



Application à l'analyse microbiologique de l'eau

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

Révision 0 – Adoptée par AFAQ AFNOR Certification le **26.09.2006**
(suite à l'approbation du groupe de travail de développement)

AFAQ AFNOR Certification

Siège : 11, rue Francis de Pressensé – 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France

Bureaux : 116, avenue Aristide Briand – BP 40 – 92224 Bagneux Cedex 6 – France

Tél +33 (0)1 46 11 37 00 – Fax +33 (0)1 46 11 39 40

certification@afaq.afnor.org - www.afnor.fr

Sommaire

Principe	Page 3
Phase 1 de l'étude (réalisée par le laboratoire expert)	Page 4
- Rendement optimal	Page 4
- LD, LQ	Page 8
- Linéarité	Page 10
Phase 2 de l'étude (réalisée par le laboratoire expert)	Page 17
- Inclusivité et exclusivité des sondes et amorces	Page 17
- Praticabilité	Page 18
Phase 3 de l'étude : étude interlaboratoire	Page 20
- Organisation de la campagne d'essais	Page 20
- Calendrier prévisionnel	Page 21
- Exploitation statistique des données	Page 21
ANNEXE A	Page 22
- Annexe A1 : protocole de test d'homogénéité	Page 22
- Annexe A2 : protocole d'envoi des échantillons	Page 22
- ANNEXE A3 : formulaire de consigne pour la réalisation des essais / fichiers de réponse	Page 23
ANNEXE B : Table statistique - Loi de Fischer	Page 25

Principe

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

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

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

- Phase 1 : Détermination du rendement optimal, LD, LQ, linéarité.
- Phase 2 : inclusivité/exclusivité, praticabilité/qualité des réactifs
- Phase 3 : étude interlaboratoire avec des essais sur solution d'ADN et échantillons d'eau artificiellement/naturellement contaminés

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

- Phase 1 : LD, LQ, linéarité
- Phase 2 (inchangée) : inclusivité/exclusivité, praticabilité/qualité des réactifs
- Phase 3 : étude interlaboratoire avec des essais uniquement sur solution d'ADN (pas d'échantillons dopés avec les bactéries)

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

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

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

Rendement optimal (Cf. §9.6 de la norme XP T90-471)

Le rendement annoncé par le fournisseur (qui doit être supérieur à 25 % selon la norme XP T 90-471) sera comparé aux résultats obtenus et la conformité sera ainsi établie.

Plan d'expérience :

L'étude du rendement est effectuée sur 6 échantillons indépendants, ceci pour trois matrices différentes, à trois niveaux de contamination, soient $6 \times 3 \times 3 = 54$ échantillons.

Les **trois type de matrices** sont les suivantes :

1. une eau minérale témoin (eau d'Evian),
2. une eau chaude sanitaire,
3. une eau de TAR.

Elles devront être exemptes d'acides nucléiques de *Legionella* et artificiellement contaminées par une suspension mère constituée à partir d'une souche de *L. pneumophila* (souche ATCC33152 ou CIP 103854T). Il faut que ces matrices soient au préalable bien caractérisées (caractères physico-chimiques tels que pH, absence de biocides, filtrabilité...) par le laboratoire expert lors de l'étude.

Trois niveaux de contamination correspondant par exemple à 1 000, 10 000 et 100 000 unités génome par litre doivent être testés. Les niveaux de contamination peuvent provenir de la même suspension mère de dopage.

Six échantillons indépendants pour chaque niveau de contamination doivent être analysés dans des conditions de reproductibilité intra-laboratoire (plusieurs jours ou plusieurs techniciens...).

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

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

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

La valeur moyenne (notée en UG/L) calculée à partir des 3 valeurs servira de référence pour le calcul de rendement pour chaque niveau de contamination. Cette valeur servira à déterminer le volume du dopage qui permettra d'obtenir le niveau souhaité (1 000, 10 000 ou 100 000 ug/l par exemple).

