Validación del método de cuantificación de Legionella por rtPCR según Norma AFNOR NF T90-471

V Congrés Nacional de Legionel·la i Qualitat Ambiental

Gemma Saucedo Pagès
Laboratorio Microbiología
gsaucedo@agbar.es

Centre de Recerca en Seguretat i Control Alimentari
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

Agbar

Febrero 2013

Índice

1| ISO/IEC 10725:2005

2| Validación del método

3| NF T90-471

4| Control del método

Agbar

ISO/IEC 17025:2005

Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.

- Requisitos relativos a la **gestión** (entre otros):
  - Organización
  - Control de documentos
  - Subcontratación de ensayos y calibraciones
  - Compras de servicios y de suministros
  - Servicios al cliente
  - Control de trabajos de ensayos o de calibraciones no conformes
  - Mejora
  - Acciones correctivas
  - Registros técnicos
  - Auditorías internas

Agbar

ISO/IEC 17025:2005

- Requisitos técnicos (1/3):
  - Generalidades
  - Personal
  - Instalaciones y condiciones ambientales
  - Métodos de ensayo y de calibración y validación de los métodos
  - Generalidades
  - Selección de los métodos
  - Métodos desarrollados por el laboratorio
  - Métodos no normalizados
  - Validación de los métodos
  - Estimación de la incertidumbre de la medición
  - Control de los datos
  - Equipos
  - Trazabilidad de las mediciones

Agbar

ISO/IEC 17025:2005

- Requisitos técnicos (2/3):
  - Generalidades
  - Requisitos específicos
  - Patrones de referencia y materiales de referencia
  - Muestreo
  - Manipulación de los ítems de ensayo o de calibración
  - Aseguramiento de la calidad de los resultados de ensayo y de calibración
  - Informe de los resultados
  - Generalidades
  - Informes de ensayos y certificados de calibración
  - Informes de ensayos
  - Certificados de calibración
  - Opiniones e interpretaciones

Agbar

ISO/IEC 17025:2005

- **Requisitos técnicos (3/3):**
  - **Resultados de ensayo y calibración obtenidos de los subcontratistas**
  - **Transmisión electrónica de los resultados**
  - **Presentación de los informes y de los certificados**
  - **Modificaciones a los informes de ensayo y a los certificados de calibración**

Agbar

Validación del método

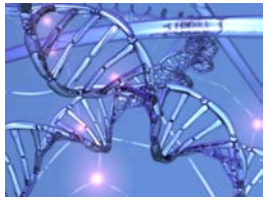
El laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones o modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto.

Es conveniente utilizar una o varias de las técnicas siguientes para la determinación del desempeño de un método:

- **calibración utilizando patrones o materiales de referencia**
- **comparación con resultados obtenidos con otros métodos**
- **comparaciones interlaboratorios**
- **evaluación sistemática de los factores que influyen en el resultado**
- **evaluación de la incertidumbre de los resultados basada en el conocimiento científico de los principios teóricos del método y en la experiencia práctica**

Agbar

NF T90-471



Detección y cuantificación de Legionella y/o Legionella pneumophila por concentración y amplificación génica mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (rtPCR).

Boutique AFNOR pour : AIGUES DE BARCELONA le 26/08/2010 01:09

FA162003

ISSN 0335-3931

norme française

NF T 90-471
Avril 2010

Indice de classement : T 90-471

ICS : 07.100.20

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 (RT — PCR)

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

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

...s droits réservés

Agbar

NF T90-471

Boutique AFNOR pour : AIGÜES DE BARCELONA le 26/08/2010 01:09

Sommaire

Page

Introduction 6

1 Domaine d'application 8

2 Références normatives 8

3 Termes et définitions 8

4 Principe 9

5 Échantillonnage 9

6 Conditions générales de réalisation des essais 9
6.1 Généralités 9
6.2 Personnel 10
6.3 Locaux 10
6.4 Appareillage et consommables hors réactifs 10
6.4.1 Généralités 10
6.4.2 Concentration 10
6.4.3 Extraction, amplification, détection et quantification 10
6.5 Réactifs 11
6.5.1 Généralités 11
6.5.2 Réactifs PCR 11
6.5.3 Solutions de raccordement 12
6.5.4 Autres réactifs 12
6.6 Décontamination des matériaux matériels et locaux 12
6.7 Traitement et élimination des déchets 12

