E_{\text{LIN}p}$
$U_{\text{LIN}i} = E_{\text{LIN}i} \times t_{k-2}$	$U_{\text{LIN}1}$	$U_{\text{LIN}2}$	$U_{\text{LIN}3}$	$U_{\text{LIN}4}$	$U_{\text{LIN}p}$
<p>où :</p> <p>x'_i théorique est la valeur déterminée à partir de l'équation $x'_i = \log_{10} x_i$;</p> <p>x'_{ij} est la valeur calculée en utilisant l'équation de la droite de calibrage à partir de la valeur y_{ij} mesurée ;</p> <p>$\overline{x'_i}$ est la valeur moyenne des x'_{ij} ;</p> <p>s'_i est l'écart-type des valeurs x'_{ij} avec $k - 1$ degrés de liberté ;</p> <p>$E_{\text{LIN}i}$ est l'exactitude de linéarité ;</p> <p>$U_{\text{LIN}i}$ est l'incertitude de linéarité élargie ;</p> <p>t_{k-2} log est la valeur lue dans la table de Student pour $k - 2$ degrés de liberté au risque 5 % bilatéral (voir Annexe D).</p>					

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 log, 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 une valeur. En cas de retrait de la valeur du niveau bas (x_1) soit celle du niveau haut (x_p), seule une partie du domaine linéaire est validée.

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).

10.3.5 Utilisation de la droite de calibrage

Pour chaque mesure $y = CT$ d'un échantillon à analyser, utiliser l'équation de la droite de calibrage pour obtenir x' par «calibrage inverse», soit :

$$x' = \frac{y-b}{a} \quad \dots (10)$$

k valeurs de x' sont obtenues k mesures indépendantes du même échantillon sont effectuées.

Calculer la moyenne de x' , soit \bar{x}' , l'écart-type associé s' selon les formules indiquées au Tableau 4.

NOTE Si l'écart-type associé « s' » est supérieur à 0,15, l'incertitude de la mesure sur l'échantillon est supérieure à l'incertitude estimée lors de la caractérisation initiale de la méthode.

Par transformation antilog, exprimer le résultat x en unités génomes par litre selon l'équation (11) :

$$x = 10^{\bar{x}'} \quad \dots (11)$$

10.4 Vérification de la limite de quantification de la qPCR (LQ_{PCR}) et calcul de la LQ théorique de la méthode

10.4.1 Principe

Par convention, la limite de quantification incompressible compte tenu de la dispersion d'échantillonnage (loi de Poisson) est de 25 UG dénombrées sur la totalité des essais qPCR réalisés sur l'échantillon.

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 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 ou égale à la valeur critique de 0,15.

NOTE La valeur de 0,15 est issue de données expérimentales.

10.4.2 Protocole

Préparer k dilutions indépendantes ($k \geq 10$) à la valeur LQ_{PCR} visée, à partir d'une solution d'ADN de *Legionella pneumophila* raccordée à l'étalon primaire (voir 11.2). Quantifier chacune de ces dilutions selon le protocole habituel du laboratoire (en simplicat ou duplicat ou triplicat) dans des conditions de reproductibilité intermédiaire (*a minima* jours différents et/ou opérateurs différents).

10.4.3 Analyse des résultats

Calculer l'écart-type s des valeurs x'_i obtenues par calibrage inverse à partir des k mesures :

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^k x'^2_i - \frac{\left(\sum_{i=1}^k x'_i\right)^2}{k}}{k-1}} \quad \dots (12)$$

où

x'_i est la valeur calculée par calibrage inverse (via les CT mesurés et l'équation de la fonction de calibrage) du \log_{10} du nombre d'unités génome de *Legionella pneumophila* ;

k est le nombre de répétitions de mesures.

Calculer le biais à l'aide de la formule (13) :

$$\text{Biais} = \bar{x}'_i - \log(x) \quad \dots (13)$$

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 :

$$E_{LQ} = \sqrt{s^2 + \left(\bar{x}'_i - \log(x)\right)^2} \quad \dots (14)$$

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. Dans le cas contraire, en rechercher les causes (valeurs trop basses, points aberrantes, etc.).

Calculer l'incertitude au niveau de la limite de quantification (notée U_{LQ}) selon la formule suivante :

$$U_{LQ} = E_{LQ} \times t_{\text{tab}} \quad \dots (15)$$

où

U_{LQ} est l'incertitude au niveau de la limite de quantification ;

t_{tab} est la valeur de la table de Student (au risque 5 %, pour $k-1$ degrés de liberté) (Voir Annexe D).

Un exemple d'estimation d'une LQ_{PCR} à 25 UG mesurée 10 fois est donné dans le Tableau 6.

Tableau 6 — Exemple de vérification d'une solution LQ_{PCR} à 25 UG mesurée 10 fois

	x'_i
LQ 25 UG – essai 1	1,498
LQ 25 UG – essai 2	1,577
LQ 25 UG – essai 3	1,461
LQ 25 UG – essai 4	1,48
LQ 25 UG – essai 5	1,515
LQ 25 UG – essai 6	1,531
LQ 25 UG – essai 7	1,442
LQ 25 UG – essai 8	1,422
LQ 25 UG – essai 9	1,547
LQ 25 UG – essai 10	1,499
$\overline{x'_i}$	1,497
Biais	0,099
s	0,048
E_{LQ}	0,110
U_{LQ}	0,249

Dans cet exemple $E_{LQ} = 0,11$, do $E_{LQ} \leq 0,15$: la limite de quantification à 25 UG est vérifiée.

10.4.4 Limite de quantification théorique de la méthode

La **LQ théorique** de la méthode ou $LQ_{m\acute{e}th}$ (exprimée en unités génome par litre) est obtenue à l'aide de l'équation (16) de la façon suivante :

$$LQ_{m\acute{e}th} = \frac{LQ_{PCR} \times F}{V} \quad \dots (16)$$

où

V est le volume d'échantillon filtré ;

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

IMPORTANT — Cette $LQ_{m\acute{e}th}$. ne tient pas compte du rendement inhérent aux étapes préparatoires.

10.5 Vérification de la limite de détection de la qPCR (LD_{PCR})

10.5.1 Principe

La limite de détection correspond au plus petit nombre d'unités génome générant un résultat positif (une amplification) au seuil de 90 %.

10.5.2 Protocole

Pour limiter le nombre de tests, vérifier que l'on obtient au moins 90 % de résultats positifs pour la valeur LD_{PCR} choisie (par exemple 5 UG/puits). Pour LD_{PCR} choisie, réaliser au minimum 10 mesures à partir de 10 dilutions indépendantes préparées à partir d'une solution d'ADN de *Legionella pneumophila* raccordée à l'étalon primaire (voir 11.2).