Exemple de la procédure à suivre pour le jour 1 (à répéter pour le jour 2 et le jour 3):

Jour 1					
résultats lyse directe sur suspension mère en UG /100µl = suspension 1					
25000	24000	26000	moyenne :	25000	UG/100µl
dilution de la suspension mère par 10 (1 ml + 9 ml eau stérile) = suspension 2					
Déduit par calcul de la concentration de la susp1			titrage :	2500	UG/100µl
dilution de la suspension 2 par 10 (1 ml + 9 ml eau stérile) = suspension 3					
Déduit par calcul de la concentration de la susp1			titrage :	250	UG/100µl
		Résultats de quantification en UG/L			
	ajout de 100 µL de dopage par flacon contenant 250 ml de matrice	Matrice 1	Matrice 2	Matrice 3	
niveau 1=100000 UG/l	suspension 1	80000	75000	88000	
	suspension 1	76000	67000	67000	
niveau 2=10000 UG/l	suspension 2	8000	5600	9000	
	suspension 2	4500	5600	5600	
niveau 3=1000 UG/l	suspension 3	560	670	230	
	suspension 3	800	600	670	
		Résultats de rendement en pourcentage			
moyenne niveau 1	75,5	80	75	88	
		76	67	67	
moyenne niveau 2	63,83	80	56	90	
		45	56	56	
moyenne niveau 3	58,83	56	67	23	
		80	60	67	
		Moyenne matrice 1	Moyenne matrice 2	Moyenne matrice 3	
		69,5	63,5	65,17	

Les échantillons ainsi constitués suivent le protocole de mesure complet et conduisent à des résultats exprimés en UG/L

Le calcul du rendement sur un échantillon est obtenu en divisant le résultat final par la valeur de référence (calculée sur la moyenne des 3 prises d'essai).

Les rendements moyens pour chaque niveau de contamination doivent être calculés ainsi que les écarts types associés.

Un rendement minimal moyen de 25 % doit être obtenu pour chaque niveau de contamination.

Protocole :

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

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

Déterminer à partir de cette valeur le volume du dopage qui permet d'obtenir le niveau souhaité (1 000 UG/l , 10 000 UG/L et 100 000 UG/l par exemple).

Les échantillons ainsi constitués (3 solutions dopées) suivent le protocole de mesure complet et conduisent à des résultats exprimés en UG/l notés *B*.

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

Le calcul du rendement (noté *Rend* en pourcentage) sur un échantillon est obtenu en divisant le résultat final par la valeur de référence (calculée sur la moyenne des 3 prises d'essai) selon l'équation (18) :

$$Rend = \frac{B}{v \times A} \times 100$$

où

Rend est le rendement en pourcentage ;

A est la valeur de référence de la concentration de la suspension mère, en nombre d'unités génome par litre ;

v est le facteur de dilution de la suspension de dopage dans l'échantillon artificiel

B est la valeur mesurée de la concentration de la solution dopée, en nombre d'unités génome par litre.

EXEMPLE pour 1 jour :

les lyses directes de la suspension mère donnent trois valeurs respectives de 25 000 UG, 24 000 UG et 26 000 UG, pour des prises d'essai respectives de 100 µl. La valeur de référence *A* est donc de 25 000 UG pour 100 µl, soit $2,5 \cdot 10^8$ UG/l.

Pour obtenir un échantillon dopé de concentration égale à 100 000 UG/l, il est nécessaire d'injecter un volume de 100 µl de suspension mère dans 250 ml de matrice. L'échantillon ainsi constitué est analysé selon la procédure complète et la valeur mesurée est de 80 000 UG/l.

Le rendement sur cet essai est donc selon la formule ci dessus égal à :

$$(80000 \times 0,25) \times 100 / (10^{-4} \times 2,5 \cdot 10^8) \text{ soit } 80 \text{ \%.}$$

jour 1 préparer une suspension mère

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

diluer la suspension de manière à obtenir 3 niveaux
de charge correspondant à 100 000, 10 000, 1 000 UG/l

préparer 6 flacons par matrice de 250 ml

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

Contaminer 2 flacons avec 100 µL de suspension
de dopage pour obtenir 10 000 UG/l

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

**Ceci doit être réalisé dans les
trois matrices**

Réaliser les extractions sur les 6x3 flacons dopés
+ 3 blancs de matrice (un par matrice) soit 21 extractions

Réaliser les quantifications **après congélation** le jour choisi

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

Ceci conduit à **54 extraits** issus d'un dopage ainsi que **9 blancs** qui doivent être négatifs

Calculer les rendements moyens pour chaque niveau de contaminations ainsi que les écarts-types associés. Un rendement minimal moyen de 25 % doit être obtenu.

