



Validation des méthodes d'analyse

Application à la microbiologie des eaux

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

Révision 3 – Adoptée par AFNOR Certification le 23/09/2015
(suite à l'approbation du Bureau technique concerné)

SOMMAIRE

Domaine d'application	3
Principe.....	3
Phase 1 de l'étude (réalisée par le laboratoire expert)	5
1. Raccordement de la solution calibrante et du matériau de référence à l'étalon primaire.....	5
2. Etude de la fonction de calibrage de l'étape PCR quantitative	5
2.1. Protocole d'évaluation de la droite de calibrage.....	5
2.2. Analyse des résultats	6
3. LD, LQ et seuil de positivité	10
3.1. Limite de détection de la PCR	10
3.2. Limite de quantification de la PCR	10
3.3. Limite de quantification théorique de la méthode	11
3.4. Seuil de positivité	12
4. Rendement de la méthode, robustesse et incertitude de mesure	12
4.1. Plan d'expérience	12
4.2. Estimation du rendement.....	14
4.3. Estimation de l'incertitude de mesure.....	16
5. Vérification des calculs et interprétations établis par le logiciel	16
5.1. Vérification des calculs	16
5.2. Interprétation des inhibitions.....	16
Phase 2 de l'étude (réalisée par le laboratoire expert)	17
1. Inclusivité et exclusivité des sondes et amorces	17
1.1. Inclusivité	17
1.2. Exclusivité	17
2. Praticabilité	18
Phase 3 de l'étude : étude interlaboratoire.....	20
1. Organisation de la campagne d'essais.....	20
2. Calendrier prévisionnel	21
3. Exploitation statistique des données.....	21
ANNEXE A	22
Annexe A1 : protocole de test d'homogénéité.....	22
Annexe A2 : protocole d'envoi des échantillons	22
Annexe A3 : formulaire de consigne pour la réalisation des essais/fichiers de réponse	23

Domaine d'application

Ce protocole permet de valider une méthode selon les exigences des normes NF T90-471 et ISO/TS 12869. Il s'applique à la détection et/ou la quantification des Légionelles dans les eaux.

Les méthodes auxquelles s'appliquent ce document sont des **méthodes commerciales** (également appelées « **kits** » dans la norme NF T90-471).

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

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

Principe

L'étude de validation est basée sur les critères, plans d'expérience et modes de calculs définis dans les normes NF T90-471 et ISO/TS 12869, dont les références des paragraphes sont reprises 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 de la méthode à valider, le protocole de l'étude inclura ou non toutes les phases.

Si la méthode à valider **est complète**, c'est à dire qu'elle comprend la partie préparation de l'échantillon, l'étude de validation portera sur les critères suivants :

- Phase 1 : LD, LQ (optionnel pour des kits uniquement dédiés à la détection), fonction de calibrage, raccordement, rendement et robustesse, vérification des calculs des logiciels sur les fonctions quantification et détection
- 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 la méthode PCR à valider **ne comprend pas la partie** préparation de l'échantillon, l'étude de validation portera sur les critères suivants :

- Phase 1 : LD, LQ (optionnel pour des kits uniquement dédiés à la détection), fonction de calibrage, raccordement, vérification des calculs des logiciels sur les fonctions quantification et détection
- 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 la méthode PCR à valider peut être utilisée sur plusieurs **thermocycleurs** :

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

Les demandes de modification sont soumises à l'avis du Bureau technique qui statuera sur le caractère majeur ou mineur de la modification. Le fabricant devra solliciter l'avis d'un laboratoire expert. Cet avis sera présenté au Bureau Technique.

Si des modifications majeures sont apportées à la méthode validée (phase d'extraction, phase d'amplification et phase de quantification), se reporter au tableau ci-dessous pour les critères de performance à revalider au minimum :

Modification	Performances à revalider
Phase d'extraction	Rendement Robustesse
Phase d'amplification (Mix réactionnel - hors sondes / amorces -, thermocycleurs)	LD LQ (optionnel pour des kits uniquement dédiés à la détection) Linéarité Raccordement
Phase de quantification et/ou détection (modification du système sondes / amorces, thermoprofils)	LD LQ (optionnel pour des kits uniquement dédiés à la détection), Linéarité Raccordement Inclusivité, exclusivité

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

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

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

Le raccordement sera réalisé sur un lot.

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

2.1. Protocole d'évaluation de la droite de calibrage

(Cf. § 10.3.3 de la norme NF T90-471)

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

Préparer une gamme de p niveaux. p est le nombre préconisé par le fournisseur, au moins égal à 4, au plus à 6, par exemple, à 25, 250, 2 500, 25 000 unités génome de *Legionella pneumophila* par tube réactionnel. La gamme est préparée à partir d'ADN d'une souche *Legionella pneumophila* WDCM 00107.