10.6 Rendement de la méthode

10.6.1 Principe

L'étude du rendement est effectuée sur des échantillons d'eau stérile (exempte d'ADN de *Legionella*) artificiellement dopés par des dilutions d'une suspension mère constituée à partir d'une souche de *L. pneumophila* (souche WDCM 00107).

Au moins deux niveaux de dopage (dilutions) correspondant par exemple à 1 000 UG/l et 100 000 UG/l doivent être testés. Les niveaux de dopage proviennent de différentes dilutions en cascade de la même suspension mère de dopage.

Au moins 10 échantillons dopés indépendants pour chaque niveau de concentration, 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, etc.).

Effectuer le calcul du rendement par différence de log. (exemple : si le dopage a été effectué avec 1 000 UG soit $\log_{10}(1\ 000) = 3$ et que le résultat final est 500 UG, soit $\log_{10}(500) = 2,7$ le rendement est égal à $2,7 - 3 = -0,3$). 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 %.

10.6.2 Protocole

Pour une série d'essais, constituer une suspension mère à partir de colonies de *Legionella pneumophila* de la souche WDCM 00107 : inoculer stérilement les colonies (5 par exemple) de *L. pneumophila* (WDCM 00107) âgées de moins de 72 h dans un tube contenant 2 mL de tryptone-sel afin d'obtenir une suspension mère contenant théoriquement 10^9 UG/mL. Il est conseillé de vérifier la concentration de la suspension mère par mesure de la densité optique à 600 nm. Une densité optique de 0,5 nm à 600 nm correspond à 10^9 *Legionella* mL. Homogénéiser vigoureusement la suspension mère pendant au moins 30 s.

Effectuer la mesure de la concentration en nombre d'unités génome de la suspension mère par qPCR sur trois lyses directes de la suspension mère : appliquer le protocole de lyse de la méthode (solution de lyse et conditions physiques telles que température, temps, agitation) en parallèle sur trois prises d'essai de la suspension mère (volume minimal de la prise d'essai de 100 μ L) dans le volume habituel de solution de lyse (le ratio entre le volume de solution de lyse et le volume de la prise d'essai doit être au minimum de 3). À l'issue de cette lyse, les trois extraits ADN non purifiés ainsi obtenus doivent être, si besoin, dilués de manière à lever l'inhibition due au réactif de lyse puis être quantifiés par qPCR.

Calculer à partir des trois valeurs obtenues la valeur moyenne exprimée en \log_{10} d'UG/ml (notée A). Cette valeur A sert de référence pour le calcul de rendement.

Constituer en parallèle à partir de la suspension mère des suspensions dopées pour obtenir les niveaux de concentration visés : préparer une gamme de dilution de la suspension mère, par exemple 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 et 1/100000 notés respectivement d1, d2, d3, d4 et d5. Les dilutions sont réalisées en série au 1/10^{ème} dans du tryptone-sel à raison de 9 mL de tryptone-sel et 1 mL de suspension bactérienne. Chaque tube est homogénéisé par agitation mécanique (environ 10 s). Les niveaux de dilution 1/1000 (noté d3) et 1/100000 (noté d5) correspondent respectivement à environ 10⁶ UG/mL et 10⁴ UG/mL. Préparer deux échantillons dopés par inoculation d'un volume de 100 µL minimum noté v_{pe} de deux dilutions choisies, par exemple d3 ou d5 ce qui permet dans ce cas d'obtenir respectivement des quantités de 10⁵ UG et 10³ UG dans le volume d'eau stérile filtré (50 ml à 1 l). Les deux échantillons dopés ainsi obtenus (deux niveaux différents) suivent le protocole de mesure complet (filtration, extraction, purification et mesure) et conduisent à des résultats exprimés en log₁₀ notés *B*.

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

La procédure décrite ci-dessus est à réaliser au moins 10 fois pour chaque niveau de dopage dans des conditions de reproductibilité intermédiaire (*a minima* jours différents et/ou opérateurs différents). À partir des 10 valeurs de rendement individuelles obtenues, calculer, pour chaque niveau, le rendement moyen et son écart-type.

10.6.3 Calculs

Le calcul du rendement sur un échantillon est obtenu selon l'équation (21) :

$$\log_{10}\left(\text{Re } nd_{\text{Echantillon } x}\right) = B - A + D + \log \frac{1\ 000}{v_{pe}} \quad \dots (21)$$

où

$\log_{10}\left(\text{Re } nd_{\text{Echantillon } x}\right)$ 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 log₁₀ du facteur de dilution entre la suspension mère et la suspension de dopage, par exemple *D* vaut 3 pour une dilution au 1/1000ème.

Ces valeurs peuvent être les premières valeurs utilisées pour la mise en place de cartes de contrôle.

Si la valeur obtenue n'est pas dans les limites attendues, il convient d'en rechercher les causes.

Un exemple d'évaluation du rendement est donné en Annexe E.

10.7 Robustesse

La robustesse consiste ici à caractériser l'effet matrice et à vérifier que le rendement n'est pas substantiellement affecté par le type d'eau analysé.

Pour cela, estimer le rendement pour chaque type de matrice rencontré par le laboratoire (par exemple, eaux de tours aéroréfrigérantes, eaux superficielles, eaux usées, etc.) et le suivre dans le temps (cartes de contrôle optionnelles). Appliquer le protocole décrit en 10.6 en remplaçant l'eau stérile par les matrices exemptes de *Legionella pneumophila* (le volume minimal de filtration est de 100 mL). Les limites acceptables sont les mêmes qu'en 10.6.

10.8 Incertitude de mesure sur l'ensemble de la méthode

L'approche décrite dans le présent document est basée sur l'exploitation des valeurs de rendement.

L'incertitude de mesure est estimée à partir du biais et de la variance de reproductibilité intermédiaire.

Le biais est estimé par la valeur du rendement moyen sur l'ensemble des matrices (10.6 et 10.7). La variance de reproductibilité du rendement est estimée en utilisant l'ensemble des valeurs obtenues lors de la validation initiale de la méthode (10.6), de l'étude de robustesse (10.7) et du suivi dans le temps du rendement (11.4).

Seul le rendement de lyse n'est pas inclus dans l'évaluation de l'incertitude. Pour vérifier l'absence de biais de cette étape, il est conseillé de comparer le protocole de lyse du laboratoire à un protocole de lyse disponible dans le commerce.

Une mesure de rendement est obtenue à partir de deux mesures de qPCR (méthode globale et lyse directe). De ce fait, l'évaluation de l'incertitude est surestimée.

Procéder aux calculs indiqués au Tableau 6.