LD, LQ

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

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

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

Limite de détection de la PCR (Cf. §9.3 de la norme XP T90-471)

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

Plan d'expérience :

- Utiliser la LD_{PCR} annoncée et la vérifier ;
- Exemple : $LD_{PCR} = 5$ copies dans le puits ;
- analyser ces solutions selon le protocole du fournisseur (nombre de réplicats utilisé en routine) ; Ces 30 mesures peuvent être réalisées par le laboratoire expert dans le même run.

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

Limite de quantification de la PCR (Cf. §9.4 de la norme XP T90-471)

LQ pcr est la limite de quantification de l'étape PCR et LQ meth est la limite de quantification de la méthode complète.

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

La LQ annoncée par le fournisseur doit être vérifiée

La limite de quantification doit correspondre au premier niveau de la gamme d'étalonnage.

L'estimation de la LQ_{PCR} repose sur la largeur de l'intervalle de confiance à 95 % de la mesure au niveau de la LQ_{PCR} .

En d'autres termes, il est nécessaire de fixer une limite basse à ne pas dépasser pour donner une valeur quantifiée du nombre d'unité génome telle que l'incertitude associée ne remette pas en question la valeur elle-même.

L'écart maximum toléré entre la valeur basse de l'intervalle de confiance à 95% et la valeur haute de l'intervalle de confiance à 95% est fixé à 0,5 logarithme décimal.

En conséquence, la formule suivante (1) doit être satisfaite :

$$2 \times t_{tab} \times s \leq 0,5 \quad (1)$$

où

t_{tab} est la valeur de la table de Student (au risque 5 %, pour $k - 1$ degrés de libertés) ;

s est l'écart type des valeurs x'_i obtenues à partir des k mesures.

L'écart-type s est donné par la formule (2) :

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

où

x'_i est la valeur mesurée du log du nombre d'unités génome de *Legionella pneumophila*

k est le nombre de répétitions de mesures

Par exemple, l'écart type estimé sur $k = 30$ valeurs (soit $t_{tab} = 2,045$) doit être inférieur ou égal à 0,122.

Plan d'expérience

Mesurer $k = 30$ fois une solution contenant au minimum $x = 25$ unités génome de *Legionella pneumophila* (solution préparée à partir d'une souche de *Legionella pneumophila* ATCC 33152 ou CIP 103854T).

Calculer l'écart-type s des valeurs x'_i obtenues selon l'équation (2). A partir de la valeur de k , déduire la valeur t_{tab} de la table de Student. Si la largeur de l'intervalle de confiance ($2 \times t \times s$) est inférieure ou égale à 0,5 log, la valeur de x choisie peut être retenue comme la LQ_{PCR} . Sinon, augmenter la valeur de x par exemple de 5 en 5 jusqu'à ce que la formule (1) soit satisfaite.

Calculer ensuite t selon l'équation (3) suivante :

$$t = \frac{|\log x - \overline{x'_i}|}{\frac{s}{\sqrt{k}}} \quad (3)$$

où

x est le nombre d'unités génome de *Legionella pneumophila* dans la solution ;

$\overline{x'_i}$ est la moyenne des valeurs x'_i obtenues.

Si la valeur calculée de t est inférieure à la valeur t_{tab} donnée dans la table de Student au risque 5 % pour $k-1$ degrés de liberté, alors la justesse au niveau de la limite de quantification est considérée comme acceptable.

Selon la table de Student, pour $k = 30$, $t_{tab} = 2,042$.

Limite de quantification théorique de la méthode

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

La **LQ théorique** de la méthode ou $LQ_{méth}$ (exprimée en unités génome par litre) est obtenue à l'aide de l'équation (4) de la façon suivante :

$$LQ_{méth} = \frac{LQ_{PCR} \times F}{V} \quad (4)$$

où :

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

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

Linéarité (Cf. § 9.5 de la norme XP T90-471)

Etude de la fonction d'étalonnage de l'étape PCR quantitative, mise en œuvre et analyse statistique

Généralités

L'étalonnage est difficilement applicable à l'ensemble de la méthode. Seul l'étalonnage de la quantification par PCR 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 d'étalonnage à l'ensemble de la méthode, c'est à dire sur des échantillons d'eau artificiellement contaminés. Pour l'analyse statistique, les concentrations en unités génome par réaction de PCR sont exprimées en logarithme décimal.

Principe de validation de la droite d'étalonnage

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 particulière obtenue sur un échantillon d'estimer, grâce à l'équation de cette droite, le nombre d'unités génome de *Legionella* présentes dans l'échantillon.