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

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

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

$$N = k \times p$$

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

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

Où

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

x'_i est le logarithme décimal de x_i

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

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

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

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

2.2. Analyse des résultats

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

$$a = \frac{\text{covariance } x'y}{\text{variance } x'}$$

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

où

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

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

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

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

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

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

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

3. LD, LQ et seuil de positivité

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.

3.1. Limite de détection de la PCR

(Cf. § 10.5 de la norme NF T90-471)

L'estimation de la limite de détection PCR notée LD_{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) ;
- Réaliser 30 mesures selon le protocole du fournisseur (nombre de réplicats utilisé en routine), à partir de 30 dilutions indépendantes préparées à partir d'une solution d'ADN de *Legionella pneumophila* raccordée à l'étalon primaire. Ces 30 mesures peuvent être réalisées par le laboratoire expert dans le même run.

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

3.2. Limite de quantification de la PCR

(Cf. § 10.4 de la norme NF T90-471)

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

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

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

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

La LQ_{PCR} annoncée par le fournisseur doit être vérifiée. La vérification de la limite de quantification consiste à s'assurer que l'exactitude au niveau de la limite de quantification (notée E_{LQ}) est inférieure à la valeur critique de 0,15.

Plan d'expérience :

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

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

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

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

où

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

k est le nombre de répétitions de mesures

Le biais est donné par la formule :

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

où

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

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

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

où

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

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

3.3. Limite de quantification théorique de la méthode

(Cf. § 10.4.4 de la norme NF T90-471)

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

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

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

où :

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

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

3.4. Seuil de positivité

La limite en terme de Ct ou Cq fixée par le fabricant pour déclarer l'absence ou non détection (seuil de positivité) sera testée par le laboratoire expert par rapport à la LD. Les valeurs de Ct ou Cq obtenues lors de la validation de la LD seront vérifiées comme étant inférieures à la valeur de Ct ou Cq fournie par le fabricant. Pour les kits de quantification, un échantillon avec une valeur de Ct ou Cq supérieure à la valeur de l'intercepte (ordonnée à l'origine de la fonction de calibrage) sera considéré négatif.

4. Rendement de la méthode, robustesse et incertitude de mesure

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

4.1. Plan d'expérience

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

Les trois types de matrices sont les suivantes :

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

Elles devront être exemptes d'acides nucléiques de *Legionella* et artificiellement contaminées par une suspension mère constituée à partir d'une souche de *L. pneumophila* (souche WDCM 00107).

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

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

Pour chaque niveau de concentration et pour chaque matrice, au moins 10 échantillons (2 réplicats par jour x 5 jours) dopés indépendants, d'un volume compris entre 50 mL et 1 L, doivent être analysés dans des conditions de reproductibilité intra-laboratoire (jours différents et/ou opérateurs différents ...).

Pour un essai à un niveau de contamination, il est nécessaire de constituer une suspension de dopage à partir de colonies isolées de la souche WDCM 00107 sur gélose BCYE-L-Cystéine ou GVPC.

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

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

d'essai distinctes. Cette lyse doit être effectuée selon le protocole de lyse habituel sans purification.

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

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

Toutefois les niveaux de dopages demandés devront être respectés et seule la valeur PCR pourra le démontrer.

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

jour 1 préparer une suspension mère

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

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

préparer 4 flacons par matrice de 250 mL

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

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

Ceci doit être réalisé dans les
trois matrices

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

Réaliser les quantifications après congélation le jour choisi

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

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

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

L'extrait ADN ainsi obtenu doit être dilué de manière à lever l'inhibition due au réactif de lyse.

La valeur moyenne calculée à partir des 3 valeurs (notée A et exprimée en \log_{10} d'UG/mL) sert de référence pour le calcul de rendement.

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

Les échantillons ainsi constitués (3 solutions dopées) suivent le protocole de mesure complet et conduisent à des résultats exprimés en \log_{10} d'UG par unité de volume de la suspension mère, notée B .

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

4.2. Estimation du rendement

Le calcul du rendement sera effectué 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 %.

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

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

où

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

A est le \log_{10} 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 \log_{10} de la quantité d'UG par unité de volume de la suspension-mère, mesurée à partir de l'échantillon dopé ayant suivi la méthode dans son intégralité ;

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

Jour 1									
résultats lyse directe sur suspension mère en UG /100µL = suspension 1									
25000	24000		26000	moyenne :		25000	UG/100µL		
dilution de la suspension mère par 10 (1 mL+ 9 mL eau stérile) = suspension 2									
Déduit par calcul de la valeur de la concentration de la susp1				valeur :		2500	UG/100µL		
dilution de la suspension 2 par 10 (1 mL + 9 mL eau stérile) = suspension 3									
Déduit par calcul de la valeur de concentration de la susp1				valeur :		250	UG/100µL		
			Résultats de quantification en UG/L						

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

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

4.3. Estimation de l'incertitude de mesure

L'incertitude de mesure est estimée à partir du biais et de l'écart-type de reproductibilité intermédiaire.