Tableau 7 — Calcul de l'incertitude à partir des valeurs de rendement

Nombre d'échantillons X	Matrice	Niveau testé	$(\text{Rend}_{\text{Echantillon } x})$
X = 1 à n n est le nombre total d'échantillons toutes matrices et tous niveaux confondus	Eaux stériles	Niveau 1 (exemple 1 000 UG / L) Niveau 2 (exemple 100 000 UG/L)	Re nd_x
	Eaux chaudes sanitaires	Niveau 1 Niveau 2	
	Eaux de tour aérorefrigérante	Niveau 1 Niveau 2	
	Etc.	Niveau 1 Niveau 2	
Re nd_{moyen}			$\frac{\sum_{x=1}^n \text{Re } nd_x}{n}$
Variance _{Rend} s^2			$s^2 = \frac{\sum_{x=1}^n \text{Re } nd_x^2 - \frac{\left(\sum_{x=1}^n \text{Re } nd_x\right)^2}{n}}{n-1}$
Incertitude globale élargie $U_{\text{élargie}}$			$U_{\text{élargie}} = 2 \times \sqrt{\text{Re } nd_{\text{moyen}}^2 + s^2}$

Un exemple de calcul de l'incertitude globale est donné en Annexe F.

11 Contrôles qualité et suivi des performances

11.1 Généralités

Les contrôles qualité permettent de garantir la justesse et la fidélité des mesures réalisées par le laboratoire. Les fréquences des contrôles indiquées sont les fréquences minimales à appliquer lors de la mise en routine de ces techniques. L'accumulation de résultats peut permettre la modification de ces fréquences.

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

11.2.1 Principe

La justesse de la mesure par qPCR temps réel sera garantie par trois niveaux d'étalons :

- a) l'étalon primaire ;
- b) une solution calibrante de travail utilisée à chaque série d'amplification d'échantillons ;
- c) un matériau de référence raccordé à l'étalon primaire, utilisé sans dilution comme contrôle externe quantitatif de préférence à chaque série de mesures (voir 11.3) pour éviter de rechercher les causes d'une dérive sur une période de temps importante.

Le raccordement de la solution calibrante de travail à l'étalon primaire ¹⁾ doit être réalisé au minimum une fois par an (voir 11.2.2 et 11.2.3) par le laboratoire utilisateur ou le fabricant de kit commercial validé tierce partie. Ce raccordement doit être effectué à chaque changement de lot de solution calibrante.

Le matériau de référence doit être raccordé à l'étalon primaire lors du raccordement de la solution calibrante de travail (voir Annexe H pour les méthodes validées tierce partie) et conservé aliquoté dans des conditions validées garantissant son homogénéité et sa stabilité. Utiliser le matériau de référence disponible auprès du Centre National de Référence des Légionelles ¹⁾ ou utiliser comme matériau de référence l'un des niveaux d'une solution calibrante de travail après raccordement à l'étalon primaire. Tout matériau de référence doit être utilisé sans dilution.

11.2.2 Protocole

Pour réaliser les opérations de raccordement, la solution calibrante de travail doit être étalonnée avec l'étalon primaire de la manière suivante :

À partir de la solution calibrante de travail à raccorder, préparer au moins trois gammes indépendantes de quatre niveaux (minimum) par dilutions successives ou en cascade, couvrant le domaine de quantification linéaire, dans la solution utilisée pour analyser le blanc qPCR (11.5).

Répéter la même opération à partir de l'étalon primaire.

Les niveaux visés pour ces deux solutions doivent être équivalents. Analyser les deux lots de trois gammes dans la même série d'amplifications (voir 7.4.2.1).

11.2.3 Analyse des données

11.2.3.1 Vérification de l'équivalence des pentes (efficacité qPCR)

Établir par régression linéaire la fonction de calibrage f_1 à partir des valeurs obtenues pour les gammes issues de l'étalon primaire (appelée gamme de référence). Vérifier que la pente a est comprise entre $-4,115$ et $-2,839$ afin que l'efficacité d'amplification soit comprise entre 75 % et 125 %.

Recalculer par calibrage inverse, à partir des CT obtenus, les valeurs en log d'unités génome en utilisant l'équation de la fonction f_1 , sur chacun des niveaux de la solution calibrante. Calculer pour chaque niveau l'écart entre la valeur attendue et la valeur recalculée ce qui correspond à l'erreur de calibrage par niveau. Calculer la valeur absolue de la différence des écarts du point haut et du point bas de la gamme :

- si cette valeur est supérieure à 0,2 log, les pentes et donc les efficacités ne sont pas équivalentes. Le raccordement n'est pas possible ;
- si cette valeur est inférieure ou égale à 0,2 log, les pentes et donc les efficacités sont équivalentes.

1) L'étalon primaire et un matériau de référence sont disponibles auprès du Centre National de Référence des Légionelles (site internet du CNRL).

11.2.3.2 Recalage de la solution calibrante de travail

Si les pentes sont équivalentes, calculer la moyenne des écarts appelée erreur de calibrage moyenne. Si cette moyenne est supérieure en valeur absolue à 0,2 log, refaire par dilution à partir de la solution mère, une solution calibrante juste à la concentration visée (biais égal à zéro). Sinon la correction n'est pas nécessaire, le raccordement est ainsi effectué.

NOTE Le calibrage de la solution calibrante ne peut être extrapolé en dessous ou au-dessus des points de gamme réalisés avec la solution d'étalon primaire.

Un exemple de raccordement de la solution calibrante à l'étalon primaire est donné dans le Tableau 7.

Tableau 8 — Exemple de raccordement de la solution calibrante à l'étalon primaire

Gamme de référence						
Niveau testé (log d'UG)	CT obtenus (cycles)					
log(25)	33,33	34,90	34,68			
log(250)	31,64	31,05	31,18			
log(2500)	27,92	27,99	27,80			
log(25 000)	24,64	24,71	24,60			
Pente	- 3,23					
Ordonnée à l'origine	38,91					
Solution calibrante						
Niveau estimé (log d'UG)	CT obtenus (cycles)			CT moyen par niveau	Quantité retrouvée par niveau	Erreur de calibrage par niveau
log(25)	34,55	34,34	34,62	34,50	1,36	-0,04
log(250)	31,07	30,92	30,80	30,93	2,47	0,07
log(2500)	27,02	27,70	27,73	27,48	3,53	0,13
log(25 000)	24,23	24,49	24,52	24,41	4,48	0,08
Erreur de calibrage moyenne						0,06
Vérification de l'équivalence des pentes (efficacité PCR) :						
Erreur de calibrage $\log(25\ 000) - \log(25)$ = 0,03 - (- 0,01) = 0,04 ≤ 0,2 log ;						
les pentes des deux gammes sont équivalentes, la vérification de calibrage peut être effectuée.						
Recalage de la solution calibrante de travail :						
l'erreur de calibrage moyenne est inférieure ou égale à 0,2 log, aucune correction de calibrage n'est nécessaire pour la solution calibrante.						

L'intérêt d'un étalon primaire et de procéder à un calibrage commun est illustré en Annexe G.

11.2.3.3 Vérification du raccordement du matériau de référence

L'écart maximal toléré sur le matériau doit être inférieur ou égal à 0,2 log.