L'établissement des paramètres nécessite tout d'abord le respect d'un protocole d'évaluation décrit en 9.5.3. Il est suivi d'une analyse statistique des données qui a plusieurs objectifs :

- 1) établir l'équation de la droite (voir 9.5.4.1 de la norme XP T90-471);
- 2) valider le modèle de régression linéaire (voir 9.5.4.2 de la norme XP T90-471)

Le modèle de régression linéaire est testé par une analyse de la variance ; le fait d'avoir des répétitions pour chaque niveau de concentration permet de décomposer la variabilité totale des mesures de *CT* en trois composantes :

- une composante *REG* qui correspond à la variation linéaire des moyennes de *CT* d'un point à l'autre : c'est la composante de régression qui doit être très élevée ;
- une composante *E* qui correspond à l'écart des observations par rapport au modèle linéaire ; ce terme doit être aussi faible que possible ;
- la composante due à l'erreur analytique instrumentale incompressible ou résiduelle *RES*.

Le test statistique qui permet de tester le modèle est le rapport $F_{calculé}$ de Fisher entre chacune des composantes et la résiduelle ; il est nécessaire que le rapport de la variance de *E* sur la variance de *RES* soit inférieur à la valeur au risque 5 % donnée par la table de la loi de Fisher. Cela signifie que l'écart des observations par rapport au modèle linéaire se situe dans l'intervalle qui contient 95 % des fluctuations aléatoires, donc acceptable. Plus le rapport de la variance de *REG* sur la variance de *RES* est élevé et meilleure est la régression.

3) Valider l'efficacité (voir 9.5.4.3 de la norme XP T90-471)

Lorsque la droite d'étalonnage est validée, estimer l'écart induit par cette méthode entre les valeurs réelles et les valeurs estimées (défaut de justesse) et leur dispersion sur un intervalle à 95 % (fidélité) (voir 9.5.4.4 de la norme XP T90-471).

Protocole d'évaluation de la droite d'étalonnage

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

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

Le premier point de la gamme doit être égal à la limite de quantification (voir 9.4 de la norme XP T90-471). A chaque niveau, faire la mesure sur un nombre total de *k* gammes, *k* étant au moins égal à 5, ces *k* mesures étant considérées comme des répétitions pour l'analyse statistique.

Enregistrer les valeurs $y_{i,j}$ obtenues suivant l'exemple donné dans le tableau 4.

Effectuer les calculs indiqués dans le tableau 4.

Tableau 4 — Mise en forme des résultats et calculs

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

Où

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

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

k est le nombre de répétitions par niveau i

p est le nombre de niveaux et varie de 4 à 6.

Calculer le nombre total de mesures noté N selon l'équation (5)

$$N = k \times p \quad (5)$$

Analyse des résultats

Estimation de la droite de régression :

La droite de régression est donnée par l'équation (6):

$$y = CT_{moyen} = ax' + b \quad (6)$$

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

$$\sum_{i=1}^p x'_i = k(x'_1 + x'_2 + x'_3 + x'_4 + \dots + x'_p) \quad (7)$$

$$\sum_{i=1}^p x'^2_i = k(x'^2_1 + x'^2_2 + x'^2_3 + x'^2_4 + \dots + x'^2_p) \quad (8)$$

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

$$\text{Variance de } x'_i = \frac{\sum x'^2_i - \frac{(\sum x'_i)^2}{N}}{N-1} \quad (9)$$

$$\text{Covariance de } x'y = \frac{\sum x'_i T_i - \frac{\sum x'_i \times T_G}{N}}{N-1} \quad (10)$$

L'estimation de la pente de la droite a est donnée par l'équation (11) :

$$a = \frac{\text{covariancedex'y}}{\text{variancedex'}} \quad (11)$$

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 $\bar{y} = \frac{T_G}{N}$

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

Validation du modèle linéaire :

L'analyse de la variance permet de vérifier si la linéarité de la droite établie (6) est acceptable. Pour ce faire, les éléments de calculs figurant au tableau 4 sont indispensables pour fournir rapidement la réponse. Procéder aux calculs indiqués au tableau 5.