7 Mode opératoire 12
7.1 Concentration 12
7.2 Extraction : Lyse cellulaire et purification de l'ADN 12
7.2.1 Généralités 12
7.2.2 Stabilité de l'ADN extrait 13
7.3 Amplification de l'ADN par PCR 13
7.3.1 Généralités 13
7.3.2 Séquences cibles, amorces et sondes 13
7.3.3 Protocole 13
7.4 Détection quantitative 13
7.4.1 Généralités 13
7.4.2 Protocole 14

8 Expression des résultats 15

9 Rapport d'essai 16

10 Évaluation des performances 16
10.1 Généralités 16
10.2 Inclusivité et exclusivité des sondes et amorces 16
10.3 Étude de la fonction de calibrage de l'étape PCR quantitative, mise en œuvre et analyse statistique 17
10.3.1 Généralités 17
10.3.2 Principe de vé[illegible] 17
10.3.3 Protocole d'évaluation de la droite de calibrage 17
10.3.4 Analyse des résultats 18
10.3.5 Utilisation de la droite de calibrage 21

validación

Boutique AFNOR pour : AIGÜES DE BARCELONA le 26/08/2010 01:09

Sommaire (fin)

Page

10.4 Vérification de la limite de quantification de la PCR (LQ_{PCR}) et calcul de la LQ théorique de la méthode 21
10.4.1 Principe 21
10.4.2 Protocole 21
10.4.3 Analyse des résultats 21
10.4.4 Limite de quan[illegible] 23
10.5 Vérification de l[illegible] 23
10.5.1 Principe 23
10.5.2 Protocole 23
10.6 Rendement de la méthode 23
10.6.1 Principe 23
10.6.2 Protocole 23
10.6.3 Calculs 24
10.7 Robustesse 24
10.8 Incertitude de mesure sur l'ensemble de la méthode 25

11 Contrôles qualité et suivi des performances 26
11.1 Généralités 26
11.2 Raccordement de la solution calibrante et du matériau de référence à l'étalon primaire 26
11.2.1 Principe 26
11.2.2 Protocole 26
11.2.3 [illegible] 26
11.3 [illegible] des performances 28
11.3.1 Suivi des performances de calibrage 28
11.3.2 Suivi des performances de la limite de quantification 28
11.4 Contrôles positifs et négatifs de la méthode 28
11.5 Blanc réactif PCR 28
11.6 Témoin d'inhibition 28
11.6.1 Généralités 28
11.6.2 Le témoin d'inhibition est la cible elle-même 28
11.6.3 Le témoin d'inhibition est soit un plasmide ou oligonucléotide 29

Annexe A (informative) Exemple de protocole de réalisation d'une solution calibrante de travail 30

Annexe B (informative) Exemple de méthode de calcul des *CT* et du log d'unités génomes 31

Annexe C (informative) Exemple d'étude de la fonction de calibrage de l'étape PCR quantitative 32

Annexe D (normative) Table statistique — Loi de Student 35

Annexe E (informative) Exemple d'évaluation du rendement 36

Annexe F (informative) Exemple d'évaluation de l'incertitude globale 37

Annexe G (normative) Données d'un essai interlaboratoires 38

Annexe H (normative) Évaluation des performances dans le cadre d'une vérification de méthode validée tierce partie 41

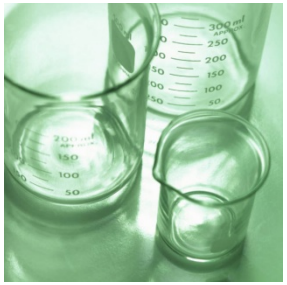
Bibliographie 42

validación

control de calidad

Agbar

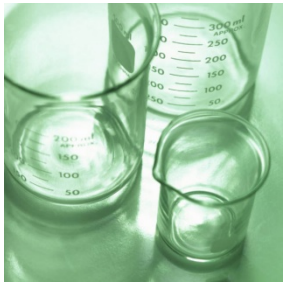
Validación del método



1. Inclusividad y exclusividad de los *primers* y sondas.
2. Principio de verificación de la recta de calibración.
3. Protocolo de evaluación de la recta de calibración.
4. Estimación de la recta de calibración.
5. Estimación y verificación de la eficacia.
6. Verificación de la exactitud de la linealidad.
7. Verificación del límite de cuantificación de la PCR y cálculo teórico del límite de cuantificación del método.
8. Verificación del límite de detección del método.
9. Rendimiento del método.
10. Robustez del método.
11. Incertidumbre del método.

Agbar

Validación del método



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.