11.3 Suivi des performances

11.3.1 Suivi des performances de calibrage

Effectuer le suivi :

- de la pente de la droite de calibrage (suivi des valeurs de pente par carte de contrôle moyenne, limites de contrôle, limites de surveillance) ;
- de la valeur quantifiée par calibrage inverse du matériau de référence. Obtenir la valeur de référence $\pm 0,4 \text{ Log}$ (voir 10.3.4.3). Ce contrôle, exprimé en log du nombre d'unités génome, doit être suivi dans le temps comme stipulé dans la norme X 06-030.

NOTE La fréquence de contrôle est à déterminer par le laboratoire ; voir 11.2.1.

11.3.2 Suivi des performances de la limite de quantification

À chaque calibrage, suivre l'écart au modèle linéaire sur le premier point de gamme correspondant à la LQ_{PCR} . La valeur absolue de l'écart doit être inférieure à $2 \times E_{LQ}$. Tout laboratoire pourra resserrer les limites fixées en augmentant le nombre de points de gamme.

11.4 Contrôles positifs et négatifs de la méthode

À titre de contrôle positif, effectuer un contrôle de rendement au minimum une fois par mois selon 10.6. Ce contrôle positif permet de suivre (par exemple, à l'aide de cartes de contrôle) le rendement de la méthode établi lors de la phase d'évaluation des performances (voir 10.6).

Le contrôle négatif de la méthode consiste en l'application de l'ensemble de la méthode à partir d'un volume de 50 mL à 1 l d'eau stérile exempte d'ADN de *Legionella*. Ce contrôle est à effectuer à chaque série d'extractions. Le contrôle négatif de la méthode permet de contrôler l'environnement de travail. Un contrôle négatif avec une valeur de Ct supérieure à la valeur de l'intercepte sera considéré négatif.

11.5 Blanc réactif PCR

À chaque série de mesures, préparer un blanc réactif afin de garantir l'absence de contamination ADN lors de la mise en qPCR.

Le contrôle négatif (11.4) peut être utilisé à cet effet. Néanmoins, la préparation d'un blanc propre à la qPCR permet de détecter les contaminations liées à l'étape de qPCR uniquement, et ainsi éviter de remettre en cause inutilement l'ensemble de la méthode.

Un blanc positif indique une contamination et nécessite une validation particulière de l'essai.

Un blanc avec une valeur de Ct supérieure à la valeur de l'intercepte sera considéré négatif.

11.6 Témoin d'inhibition

11.6.1 Généralités

Il est indispensable d'évaluer la présence d'inhibiteur de la qPCR dans l'extrait d'ADN. Pour ce faire, un témoin d'inhibition doit être ajouté à l'extrait de l'échantillon. Ce témoin d'inhibition est soit la cible elle-même (voir 11.6.2) soit un plasmide ou oligonucléotide (voir 11.6.3).

11.6.2 Le témoin d'inhibition est la cible elle-même

Faire, au minimum, un puits avec l'extrait de l'échantillon (1), un puits avec le témoin seul (2) et un puits avec l'extrait de l'échantillon et le témoin ajouté (3).

La courbe du témoin d'inhibition est la courbe obtenue avec le mélange réactionnel (6.5.2) dans lequel est ajoutée une quantité d'ADN cible connue.

Le test de la présence d'inhibiteurs consiste à comparer les courbes de l'extrait d'échantillon dopé (3) à celle du témoin (2).

Si les pentes ne sont pas parallèles, une inhibition doit être suspectée. Procéder à une dilution de l'extrait ADN de l'échantillon pour confirmer l'inhibition.

Si les pentes en phase exponentielle des courbes (c'est-à-dire les pentes des tangentes au CT) sont parallèles, procéder à l'interprétation selon le Tableau 9.

Tableau 9 — Interprétation du témoin d'inhibition lorsque le témoin est la cible

Extrait de l'échantillon (1)	Témoin (2)	Comparaison de l'extrait de l'échantillon témoin (3) au témoin(2)	Interprétation
CT_1	CT_2	$CT_3 \leq CT_2$	Présence d'ADN de <i>Legionella</i> ou <i>L. pneumophila</i>
CT_1	CT_2	$CT_3 > CT_2$	Inhibition, extrait d'ADN de l'échantillon à diluer jusqu'à obtention de CT cohérents avec l'ajout dosé
Pas d'amplification	CT_2	$CT_3 = CT_2$	Absence d'ADN de <i>Legionella</i> ou <i>L. pneumophila</i> au seuil de détection de la méthode
Pas d'amplification	CT_2	$CT_3 > CT_2$	Inhibition, extrait d'ADN de l'échantillon à diluer jusqu'à obtention de CT cohérents avec l'ajout dosé

où

CT_1 est le cycle au seuil dans le puits avec l'extrait de l'échantillon seul ;

CT_2 est le cycle au seuil dans le puits avec le témoin seul ;

CT_3 est le cycle au seuil dans le puits avec l'extrait de l'échantillon et le témoin.

11.6.3 Le témoin d'inhibition est soit un plasmide ou oligonucléotide

Le témoin d'inhibition est un plasmide ou un oligonucléotide possédant les séquences complémentaires aux amorces utilisées pour amplifier la cible *Legionella spp* ou *Legionella pneumophila*. Ainsi, il sera co-amplifié avec cette dernière. Le Tableau 10 donne l'interprétation qualitative des résultats du témoin d'inhibition.

Tableau 10 — Interprétation du témoin d'inhibition lorsque ce témoin est un plasmide ou un oligonucléotide

Amplification multiplexe		Interprétation
Séquence spécifique de <i>Legionella</i> ou <i>L. pneumophila</i>	Témoin d'inhibition	
+	conforme	Présence d'ADN de <i>Legionella</i> ou <i>L. pneumophila</i>
+	non conforme ^a	Présence d'ADN de <i>Legionella</i> ou <i>L. pneumophila</i> Inhibition partielle ou compétition, extrait d'ADN de l'échantillon à diluer jusqu'à l'obtention d'un témoin d'inhibition positif conforme.
-	conforme	Absence d'ADN de <i>Legionella</i> ou <i>L. pneumophila</i> au seuil de détection de la méthode
-	non conforme ^a	Inhibition totale ou partielle, extrait d'ADN de l'échantillon à diluer jusqu'à l'obtention d'un témoin d'inhibition positif conforme.

^a La non-conformité du témoin d'inhibition peut se traduire par une modification de profil d'amplification ou un décalage de CT .

La méthode d'interprétation du témoin d'inhibition doit être documentée.

Pour les kits commerciaux certifiés tierce partie, se référer aux instructions du fabricant.

Annexe A

(informative)

**Exemple de protocole de réalisation
d'une solution calibrante de travail**

À partir d'une colonie de *Legionella pneumophila* (WDCM 00107) isolée sur milieu sélectif, réaliser une culture en milieu liquide (BCYE) à (36 ± 2) °C.