Tableau 5 —Tableau d'analyse de la variance

Somme des carrés des écarts	Nombre de degrés de liberté	Variance	F _{calculé}
$S = \frac{\sum T_i^2}{k} - \frac{T_G^2}{N}$	$p-1$	$\frac{S}{p-1}$	
$REG = a^2 \times \left(\sum x'^2 - \frac{(\sum x')^2}{N} \right)$	1	REG	$\frac{VarianceREG}{varianceRES}$
$E = S - REG$	$p-2$	$\frac{E}{p-2}$	$\frac{varianceE}{varianceRES}$
$T = \sum_{i,j} y_{i,j}^2 - \frac{T_G^2}{N}$	$N-1$	$\frac{T}{N-1}$	
$RES = T - S$	$p(k-1)$	$\frac{R}{p(k-1)}$	

où
 S est la somme des carrés des écarts entre niveaux ;
 REG est la composante de régression (somme des carrés des écarts dus à la régression) ;
 E est l'écart à la linéarité (somme des carrés des écarts dus à l'erreur de modèle) ;
 T est la somme totale des carrés des écarts ;
 RES est la composante résiduelle.

Le test statistique qui permet de tester le modèle est le rapport F_{calculé} de Fisher entre chacune des composantes et la résiduelle :

Si $F_{calculée} = \frac{varianceE}{varianceRES}$ est inférieur à la valeur au risque 5 % donnée par la table de la loi de Fisher pour ($v_1=p-2$, $v_2=p(k-1)$) degrés de libertés (voir annexe), l'écart des observations par rapport au modèle linéaire se situe dans l'intervalle qui contient 95 % des fluctuations aléatoires, donc est acceptable.

Plus la valeur $F_{calculée} = \frac{varianceREG}{varianceRES}$ est élevée et meilleure est la régression.

Si l'écart à la linéarité se révèle significatif à 5 %, la droite calculée (6) n'est pas utilisable, recommencer la procédure complète en réduisant l'étendue du domaine d'étalonnage du côté des faibles valeurs.

Validation de l'efficacité :

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

Calculer l'efficacité e est selon l'équation (12):

$$e = (10^{\frac{1}{a}} - 1) \times 100 \quad (12)$$

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.

Estimation des performances de la droite d'étalonnage

Dans le cas où la droite d'étalonnage est validée (validation du modèle linéaire et de l'efficacité), procéder aux calculs indiqués au tableau 6 afin d'obtenir d'une part l'écart entre les valeurs réelles et les valeurs estimées (défaut de justesse) et leur dispersion sur un intervalle à 95% (fidélité).

Tableau 6 — Calculs des écarts entre valeurs théoriques et valeurs observées

Niveau x_i estimé	x_1	x_2	x_3	x_4	x_p
x'_i théorique	x'_1	x'_2	x'_3	x'_4	x'_p
$x'_{i,j}$	$x'_{1,1}$	$x'_{2,1}$	$x'_{3,1}$	$x'_{4,1}$	$x'_{p,1}$
	$x'_{1,2}$	$x'_{2,2}$	$x'_{3,2}$	$x'_{4,2}$	$x'_{p,2}$
	$x'_{1,3}$	$x'_{2,3}$	$x'_{3,3}$	$x'_{4,3}$	$x'_{p,3}$
	$x'_{1,4}$	$x'_{2,4}$	$x'_{3,4}$	$x'_{4,4}$	$x'_{p,4}$
	$x'_{1,k}$	$x'_{2,k}$	$x'_{3,k}$	$x'_{4,k}$	$x'_{p,k}$
$\sum_{j=1}^k x'_{i,j}$					
$\overline{x'_i} = \frac{\sum x'_{i,j}}{k}$	$\overline{x'_1}$	$\overline{x'_2}$	$\overline{x'_3}$	$\overline{x'_4}$	$\overline{x'_p}$
$s'_i = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^k x'^2_{i,j} - \left(\sum_{j=1}^k x'_{i,j}\right)^2}{k}}$	s'_1	s'_2	s'_3	s'_4	s'_p