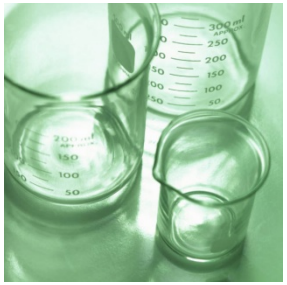
Réaliser les essais d'inclusivité sur des extraits d'ADN de façon à obtenir environ 100 UG/puits. Cette quantité doit être estimée sur la suspension bactérienne, par exemple à partir de la mesure de la densité optique à 600 nm. Une densité optique de 0,5 nm à 600 nm correspond à 10^9 bactéries /mL :

— 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.

Agbar

Validación del método

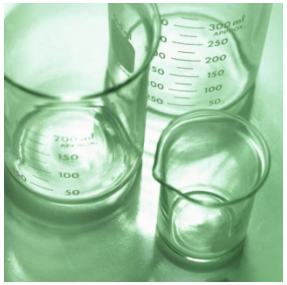


Réaliser les essais d'exclusivité sur des extraits d'ADN contenant au minimum l'équivalent de 10 000 UG / puits. Cette quantité doit être estimée sur la suspension bactérienne, par exemple à partir de la mesure de la densité optique à 600 nm. Une densité optique de 0,5 nm à 600 nm correspond à 10^9 bactéries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

— 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 maltophila.*

Agbar

Validación del método



Paper - TIB-Molbiol & ROCHE -Lspp - v-11 - revisio final.pdf (PROTEGIDO) - Adobe Reader

Archivo Edición Ver Documento Herramientas Ventana Ayuda

1 / 2 105% Buscar

CSB Consorci Sanitari de Barcelona

Agència de Salut Pública

Servei de Microbiologia del Laboratori de l'Agència de Salut Pública de Barcelona

Verificació del comportament de la reacció de PCR en Temps Real per a la detecció de *Legionella spp.* que s'obté a partir dels productes Tib-Molbiol *LightMix® Kit Legionella spp.* i Roche *LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe* respecte als criteris d'inclusivitat i exclusivitat de l'apartat 10.2 i a l'annex A de la norma AFNOR NF T 90-471:2010.

Condicions d'assaig

1. Soques i inòculs

D'una banda els microorganismes que es van assajar per a verificar la inclusivitat de la reacció de PCR s'indiquen a la Taula 1 i foren assajats a 100 UG per reacció. D'una altra banda els microorganismes que es van assajar per a verificar la exclusivitat s'indiquen a la Taula 2 i foren assajats a 10000 UG per reacció.

2. Reacció de PCR en Temps Real

La reacció es va preparar a partir dels components dels productes Tib-Molbiol *LightMix® Kit Legionella spp.* i Roche *LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe* seguint les instruccions de manipulació descrites als protocols dels fabricants (Tib-Molbiol versió 090629 i Roche versió de gener de 2006). Aquesta reacció té un volum final de mescla de reacció de 15 µl i 5 µl de mostra.

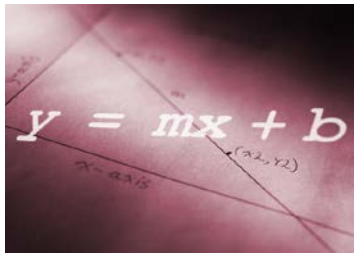
3. Condicions de PCR en Temps Real

Els assaigs es van dur a terme en un termociclador Roche *LightCycler* 2.0 mitjançant la versió 4.0 del software de control. Es van assajar 2 programacions de termociclat. Un dels programes fou el que està descrit a les instruccions del producte Tib-Molbiol versió 090629 que consisteix en 50 cicles d'amplificació amb una temperatura final d'anellament a 55ºC però amb un gradient en els 15 cicles inicials des de 62ºC fins a 55ºC. L'altre programa es basà en el descrit anteriorment però eliminant el gradient inicial de temperatura, és a dir, 50 cicles d'amplificació amb 55ºC com a única temperatura d'anellament.