Mesurer la densité optique (absorbance) à 600 nm. La phase exponentielle de croissance est obtenue pour une valeur de densité optique de $0,5 \pm 0,1$.

Extraire l'ADN selon le protocole du laboratoire.

Après purification de l'ADN et traitement à la RNase (destiné à dégrader l'ARN résiduel) mesurer la quantité et la qualité d'ADN de *Legionella pneumophila* obtenue par lecture de la densité optique à 260 nm et 280 nm.

Le rapport de la densité optique obtenue à 260 nm sur la densité optique obtenue à 280 nm doit être compris entre 1,7 et 2 pour démontrer la qualité de l'ADN extrait. Un rapport de densités optiques inférieur à 1,7 témoigne d'une mauvaise pureté de l'ADN extrait, et au-dessus de 2, la quantité d'ADN est surestimée par des traces d'ARN : l'action de la RNase n'a pas été complète.

Il est possible également de vérifier la qualité et la quantité d'ADN par une migration sur gel avec un marqueur semi-quantitatif.

La concentration de la solution d'ADN (purifiée) est obtenue par l'équation A.1.

$$[\text{ADN}] = \text{DO } 260 / 20 \quad \dots \text{ (A.1)}$$

où

[ADN] est la concentration de la solution d'ADN (purifiée) exprimée en milligrammes par millilitre ;

DO 260 est la densité optique mesurée à 260 nm.

Diluer l'extrait d'ADN pour obtenir le plus haut point de la gamme (160 000 UG/5 µl par exemple soit 688 000 fg d'ADN/5 µL).

Réaliser des dilutions au $1/10^{\text{ème}}$ jusqu'à la valeur de LQ.

Annexe B (informative)

Exemple de méthode de calcul des *CT* et du log d'unités génomes

Le suivi de la qPCR en temps réel est effectué par lecture d'une intensité de fluorescence à chaque cycle. Ce signal est directement proportionnel au nombre d'unités génome présentes dans le puits réactionnel. Le dépassement du bruit de fond est obtenu après un nombre de cycles (correspondant au *CT*) qui dépend du nombre d'unités génome initial.

Dans l'exemple ci-dessous, les points de gammes sont à 30 UG, 300 UG, 3 000 UG et 30 000 UG dans le puits.

En fin de qPCR, les profils ci-dessous sont obtenus (voir Figure B.1).

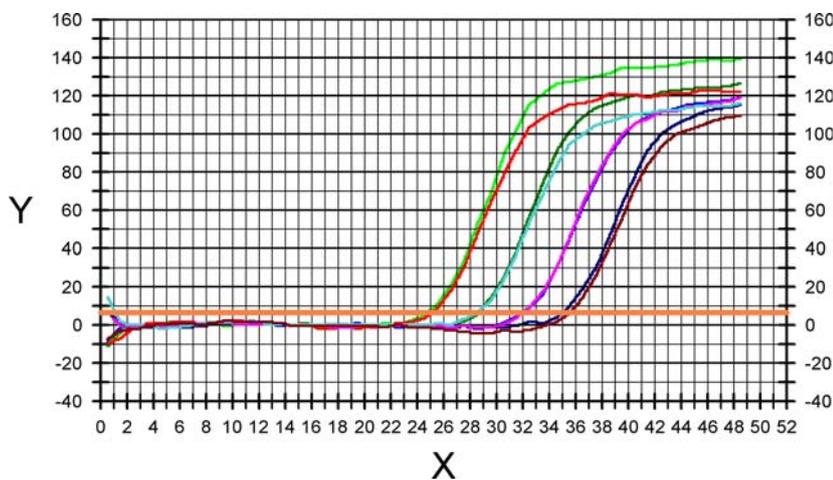


Figure B.1 — Profils obtenus

Le retraitement des données se fait à partir de la gamme de calibration : Pour cela, déterminer la plage de cycles durant laquelle la mesure de fluorescence ne dépasse pas le bruit de fond (sur cet exemple, les 22 premiers cycles) et la position du seuil sur l'échelle de fluorescence (sur cet exemple, à la valeur 6) au bas de la phase exponentielle et au-dessus du bruit de fond.

Le *CT* correspond à la valeur de l'abscisse du point d'intersection de la courbe de fluorescence et du seuil. Ceci correspond à un nombre de cycles.

Il est possible à partir des valeurs des *CT* des points de gammes de tracer la fonction $CT = f(\log(\text{nombre d'unités génome initiales}))$.

Par régression linéaire, l'équation suivante est obtenue (voir également 10.5.4.1) :

$$y = ax' + b \quad \dots \text{(B.1)}$$

où

y est la valeur de *CT* ;

a est la pente de la droite à partir de laquelle l'efficacité PCR e est calculée ;

b est l'ordonnée à l'origine de la droite (*CT* théorique correspondant à l'amplification d'une unité génome) ;

x' est le log du nombre d'unités génome initiales.

La quantification des échantillons inconnus est obtenue en reportant le *CT* de l'échantillon sur la fonction de calibration ce qui revient à appliquer la formule suivante :

$$\text{Nombre d'unités génome initiales} = 10^{[(y-b)/a]} \quad \dots \text{(B.2)}$$

Annexe C

(informative)

**Exemple d'étude de la fonction de calibrage
de l'étape PCR quantitative ²⁾****C.1 Tableaux de données et calculs****Tableau C.1 — Données et calculs**

Niveau x_i	30	300	3 000	30 000	Sommes
$x'_i = \log_{10} x_i$	1,48	2,48	3,48	4,48	
$y_{i,j}$ $k = 5$ répétitions	35,18	31,07	27,27	23,97	
	34,84	31,41	27,58	24,12	
	34,80	31,15	27,36	24,06	
	34,48	31,21	27,52	24,21	
	34,80	31,42	27,55	24,11	
$T_i = \sum_{j=1}^k y_{i,j}$	174,10	156,26	137,28	120,47	$T_G = 588,11$
$m_i = \frac{T_i}{k}$	34,82	31,25	27,46	24,09	
$x'_i T_i$	257,17	387,07	477,34	539,36	$\sum_{i=1}^p x'_i T_i = 1660,94$
où :					
x_i est le nombre d'unités génome de <i>Legionella pneumophila</i> par tube réactionnel ;					
x'_i est le logarithme de x_i ;					
$y_{i,j}$ est la valeur de CT mesurée au niveau i (i varie de 1 à 4) et de rang j (j varie de 1 à 5) ;					
k est le nombre de répétitions par niveau ($k = 5$) ;					
p est le nombre de niveaux, $p = 4$.					

$$N = k \times p = 5 \times 4 = 20$$

selon l'équation (1)

2) Les calculs présentés dans cet exemple ont pu être arrondis afin de faciliter la présentation des données. Dans la pratique, les calculs doivent être effectués sans arrondir les valeurs.