$CV_i = \frac{s'_i}{\bar{x}'_i}$		CV_1	CV_2	CV_3	CV_4	CV_5
$\frac{t_{k-2} \times s'_i}{\sqrt{k}}$		$\frac{t_{k-2} \times s'_1}{\sqrt{k}}$	$\frac{t_{k-2} \times s'_2}{\sqrt{k}}$	$\frac{t_{k-2} \times s'_3}{\sqrt{k}}$	$\frac{t_{k-2} \times s'_4}{\sqrt{k}}$	$\frac{t_{k-2} \times s'_p}{\sqrt{k}}$
Intervalle de confiance de x'	$x'_{i \min} = \bar{x}'_i - \frac{t_{k-2} \times s'_i}{\sqrt{k}}$	$x'_{1 \min}$	$x'_{2 \min}$	$x'_{3 \min}$	$x'_{4 \min}$	$x'_{p \min}$
	$x'_{i \max} = \bar{x}'_i + \frac{t_{k-2} \times s'_i}{\sqrt{k}}$	$x'_{1 \max}$	$x'_{2 \max}$	$x'_{3 \max}$	$x'_{4 \max}$	$x'_{p \max}$
$x_i = 10^{\bar{x}'_i}$		x_1	x_2	x_3	x_4	x_p
Défaut de justesse $x_i - x_{i \text{ estimé}}$						
Intervalles de fluctuation de x_i	$\min 10^{x'_{i \min}}$					
	$\max 10^{x'_{i \max}}$					

où

x'_i théorique est la valeur calculée à partir de l'équation $x'_i = \log x_i$;

$x'_{i,j}$ est la valeur calculée en utilisant la droite d'étalonnage à partir de la valeur $y_{i,j}$ mesurée ;

s'_i est l'écart-type des valeurs $x'_{i,j}$ avec $k - 1$ degrés de libertés ;

CV_i est le coefficient de variation sur x'_i (fidélité), exprimé en pourcentage ;

t_{k-2} est la valeur lue dans la table de Student pour $k - 2$ degrés de libertés au risque 5% (voir annexe D) ;

L'intervalle de fluctuation de x_i est obtenu en calculant l'antilog10 de chaque borne $x'_{i \min}$ et $x'_{i \max}$ de l'intervalle de confiance de x'_i .

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

Inclusivité et exclusivité des sondes et amorces

Inclusivité (Cf. XP T90-471 - § 9.2)

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

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

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

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

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

Exclusivité

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

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

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

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

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

Praticabilité

Une étude de praticabilité comportant 18 critères, sera réalisée.

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

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

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

Phase 3 de l'étude : étude interlaboratoire

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

Organisation de la campagne d'essais

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

Phase 1 : EXTRAITS D'ADN

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

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

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

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

Phase 2 : SUSPENSIONS BACTERIENNES

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

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

Phase 3 : ECHANTILLON NATURELLEMENT CONTAMINE

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

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

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

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

Calendrier prévisionnel

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

Les envois seront réalisés par le laboratoire expert

Exploitation statistique des données

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

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

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

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

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

Exprimer les résultats selon la norme ISO 5725.

ANNEXE A

Annexe A1 : protocole de test d'homogénéité

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

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

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

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

Annexe A2 : protocole d'envoi des échantillons

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

EIL ADN

date de réception	
température de stockage	
date d'aliquotage	

système spp

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

n = selon prescriptions du fournisseur

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

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

système pneumophila

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

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

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

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

EIL SUSPENSION

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

méthodologie

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

spp

date de passage en PCR	
------------------------	--

	réplicat n	réplicat n	réplicat n
estimation de l'échantillon A1			
estimation de l'échantillon A2			
estimation de l'échantillon B1			
estimation de l'échantillon B2			

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

pneumophila

date de passage en PCR	
------------------------	--

	réplicat 1	réplicat 2	réplicat 3
estimation de l'échantillon A1			
estimation de l'échantillon A2			
estimation de l'échantillon B1			
estimation de l'échantillon B2			

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

ANNEXE B : Table statistique - Loi de Fischer

La loi de Fischer est présentée dans le Tableau suivant pour un niveau de risque $\alpha = 0,5 \%$ et correspond à la notation $F(v_1, v_2, 1-\alpha)$ où v_1 et v_2 sont les deux degrés de liberté.

	v_1	1	2	3	4	5	6
v_2							
15		4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79
16		4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74
17		4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70
18		4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66
19		4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63
20		4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60
21		4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57
22		4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55
23		4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53
24		4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51
25		4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49
26		4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47
27		4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46
28		4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45
29		4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43
30		4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42
32		4.15	3.29	2.90	2.67	2.51	2.40
34		4.13	3.28	2.88	2.65	2.49	2.38
36		4.11	3.26	2.87	2.63	2.48	2.36
38		4.10	3.24	2.85	2.62	2.46	2.35
40		4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34