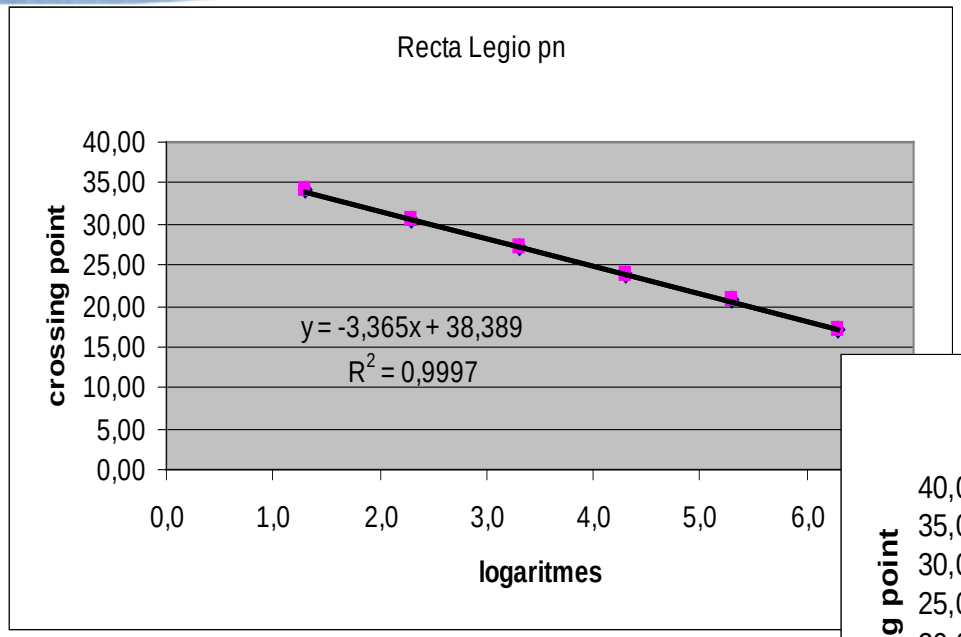
L'anàlisi de resultats es va realitzar mitjançant el mode automàtic de detecció qualitativa aplicant la compensació de

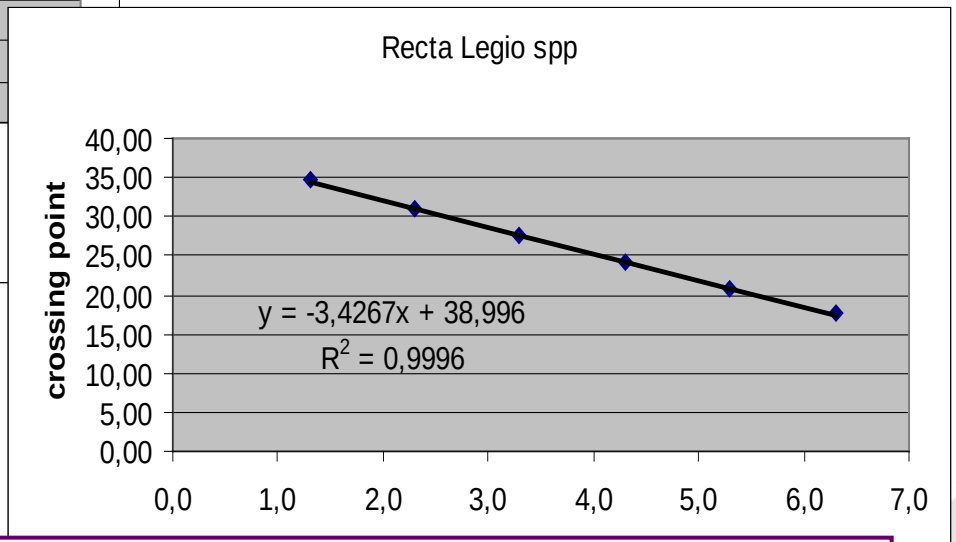
Agbar

Validación del método



Recta de calibración



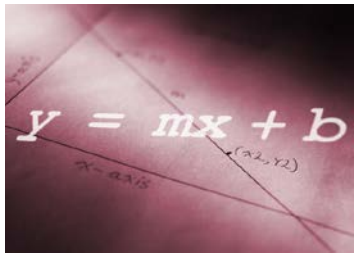


La pente *a* doit être comprise entre – 4,115 et – 2,839, afin que *e* soit compris entre 75 % et 125 %.