C.2 Estimation de la droite de régression

Calculs des éléments nécessaires :

$$\sum_{i=1}^p x'_i = k(x'_1 + x'_2 + x'_3 + x'_4 + \dots + x'_p) = 5 \times (1,48 + 2,48 + 3,48 + 4,48) = 59,542 \quad \text{selon l'équation (3)}$$

$$\sum_{i=1}^p x'^2_i = k(x'^2_1 + x'^2_2 + x'^2_3 + x'^2_4 + \dots + x'^2_p) = 5 \times (1,48^2 + 2,48^2 + 3,48^2 + 4,48^2) = 202,3363 \quad \text{selon l'équation (4)}$$

Calcul de la pente a :

$$\text{Variance de } x'_i = \frac{\sum x'^2_i - \frac{(\sum x'_i)^2}{N}}{N-1} = \frac{202,3363 - \frac{59,5568^2}{20}}{19} = 1,315 \quad \text{selon l'équation (5)}$$

$$\text{Covariance de } x'y = \frac{\sum x'_i T_i - \frac{\sum x'_i \times T_G}{N}}{N-1} = \frac{1661,39 - \left(\frac{59,5568 \times 588,11}{20}\right)}{19} = -4,732 \quad \text{selon l'équation (6)}$$

$$a = \frac{\text{covariancedex'y}}{\text{variancedex'}} = -3,5974 \quad \text{selon l'équation (7)}$$

Calcul de l'ordonnée à l'origine b :

La droite passe par le point moyen d'abscisse $\bar{x}' = \frac{\sum x'}{N} = \frac{59,5568}{20} = 2,98$ et d'ordonnée

$$\bar{y} = \frac{T_G}{N} = \frac{588,11}{20} = 29,4055$$

$$\text{d'où } \bar{y} = a\bar{x}' + b \text{ et donc } b = \bar{y} - a\bar{x}' = \frac{T_G}{N} - a \frac{\sum x'}{N} = 29,4055 - (-3,5984 \times 2,98) = 40,12$$

L'équation de la droite de régression est la suivante selon l'équation (2) :

$$y = CT_{\text{moyen}} = ax' + b = -3,5974x' + 40,12$$

C.3 Estimation et vérification de l'efficacité

Calculer l'efficacité e selon l'équation (8) :

$$e = \left(10^{\frac{-1}{a}} - 1\right) \times 100 = 89,6\%, \quad e \text{ est compris entre } 75\% \text{ et } 125\%, \text{ l'efficacité est vérifiée.}$$

C.4 Vérification des performances de la régression linéaire

Les performances de la droite de régression sont estimées à l'aide des calculs indiqués au Tableau 4. Les valeurs obtenues sont rassemblées dans le Tableau C.2.

Tableau C.2 — Calculs des biais, exactitudes de linéarité et incertitudes de linéarité

Niveau x_i estimé	30	300	3 000	30 000
x'_i théorique	1,4771	2,4771	3,4771	4,4771
$x'_{i,j}$	1,3728	2,5150	3,5710	4,4881
	1,4673	2,4205	3,4849	4,4464
	1,4784	2,4928	3,5460	4,4631
	1,5674	2,4761	3,5016	4,4214
	1,4784	2,4177	3,4932	4,4492
$\sum_{j=1}^k x'_{i,j}$	7,3644	12,3221	17,5967	22,2682
$\bar{x}'_i = \frac{\sum x'_{i,j}}{k}$	1,4729	2,4644	3,5193	4,4536
Biais = $\bar{x}'_i - x'_i$	-0,0043	-0,0127	0,0422	-0,0235
$s'_i = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^k x'^2_{i,j} - \frac{\left(\sum_{j=1}^k x'_{i,j}\right)^2}{k}}{k-1}}$	0,0690	0,0436	0,0373	0,0244
$E_{LINi} = \sqrt{s'^2_i + (\bar{x}'_i - x'_i)^2}$	0,0691	0,0454	0,0563	0,0339
$U_{LINi} = E_{LINi} \times t_{k-2}$	0,2200	0,1446	0,1792	0,1078
$x_i = 10^{\bar{x}'_i}$	30	291	3 306	28 421

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

Annexe D

(normative)

Table statistique — Loi de Student

Le Tableau D.1 correspond à la loi de Student pour le niveau de risque $\alpha = 5\%$ pour un test bilatéral ($1 - \alpha/2$).

α	0,05
$1 - \alpha/2$	0,975
1	12,706
2	4,303
3	3,182
4	2,776
5	2,571
6	2,447
7	2,365
8	2,306
9	2,262
10	2,228
11	2,201
12	2,179
13	2,160
14	2,145
15	2,131
16	2,120
17	2,110
18	2,101
19	2,093
20	2,086
25	2,060
30	2,042
40	2,021
50	2,009
60	2,000
100	1,984
∞	1,960

Annexe E (informative)

Exemple d'évaluation du rendement

250 µL de suspension mère sont prélevés et mélangés à 1,25 ml de tampon de lyse (volume final de 1,5 ml). Le lysat est ensuite dilué au 1/100^{ème} et 5 µL de cette dilution sont analysés en qPCR.

Les mesures effectuées en PCR sur les trois lyses directes donnent une quantification moyenne de 8 300 UG/5 µL.

La concentration en log d'UG / mL de la suspension mère calculée est :

$$A = \log\left(\frac{8\,300}{5} \times 100 \times 1\,500 \times \frac{1\,000}{250}\right) = 9$$

Pour réaliser les solutions dopées, 250 µL des dilutions d3 (1/1000) ou d5 (1/100 000) de la suspension mère sont inoculés. Par exemple, une quantification qPCR de 1 580 UG inoculés pour le niveau 100 000 UG est obtenue.

$$B = \log(1\,580) = 3,2$$

$$\text{Re } nd_{\text{échantillon}} = 3,2 - 9 + 5 + \log\left(\frac{1\,000}{250}\right) = -0,2$$

Le Tableau E.1 ci-dessous donne des exemples de valeurs de rendements moyens obtenus sur deux niveaux.