L'incertitude de mesure élargie est calculée de la manière suivante (cf. chapitre 9.8 de la norme NF T90-471) :

$$\text{Incertainude globale élargie : } U_{\text{élargie}} = 2 \times \sqrt{\text{Re}nd_{\text{moyen}}^2 + s^2} \quad (15)$$

5. Vérification des calculs et interprétations établis par le logiciel

5.1. Vérification des calculs

Le laboratoire expert devra présenter tous les calculs de résultats (pentes, interceptes, valeurs recalculées par étalonnage inverse) effectués selon la norme NF T90-471 et par le logiciel du fabricant.

Lorsque des critères de conformité (validité des blancs) sont établis par le logiciel, les calculs doivent être vérifiés par le laboratoire expert.

5.2. Interprétation des inhibitions

Pour le témoin d'inhibition, la vérification sera faite sur un échantillon inhibiteur total par ajout dosé de l'ADN de *L. pneumophila* (de l'ordre de 1 000 unités génome) et dilution successive. Quel que soit le niveau de dilution, aucune sous-estimation (à l'incertitude de mesure près) validée par le logiciel ne sera acceptée.

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

1. Inclusivité et exclusivité des sondes et amorces

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

1.1. Inclusivité

(Cf. NF T90-471 - § 10.2)

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

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

1.2. Exclusivité

Réaliser les essais d'exclusivité sur des extraits d'ADN de façon à obtenir au minimum 10 000 unités génome 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 proches. Au minimum, la liste suivante doit être testée :

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

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

*L. micdadei**L. bozemanii* S2*L. jordanis**L. dunmofii**L. gormanii**L. parisiensis**L. anisa**L. longbeachae* S1*L. tucsonensis*

Le résultat du test d'exclusivité doit être absence de profil d'amplification.

La limite en terme de Ct ou Cq fixée par le fabricant pour déclarer l'absence ou non détection sera testée par le labo expert par rapport à la LD. Pour les kits de quantification, un échantillon avec une valeur de Ct ou Cq supérieure à la valeur de l'intercepte (ordonnée à l'origine de la fonction de calibrage) sera considéré négatif.

2. Praticabilité

Une étude de praticabilité, comportant les 18 critères reportés ci-après, sera réalisée.

Pour chacun de ces critères ont été définis 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 œuvre 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.

	Critères à contrôler	Communication sur le critère	Méthode de contrôle du critère
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 Note : A vérifier lors de l'audit NF Validation
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.

1. 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>	<i>L. bozemanii</i> S2
<i>L. dunmofii</i>	<i>L. gormanii</i>
<i>L. anisa</i>	<i>L. longbeachae</i> S1
<i>L. jordanis</i>	<i>L. tucsonensis</i>
<i>L. parisiensis</i>	<i>L. pneumophila</i> S1

Constitution de 2 échantillons, chacun à 2 concentrations différentes. Les mesures seront faites selon les prescriptions du fournisseur (ex : 3 réplicats 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 d'eau chaude sanitaire filtrable neutralisée, naturellement contaminée en *Legionella pneumophila*, avec une flore associée (cf. NF EN ISO 6222) importante (supérieure à 10⁴ UG/L).

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.

2. Calendrier prévisionnel

Un calendrier sera élaboré en concertation avec les différents laboratoires sélectionnés.

Les envois seront réalisés par le laboratoire expert (cf. annexe A2).

3. Exploitation statistique des données

Cette étude a pour objectif de vérifier la fiabilité de la méthode à valider. 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 ».

Conformément à la norme ISO 5725, 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).

Exprimer les résultats selon la norme ISO 5725.

NOTE Seuls les résultats pour lesquels l'ensemble des contrôles qualité sont conformes au sens de la norme NF T90-471 seront exploités par le laboratoire expert. L'exclusion des résultats d'un laboratoire doit rester exceptionnelle et doit être systématiquement documentée (enquête du laboratoire organisateur auprès du laboratoire collaborateur).

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 $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.

Ces matériaux sont enlevés par transporteur spécialisé le mardi matin. Le transporteur doit garantir une température de $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$, 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 $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.

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 150 µL de solution d'ADN sont envoyés par transporteur spécialisé à $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. 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 $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. 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 ($5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$).

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 courriel 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

	Log du 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	

système pneumophila

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

	Log du 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	

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			
	Log du 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 des échantillons	
écart type des échantillons	

pneumophila

date de passage en PCR			
	Log du 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 des échantillons	
écart type des échantillons	

Fichier de résultat (Excel) pour un essai échantillon naturellement contaminé : voir ci-dessous**EIL ECHANTILLON NATURELLEMENT CONTAMINE**

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			
	Log de 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 des échantillons	
écart type des échantillons	

pneumophila

date de passage en PCR			
	Log du 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 des échantillons	
écart type des échantillons	