Agbar

Validación del método

Recta de calibración



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) :

$$E_{LIN} \leq 0,15 \qquad \text{... (9)}$$

où :

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

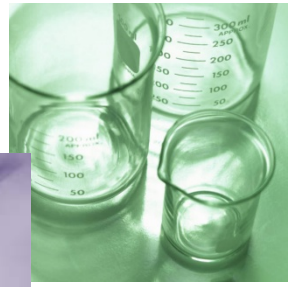
	Nº còpies (x_i)	20	200	2.000	20.000	200.000	2.000.000
	(x_i') = log (x_i)	1,30	2,30	3,30	4,30	5,30	6,30
$x'_{i,j}$	Assaig 1	1,14	2,28	3,32	4,30	5,30	6,32
	Assaig 2	1,29	2,22	3,29	4,31	5,17	6,31
	Assaig 3	1,31	2,30	3,33	4,30	5,28	6,30
	Assaig 4		2,33	3,37	4,29	5,26	6,31
	Assaig 5	1,29	2,36	3,35	4,30	5,29	6,33
	k_i =	4	5	5	5	5	5

2. CÀLCUL DE L'EXACTITUD DE LINEALITAT (E_{LIN})

$E_{LIN_i} = \sqrt{s_i'^2 + \left(\overline{x_i'} - x_i'\right)^2}$	0,09	0,05	0,04	0,01	0,07	0,02

Agbar

Validación del método



Rendimiento

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 %.

Robustez

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.

Incertidumbre

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

Agbar

Aigües de Barcelona
LABORATORIS AB

Rendimiento

GRÀFICA DE CONTROL (RECUPERACIÓ mètodes biologia molecular)

Paràmetre	Legionella spp	PNT	MA/M-34	Unitats	UG/l
Soca referència	Soca: Legionella spp	Soca reserva	Criovials varis		

DESEMBRE 2011 NOU EXTRACTOR

Mesura	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Lectura (d)	-0,5850	-0,5607	-0,0803	-0,1387	0,4351	0,4283	0,5250	0,5190	-0,0663	-0,1591	0,1555	-0,2299	-1,1790	-1,1809	-0,2639
Vref (promig)	12.000	12.000	746	746	94	94	8.657	8.657	3.029	3.029	309	309	2.280.000	128.000	617
Vmètode	3.120	3.300	620	542	256	252	29.000	28.600	2.600	2.100	442	182	151.000	8.440	336
Vref (log)	4,08	4,08	2,87	2,87	1,97	1,97	3,94	3,94	3,48	3,48	2,49	2,49	6,36	5,11	2,79
Vmètode (log)	3,49	3,52	2,79	2,73	2,41	2,40	4,46	4,46	3,41	3,32	2,65	2,26	5,18	3,93	2,53
Data	03-10-11	03-10-11	03-10-11	03-10-11	03-10-11	03-10-11	20-10-11	20-10-11	20-10-11	20-10-11	20-10-11	20-10-11	13-12-11	13-12-11	26-01-12
Inicials	GSP	GSP	GSP	GSP	GSP	GSP	GSP	GSP	GSP	GSP	GSP	GSP	GSP	GSP	GSP

Mesura	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Lectura (d)	-0,0660	0,3819	0,3654	-1,0969	-0,7175	-1,0414	-0,3477	-0,3548	-0,7966	-0,8159					
Vref (promig)	617	22	244	1.200.000	1.200.000	11.000	11.000	11.000	14400	14400					
Vmètode	530	53	566	96.000	230.000	1.000	4.940	4.860	2300	2200					
Vref (log)	2,79	1,34	2,39	6,08	6,08	4,04	4,04	4,04	4,16	4,16					
Vmètode (log)	2,72	1,72	2,75	4,98	5,36	3,00	3,69	3,69	3,36	3,34					
Data	26-01-12	21-02-12	15-03-12	17-04-12	17-04-12	08-05-12	08-05-12	08-05-12	27-06-12	27-06-12					
Inicials	GSP	GSP	GSP	GSP	GSP	GSP	GSP	GSP	GSP	GSP					