Tableau E.1 — Exemple de rendements moyens

Niveau	Rend _{Échantillon}	Rend _{moyen}	Écart-type
100 000 UG / L	- 0,24	- 0,09	0,17
	- 0,02		
	- 0,22		
	- 0,18		
	0,09		
	- 0,10		
	- 0,29		
	0,20		
	- 0,25		
	0,07		
1 000 UG / L	- 0,09	0,12	0,16
	0,18		
	0,33		
	0,08		
	0,37		
	- 0,12		
	0,14		
	0,26		
	- 0,19		
	0,26		

Annexe F (informative)

Exemple d'évaluation de l'incertitude globale

Niveau	Rend _{échantillon}			Rend _{moyen}	Variance
	Eau stérile	Eau chaude sanitaire	Eau de tour aéroréfrigérante		
100 000 UG / L	- 0,24	- 0,37	- 0,30	- 0,218	0,105
	- 0,02	- 0,68	0,14		
	- 0,22	- 0,77	- 0,61		
	- 0,18	- 0,45	- 0,81		
	0,09	- 0,13	- 0,07		
	- 0,10	- 0,59	- 0,38		
	- 0,29	- 0,74	- 0,40		
	0,20	- 0,66	- 0,38		
	- 0,25	- 0,58	- 0,20		
	0,07	- 0,67	- 0,27		
1 000 UG / L	- 0,09	- 0,41	0,18	- 0,218	0,105
	0,18	- 0,42	0,55		
	0,33	- 0,40	- 0,61		
	0,08	- 0,48	- 0,64		
	0,37	0,27	- 0,27		
	- 0,12	- 0,56	- 0,46		
	0,14	- 0,09	0,21		
	0,26	- 0,20	- 0,15		
	- 0,19	- 0,18	- 0,47		
	0,26	- 0,07	- 0,24		

$$U_{\text{élargie}} = 2 \times \sqrt{-0,218^2 + 0,105} = 0,78$$

Annexe G

(normative)

Données d'essais interlaboratoires

L'annexe suivante détermine la fidélité de la méthode de mesure par les résultats d'essais interlaboratoires réalisés entre 2008 et 2014.

Les résultats de quatorze essais interlaboratoires organisés par l'Association Générale des Laboratoires d'Analyses de l'Environnement (AGLAE) sont présentés.

Les matériaux d'essai envoyés étaient des eaux de type « eau chaude sanitaire ». Ces échantillons ont été préparés à partir d'eau de distribution déchlorée puis dopée par des suspensions bactériennes.

Plusieurs souches, parfois en mélange, ont été introduites au cours des différents essais :

- Legionella pneumophila séro groupe 1, Legionella pneumophila séro groupe 6 ;
- Legionella micdadei, Legionella bozemanii, Legionella dumoffi, Legionella anisa.

Une flore interférente pouvait être présente.

Le nombre de laboratoires inscrits variait entre 33 et 41 participants.

Mis en œuvre et exploités sous assurance qualité, conformément aux principes édictés dans la série de norme NF ISO 5725, ces essais ont fourni les résultats suivants (voir Figure G.1).

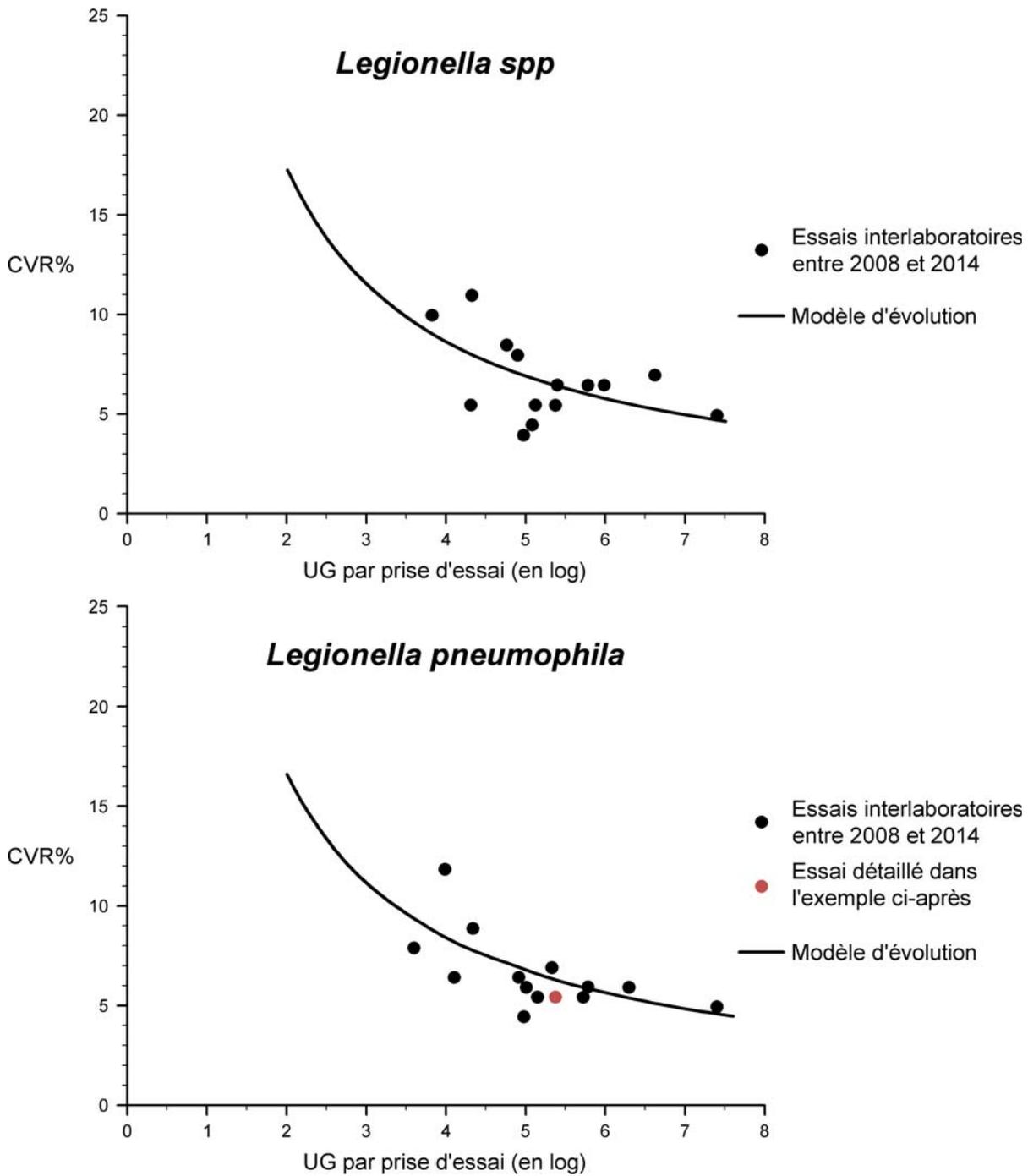


Figure G.1 — Évolution des valeurs de Reproductibilité (CVR%) en fonction du nombre d'UG par prise d'essai (unité log)

Tableau G.1 — Exemple de la fidélité observée lors d'un essai réalisé en septembre 2013

	Niveau de charge bactérienne observé sur le matériau par les laboratoires m^a	Intervalle de confiance à 95 % sur m	Répétabilité ^b	Reproductibilité ^b
Dénombrement de <i>L. pneumophila</i>	$1,98 \times 10^5$	$[1,52 \times 10^5 ; 2,57 \times 10^5]$	2,3	7,1

^a En nombre d'UG par 200 ml.

À noter que 200 ml correspond au volume filtré. Si 1 L avait été filtré, l'unité aurait été en nombre d'UG par litre ; les valeurs de répétabilité et de reproductibilité n'en auraient pas été modifiées.

^b Exprimée sous forme du rapport maximal auquel il faut s'attendre (à 95 %) entre deux résultats provenant de deux laboratoires différents.

Si A et B sont deux résultats provenant de deux laboratoires différents (par convention $A < B$) ; une valeur de 7,1 dans le tableau ci-dessus signifie qu'il y a 95 % de chances pour que $\frac{B}{A} \leq 7,1$.

L'écart-type de dispersion des données après transformation logarithmique ($s_{\text{en log}}$) peut être calculé à partir de cette même valeur (v), à l'aide de la formule suivante ; $s_{\text{en log}} = \frac{\log(v)}{2,8}$; avec $v = 7,1$; $s_{\text{en log}} = \frac{\log(7,1)}{2,8} = 0,30$.

Dans la Figure G.1, le CVR % est représenté en fonction du niveau de charge bactérienne m (en nombre d'UG par prise d'essai) d'après le calcul suivant :

$$\text{CVR}\% = \frac{s_{\text{log}}}{m_{\text{log}}} \times 100$$

Soit pour l'essai cité en exemple, $m_{\text{log}} = \log(198\,000) = 5,297$ et $\text{CVR}\% = \frac{0,30}{5,297} \times 100 = 5,7\%$

Pour toute information supplémentaire :

AGLAE

427 rue des bourelliers

Parc des pyramides

59320 Hallennes Lez Haubourdin

+33 (0)3 20 16 91 40

contact@association-aglae.fr

Contact : Philippe Guarini, Olivier Molinier

Annexe H

(normative)

Évaluation des performances dans le cadre d'une Vérification de méthode validée tierce partie

H.1 Principe

Le protocole de **vérification de méthode** ci-dessous correspond à une validation secondaire de méthode, applicable pour toute implantation de méthode validée tierce partie, dans un laboratoire.

Ce protocole ne peut se substituer aux exigences de l'Article 10 que si et seulement si :

- la méthode implantée a été préalablement certifiée ou validée tierce partie (validation primaire, selon les exigences décrites dans l'Article 10) de manière satisfaisante ;
- et si la méthode validée est mise en œuvre, dans le laboratoire, dans son intégralité (protocole inchangé, même matériel). Dans le cas d'une implantation de la méthode validée tierce partie sur un thermocycleur différent de celui (ceux) utilisé(s) lors de la validation primaire mais appliquant le même thermo-profil, toutes les exigences de l'Article 10 sont applicables, exceptées celles des paragraphes 10.2, 10.6, 10.7 et 10.8.

Dans le cas d'une utilisation de la méthode en détection qualitative, le laboratoire fournisseur d'une méthode validée tierce partie devra ou pourra préciser la valeur de l'intercepte utilisable pour une utilisation en présence/absence.

H.2 Critères de vérification

- Inclusivité / exclusivité : non applicable. Le dossier de validation doit être fourni par le fabricant ;
- évaluation de la droite de calibrage : au moins cinq gammes en condition de reproductibilité intermédiaire ;
- vérification de la LQ_{PCR} : à vérifier sur le premier point (LQ_{PCR}) de cinq gammes de calibrage analysées en condition de reproductibilité intermédiaire ;
- vérification de la LD_{PCR} : vérifier sur une seule concentration cible (LD), à raison de 10 réplicats, sur deux jours (reproductibilité intermédiaire) ;
- rendement : *A minima*, le laboratoire devra mesurer les rendements sur les matrices utilisées dans le laboratoire sur un nombre total d'essais supérieur ou égal à 8. Ces essais doivent être représentatifs des matrices analysées en routine par le laboratoire.
- robustesse : à réaliser selon les exigences du paragraphe 10.6 sur des échantillons d'eau stérile et une matrice complexe rencontrée au laboratoire (exemple TAR alimentée par une eau de surface).

Dans le cas d'une évolution d'un Kit commercial validé tiers partie, les vérifications devront porter sur les paramètres impactés par les modifications.

Le raccordement des solutions calibrantes et du matériau de référence à l'étalon primaire n'est pas à vérifier dans le cadre de l'annexe H.

Bibliographie

- [1] NF T 90-431, *Qualité de l'eau — Recherche et dénombrement de Legionella spp et de Legionella pneumophila — Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation.*
- [2] FD T 90-522, *Qualité de l'eau — Guide technique de prélèvement pour la recherche de legionella dans les eaux.*
- [3] FD X 07-022, *Métrologie et applications de la statistique — Utilisation des incertitudes de mesures : Présentation de quelques cas et pratiques usuelles.*
- [4] FD ISO/TS 21748, *Lignes directrices relatives à l'utilisation d'estimations de la répétabilité, de la reproductibilité et de la justesse dans l'évaluation de l'incertitude de mesure (indice de classement : X 06-067).*
- [5] NF EN ISO 22174, *Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la recherche de micro-organismes pathogènes dans les aliments — Exigences générales et définitions (indice de classement : V 08-410).*
- [6] NF EN ISO/CEI 17025:2005, *Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais (indice de classement : X 50-061).*
- [7] NF ISO 19458, *Qualité de l'eau — Échantillonnage pour analyse microbiologique (indice de classement : T 90-480).*
- [8] Arrêté du 16 juillet 2007 fixant les mesures techniques de prévention, notamment de confinement, à mettre en œuvre dans les laboratoires de recherche, d'enseignement, d'analyses, d'anatomie et cytologie pathologiques, les salles d'autopsie et les établissements industriels et agricoles où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes.
- [9] Arrêté du 18 juillet 1994 fixant la liste des agents biologiques pathogènes (JORF du 30 juillet 1994) modifié par l'arrêté du 17 avril 1997 (JORF du 26 avril 1997) et arrêté du 30 juin 1998 (JORF du 22 juillet 1998).
- [10] An international trial of quantitative PCR for monitoring Legionella in artificial water systems. J.V. Lee et al Journal of Applied Microbiology 110, 2011, 1032–1044.
- [11] Joly *et al.*, Quantitative real-time *Legionella* PCR for environmental water samples: data interpretation. Appl Environ Microbiol. 2006 Apr;72(4):2801-8.
- [12] Morio *et al.*, Real-time PCR assay for the detection and quantification of *Legionella pneumophila* in environmental water samples: utility for daily practice, Int J Hyg Environ Health. 2008 Jul;211(3-4):403-11.
- [13] Wellinghausen *et al.*, Detection of *legionellae* in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR, Appl. Environ. Microbiol., 2001, 67 (9) : 3985-3993.
- [14] Yaradou *et al.*, Integrated real-time PCR for detection and monitoring of *Legionella pneumophila* in water systems. Appl Environ Microbiol. 2007 Mar;73(5):1452-6.