DADES DE VALIDACIÓ

Valor Central:	$\bar{d} =$	-0,1700
	REC (%)	67,6
INCERTESA EXP.	$U =$	1,2300

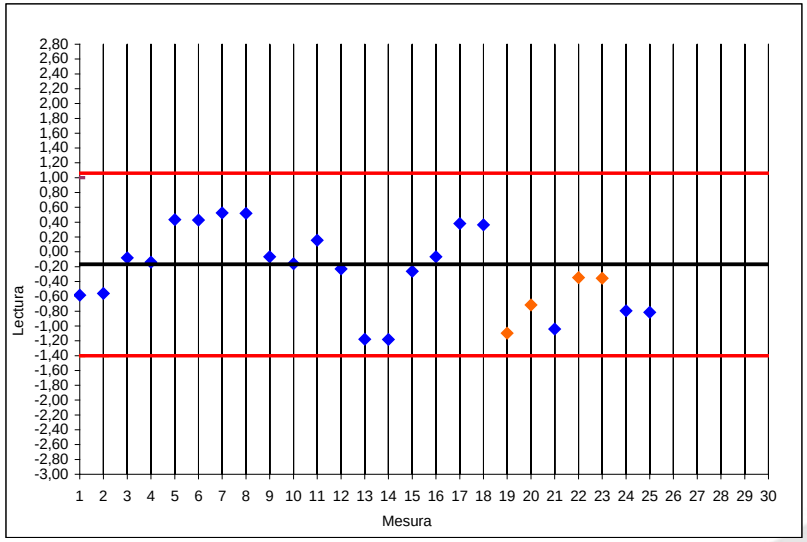
RESULTATS FULL n=30

$\bar{d} =$	-0,2748
REC (%)	53,1
$S_d =$	0,5517

LIMITS D'ALERTA I REBUIG

LRS	$\bar{d} + U$	1,0600
LRI	$\bar{d} - U$	-1,4000

Objectiu validació Rec 25-199%



OBSERVACIONS

Les soques de Legionella van variant
matriu aigua pous

G-17_05.r2

Agbar

Control de calidad

1. Controles positivos y negativos del método
2. Blanco de reactivos
3. Control de inhibición

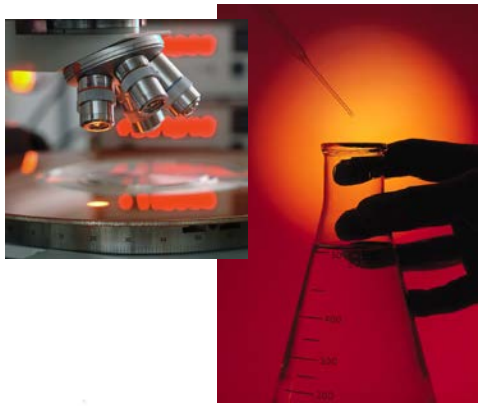
Blanco de filtración

Rendimiento

Data PCR	Self Test LightCycler	Conc. Estàndards	CT Estàndards		Pendent recta	Compliment criteri	Blanc reactius PCR
30-5-12	OK	3,3	28,89	28,81	-3,4393	Sí	Negatiu
30-5-12	OK	4,3	25,84	25,59	-3,4138	Sí	Negatiu
31-5-12	OK	3,3	28,85	29,12	-3,4406	Sí	Negatiu
11-6-12	OK	6,3	21,93	21,95	-3,4001	Sí	Negatiu
14-6-12	OK	6,3	20,02	20,07	-3,3245	Sí	Negatiu
14-6-12	OK	5,3	23,68	23,73	-3,3569	Sí	Negatiu
21-6-12	OK	2,3	32,64	32,39	-3,4615	Sí	Negatiu
28-6-12	OK	6,3	19,00	18,96	-3,3680	Sí	Negatiu
2-7-12	OK	2,3	32,82	31,96	-3,4585	Sí	Negatiu
2-7-12	OK	1,3	37,23	36,24	-3,5097	Sí	Negatiu

Agbar

Control de calidad



Control de inhibición

Qualitative Detection

Settings

Channel	705/Back 530	Color Compensation	101005 CCC Legionella spp [530, 640, 705]
Progam Name	quantificacio		

Results

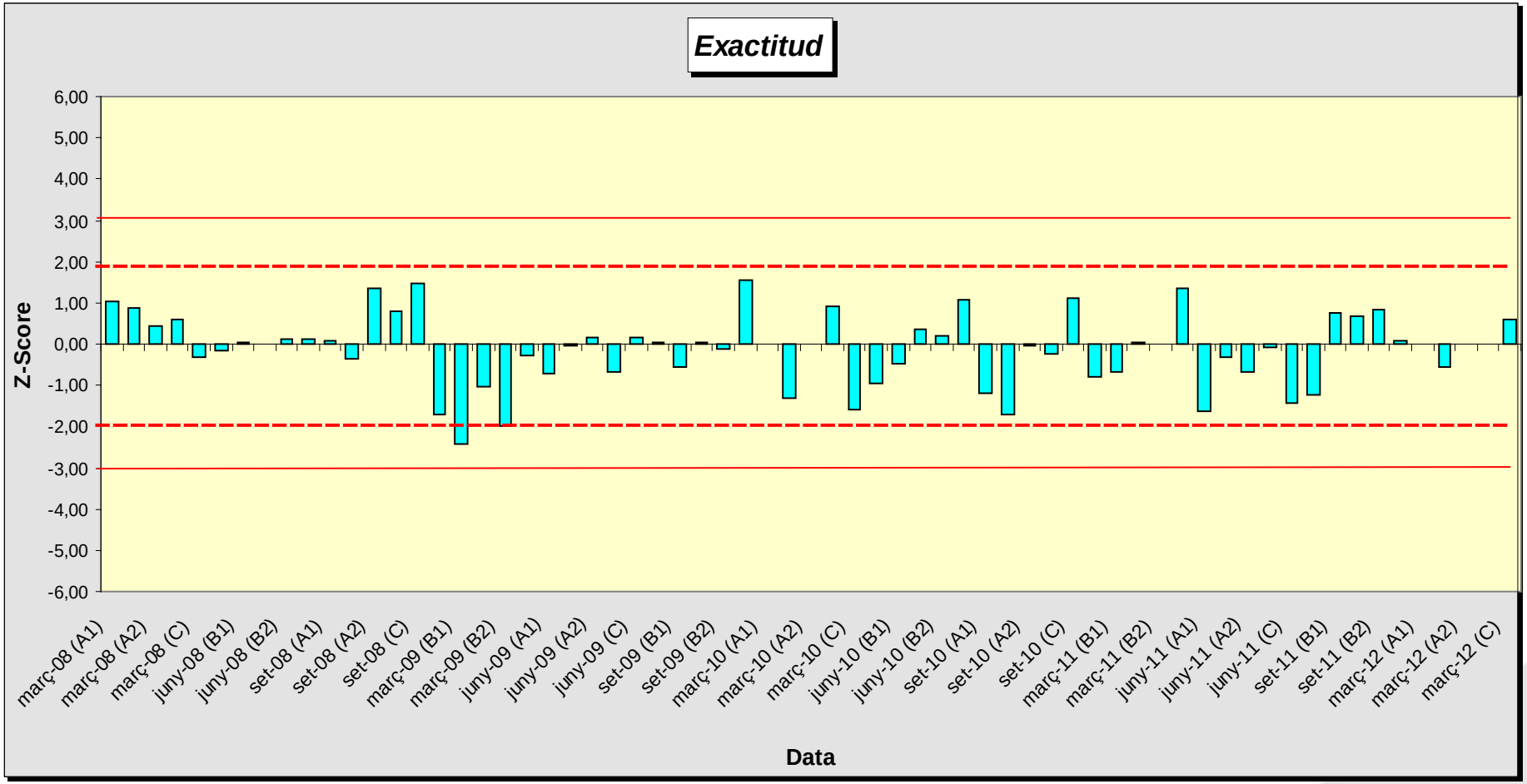
Inc	Pos	Name	Type	Call Target	Results CP	Results Score
☑	1	blanc reactius	Unknown	Positive	30.22	5.00
☑	2	Repl. of blanc reactius	Unknown	Positive	34.65	5.00
☑	3	st 20e3	Unknown	Positive	30.52	3.90
☑	4	Repl. of st 20e3	Unknown	Positive	32.12	5.00
☑	5	Leg bozemanii 100UG	Unknown	Positive	34.48	5.00
☑	6	Repl. of Leg bozemanii 100UG	Unknown	Positive	32.75	5.00
☑	7	Leg cherrii 100 UG	Unknown	Positive	33.96	5.00
☑	8	Repl. of Leg cherrii 100 UG	Unknown	Positive	33.09	5.00
☑	9	Leg erythra 100 UG	Unknown	Positive	34.34	5.00
☑	10	Repl. of Leg erythra 100 UG	Unknown	Positive	34.56	5.00
☑	11	Leg hackeliae 100 UG	Unknown	Positive	33.72	5.00
☑	12	Repl. of Leg hackeliae 100 UG	Unknown	Positive	33.51	5.00
☑	13	Leg jordanis 100 UG	Unknown	Positive	32.05	5.00
☑	14	Repl. of Leg jordanis 100 UG	Unknown	Positive	34.09	5.00
☑	15	Leg. lansingensis 100 UG	Unknown	Positive	33.58	5.00
☑	16	Repl. of Leg. lansingensis 100 UG	Unknown	Positive	32.58	5.00

110707 val inclusiv 100 UG 7/7/2011 Page 4 of 4

Agbar

Interlaboratorios

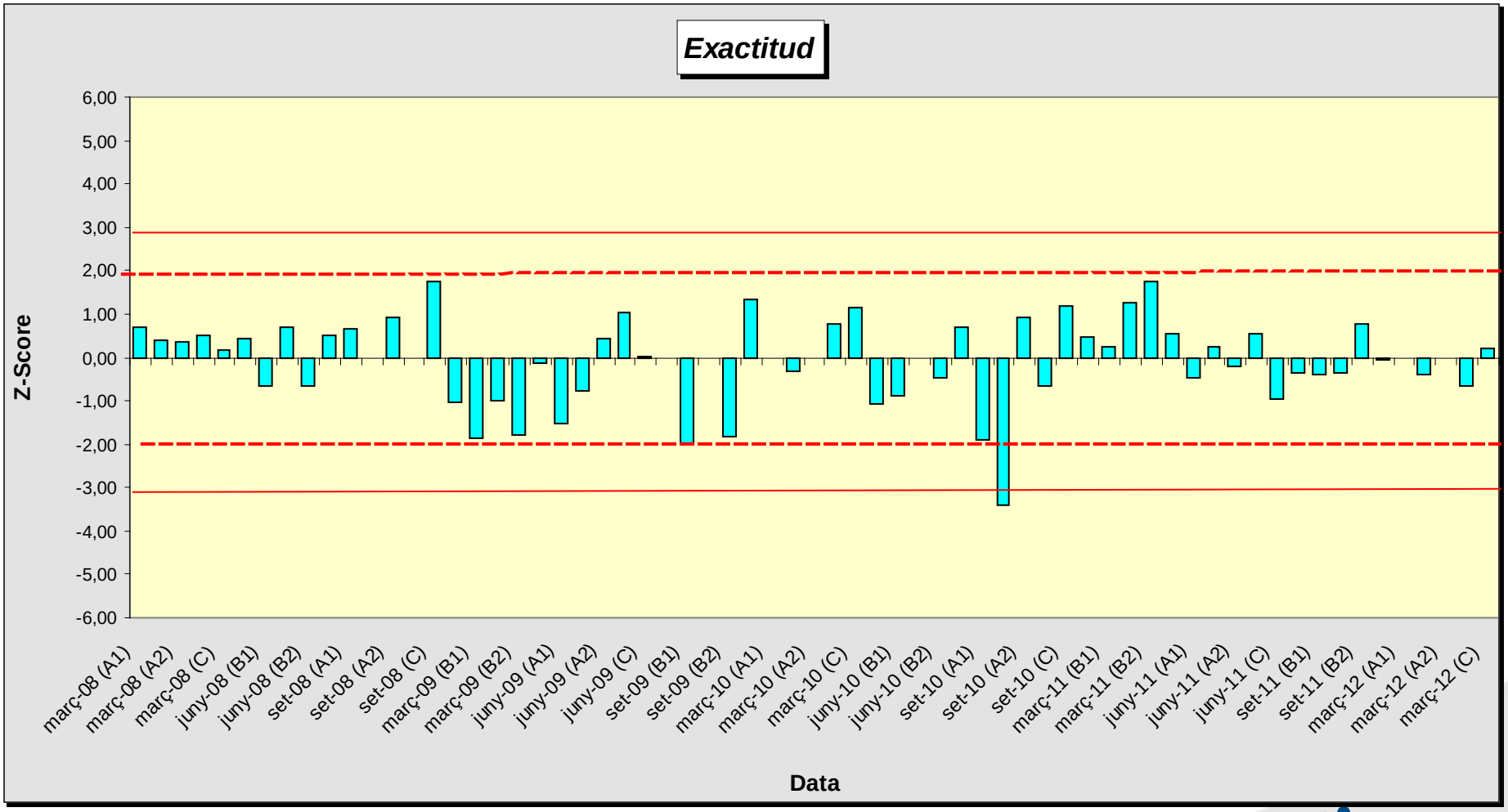
Legionella spp



Agbar

Interlaboratorios

Legionella pneumophila



Agbar

Agradecimientos

AGENCIA SALUT PÚBLICA

DE BARCELONA

Efrén Razquín

LABORATORIO MICROBIOLOGIA

AIGÜES DE BARCELONA

Belén Galofré

Carles Vilaró

Ana Mª Aira

Ivan Manero

Eva Durán

Agbar

muchas gracias
moltes gràcies

Agbar